

СУЧАСНИЙ АЛГОРИТМ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ АНТИБІОТИК- АСОЦІЙОВАНОЇ ДІАРЕЇ ТА ПСЕВДОМЕМБРАННОГО КОЛІТУ, ЗУМОВЛЕНИХ *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE*

Кирик Д.Л.¹, Поліщук Н.М.², Количева Н.Л.²,
Срьоміна А.К.², Кучер Т. В.²

¹Національний університет охорони здоров'я
України ім. П.Л. Шупика

²Запорізький державний медичний університет

Актуальність. На сьогодні проблему *C. difficile*-асоційованої інфекції (Cdl-AI) найчастіше пов'язують з двома основними клінічними проявами – антибіотик-асоційованою діареєю (AAD) та псевдомембранозним колітом (ПМК). Впровадження в широку клінічну практику в середині ХХ століття антибактеріальних препаратів (АБП) істотно вплинуло на частоту виявлення випадків ААД та ПМК. За даними авторів, ААД реєструється у 3,2–29,0 % пацієнтів, а ризик розвитку ПМК в оперованих хворих складає від 14 до 27% [1, 2, 3, 4]. Етіологічним фактором розвитку цих станів являється *Clostridioides difficile* (*C.difficile*), яка є грампозитивною спороутворюючою паличкою, що за типом дихання належить до облігатних анаеробів, і відноситься до родини *Peptostreptococcaceae* класу *Clostridia*. Збудник вперше був виділений Hall I.C. і O'Toole E. у 1935 році з фекалій здорових новонароджених дітей та мав назву *Bacillus difficilis* на підставі морфології і труднощів культивування. Цікавим є той факт, що ПМК був вперше описаний американським хірургом Finney J.M. ще за 42 роки до виділення збудника і за 36 років до відкриття антибіотиків. Саме Finney виявив при патологоанатомічному розтині 22-річної жінки, що загинула через розвиток післяопераційного гемоколіту, характерні "дифтеритні мембрани" [5, 6, 7]. З еволюцією ери антибіотиків, частота реєстрації колітів у хворих, що приймали антибактеріальну терапію, значно збільшилась, і на початку 70-х років ХХ сторіччя Bartlett J. вперше доповів про зв'язок *C. difficile* з розвитком коліту внаслідок застосування кліндаміцину [8]. В сучасній закордонній літературі ААД та ПМК описуються як «нозокоміальні коліти» [9, 10, 11]. Проблема виявлення та лікування Cdl-AI є край актуальною сьогодні через збільшення частоти виявлення ААД та ПМК у хворих, які під час лікування коронавірусної хвороби (COVID-19) приймали високі дози антибіотиків і блокаторів цитокінового шторму [12, 13, 14]. Особливу схильованість викликає категорія пацієнтів – безсимптомних бактеріоносіїв *C. difficile*, в яких колонізація кишківника може відбуватися як нетоксигенними так і токсигенними штамми кластеридій, і носити постійний або тимчасовий характер [15, 16]. Саме такі люди, особливо бактеріоносії токсигенних штамів *C. difficile*, потрапляючи в лікарняний заклад, стають епідеміологічно небезпечною категорією,

підтримуючи циркуляцію збудника в умовах стаціонару.

Відомо, що основною біологічною особливістю *C. difficile* є здатність до токсиноутворення [17]. На сьогодні доведено, що в патології людини грають три види екзотоксинів: токсин А (TcdA) з молекулярною вагою 308кД, токсин В (TcdB) з молекулярною вагою 269 кД та бінарний токсин (CDT), який визначається в риботипі NAP1/BI/027 (North American pulsed-field gel electroforesis type 1), і який посилює адгезію, колонізацію *C. difficile* та утворює на мембрані ентероциту комплекс, що проникає в цитоплазму і порушує функції клітини за допомогою дезорганізації цитоскелету [18, 19]. Даний штам NAP1/BI/027 визнаний у всьому світі головною причиною нозокоміальних спалахів і смертності у Європі та Північній Америці [20, 21, 22, 23]. TcdA і TcdB діють синергічно і кодується локусом патогенності – PaLoc (*C. difficile* pathogenicity locus), в якому, також, наявні гени, що кодують як позитивні, так і негативні регулятори експресії токсинів, а також холін, який сприяє їх вивільненню. За своїми властивостями TcdA є ентеротоксином, а TcdB –цитотоксином, патогенна дія якого у 10 разів потужніша за TcdA. Також, доведено, що гени *tcdA* та *tcdB* у різних штамів *C. difficile* можуть виявлятися в різних комбінаціях: *tcd A+B+*, *tcd A+B-* і *tcd A-B+* [24]. Протягом останніх двох десятиліть спостерігались великі і довготривалі епідемічні спалахи Cld-AI з істотним зростанням летальності, що охоплювали декілька стаціонарів і були пов'язані з широким розповсюдженням нового штаму збудника, що продукує бінарний токсин. Серед здорового населення набуло поширення бактеріоносійство токсигенних штамів *C. difficile*. За даними досліджень, частка носіїв серед здорових дорослих становить 15%, серед новонароджених – 84%, а серед літніх людей – 57% [10, 25]. Найбільш вагомим результатом сучасних досліджень молекулярно-біологічних властивостей *C. difficile* є відкриття патогенетичної та епідеміологічної значущості нового штаму збудника – гіпервірулентного фторхінолонрезистентного штаму ПЛР-риботипу 027 (CD 027), що продукує бінарний токсин. Він був вперше виділений у 1988 році від 28-річної жінки із важким ПМК і до 2004 року вважався рідкісним ПЛР – риботипом, так як його диференціювали лише у 6% штамів. Згідно сучасних даних відомо, що бінарний токсин виявляється майже у двох третин штамів цього збудника [19]. Актуальність Cdl-AI вимагає пошуку ефективних методик та заходів лабораторної діагностики ААД та ПМК, спрямованих на виявлення і вивчення біологічних властивостей збудників даних захворювань.

Мета дослідження. Пошук та узагальнення наукових даних щодо сучасних алгоритмів лабораторної діагностики *C. difficile*-асоційованої інфекції.

Матеріали та методи. Для реалізації мети проведений літературний пошук за допомогою англомовної текстової бази даних PubMed з використанням ключових слів «*C.difficile*-асоційована інфекція», «антибіотик-асоційована діарея», «псевдомембранозний коліт».

Результати та обговорення. До тепер, самим простим і загальнодоступним методом детекції мікроорганізмів, морфологічно схожих з *C. difficile*, є рутинна світлова мікроскопія мазків, пофарбованих за Грамом. Матеріалом для дослідження можуть бути випорожнення, відбитки або біоптат слизової оболонки товстого кишківника, отриманий при ендоскопічному дослідженні чи під час оперативного втручання, та підозрілі на кластридії колонії, що виростили на живильному середовищі при бактеріологічному дослідженні. Для епідеміологічного дослідження щодо встановлення поширеності токсигенних штамів *C. difficile* в тій чи іншій популяції, в якості біоматеріалу можна використовувати оформлені фекалії [26]. Головним недоліком методу світлової мікроскопії є відсутність специфічності, оскільки аналогічним чином фарбуються всі грампозитивні спороутворюючі бактерії. Проте, виявлення в мазках, грампозитивних паличок зі спорами, морфологічно схожих із кластридіями, можна розцінювати як «сигнальний» (орієнтовний) результат для подальшого проведення цілеспрямованої лабораторної діагностики *C. difficile*-обумовленого захворювання.

Сучасні підходи до виявлення *C. difficile* повинні бути спрямовані на отримання аналітично надійних і клінічно високоінформативних даних, необхідних для постановки діагнозу і призначення адекватної терапії. Сьогодні, основою алгоритмів дослідження є виявлення ферменту глутаматдегідрогенази (ГДГ) з визначенням наявності екзотоксинів, або генів, що кодують ГДГ, TcdA, TcdB і бінарний токсин та бактеріологічне дослідження матеріалу з метою виділення чистої культури збудника і вивчення його біологічних властивостей. Так, Американське та Європейське товариства мікробіологів рекомендують двоетапний алгоритм, що включає скринінговий тест на виявлення у фекаліях глутаматдегідрогенази (фермент – частина білкового комплексу, пов'язаного з токсином А; кодується геном *Glud* і перетворює глутамат в α -кетоглутарат) і визначення екзотоксинів (TcdA, TcdB) за допомогою таких серологічних методів як імуоферментний (ІФА) та імуохроматографічний аналіз (ІХА) [27, 28]. Метод індикації ГДГ і токсинів А/В у зразках фекалій за допомогою ІХА та ІФА дозволяє отримати швидко відповідь, але у кожній реакції є свої переваги і недоліки. ІФА має високу специфічність (до 95%), при низькій чутливості (70-80%). ІХА має низький рівень специфічності, але показує більш високу чутливість у порівнянні з ІФА. Необхідно зазначити, що зниження специфічності тестів для виявлення ГДГ пов'язано з тим, що даний фермент присутній у клітинах багатьох еукаріот і прокаріот, у тому числі, і у *C. difficile*, що

призводить до перехресного реагування у процесі відтворення тесту. При позитивному результаті скринінгу в ІФА або ІХА проводять бактеріологічне дослідження матеріалу з наступним вивченням токсигенних властивостей та чутливості виділених штамів *C. difficile* до АБП. Проте, якщо при негативних тестах на ГДГ і токсини А/В у хворого зберігається діарея, то в цьому разі необхідно виключити наявність бінарного токсину у досліджуваного штаму використовуючи метод ПЛР.

На нашу думку, найбільш оптимальним є трьох етапний алгоритм лабораторної діагностики Cld-AI, який поєднує високочутливі і високоспецифічні лабораторні методи, що забезпечують високу відтвореність і зменшують до мінімуму відсоток хибнопозитивних результатів. Перший етап передбачає визначення генів, що кодують ГДГ, токсини А/В та бінарний токсин *C. difficile*. Отримання негативного результату ПЛР дає можливість припинити пошук збудника в досліджуваному матеріалі, і навпаки: отримання позитивного результату передбачає проведення бактеріологічного дослідження зразків (другий етап) з метою виділення чистої культури збудника і вивчення його чутливості до антибіотиків (третій етап).

Беззаперечно, «золотим стандартом» мікробіологічної діагностики Cld-AI вважається бактеріологічний метод дослідження, який дозволяє виділити збудника і всебічно вивчити його біологічні властивості, у тому числі, визначити чутливість до АБП. Традиційно для виділення анаеробів, у тому числі кластридій, широко використовується середовище Вільсона-Блера (залізо-сульфітний агар, ЗСА), але воно не є селективним для *C. difficile*. Це пов'язано з тим, що *C. difficile* та представники роду *Clostridium* володіють однаковими культуральними ознаками і зростають на ЗСА у вигляді колоній чорного кольору за рахунок утворення сполук заліза. На відміну від ЗСА, повністю відповідає фізіологічним потребам *C. difficile* живильне середовище ССФА (Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar), яке створено на основі яєчного жовтка, селективних компонентів (цикloserин і цефокситин) та елективної домішки фруктози і селективного середовища *Clostridium difficile* Selective Agar (CDSA) із манітом. Попереднє прогрівання проби фекалій перед посівом на ССФА при 70°C протягом 1 години, забезпечує в анаеробних умовах ріст на агарі колоній *C. difficile* вже через 18-24 год. інкубації при температурі 35-37°C. При рості на ССФА *C. difficile* утворює плоскі біло-жовті колонії діаметром 2-4 мм, неправильної форми колоній, без гемолізу та з запахом *p*-крезолу [29]. На CDSA через 48-72 год. виявляється зростання плоских або злегка піднятих над поверхню агару жовтого кольору колоній, що схожі на матове скло, зі злегка хвилястими краями. При цьому, в залежності від розміру і часу інкубації, колонії *C. difficile* можуть бути оточені 2-3 мм жовтою зоною (без зони гемолізу). Так як збудник є облигатним анаеробом, то під впливом вільного кисню, колонії на цьому середовищі можуть змінювати свій колір на рожевий внаслідок втрати життєздатності

мікроорганізмів [30]. Ідентифікація видів клостридій здійснюється шляхом визначення їх біохімічних властивостей. Таким чином, остаточний результат бактеріологічного дослідження видається на підставі результатів мікроскопічного дослідження матеріалу, характерних культуральних особливостей росту *C. difficile* на селективних середовищах, біохімічних ознак збудника та чутливості до АБП.

Необхідно зазначити, що тільки виділення та ідентифікація *C. difficile* без подальшого визначення продукції токсинів у виділених штамів призводить до гіпердіагностики Cld-I, яка пов'язана із значною поширеністю безсимптомного носійства нетоксигенних штамів. У зв'язку з цим заслуговують на увагу поживні середовища та технології, що дозволяють диференціювати токсигенні штами (tox+) *C. difficile* від не токсигенних (tox-). Так, наприклад, виявлення токсигенних ізолятів можливо на середовищі Cdifftox plate assay, що містить 5-Бром-4-хлор-3-індол-бета-D-галактозид (X-gal), і на якому *C. difficile* tox+ формують колонії синього кольору за рахунок розщеплення X-gal [31].

У сучасній медичній практиці особлива увага приділяється молекулярно-генетичним методам дослідження, результати яких використовуються як з діагностичною метою, так і з метою розслідування епідеміологічних спалахів, обумовлених *C. difficile* [32, 33]. Доведено успішне застосування ПЛР для індикації tox+ штамів *C. difficile* та визначення антибіотикочутливості збудника, шляхом ампліфікації специфічних ділянок геномів, що кодують токсини і резистентність до антибіотиків [34]. З метою підвищення специфічності методу ПЛР запропоновано двоступеневий протокол ПЛР, в якому використовуються праймери до ділянки 16S рибосомальної РНК *C. difficile* [35]. На сьогоднішній день визначено більш 150 риботипів і 24 токсинотипів *C. difficile*, і це надає можливість використовувати отриманні дані для моніторингу розповсюдження збудника та проведенню протиепідемічних заходів [33]. В якості швидкого та надійного інструменту для епідеміологічного відстеження *C. difficile* запропонований метод MALDI-TOF мас-спектрометрії (Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), який завдяки визначенню білкових спектрів збудника, дозволяє його ідентифікувати [36, 37].

Різноманіття умов і факторів, що сприяють швидкому розвитку важких форм Cld-AI, обумовили розробку кількох експрес-способів індикації токсинів збудника безпосередньо в пробах біологічного матеріалу хворих. Запропонований у 90-х роках ХХ сторіччя метод визначення цитопатичної дії (ЦПД) токсинів А/В *C. difficile* у культурі фібробластів з наступним проведенням реакції нейтралізації токсину специфічним антитоксином є високочутливим та високоспецифічним [38]. Але цей метод має свої недоліки, незважаючи на наявність комерційних тест-систем (необхідність придбання спеціального обладнання для підтримки життєздатності культури

тканин, тривалість дослідження, відсутність стандартизації) [29, 39.]

Найбільше поширення в лабораторній практиці отримав метод імуноферментного аналізу (ІФА), який дозволяє визначати у випорожненнях хворих токсини А і В *C. difficile*. До переваг методу ІФА відносяться: простота постановки, швидкість отримання результатів (протягом 2-3 годин дослідження), специфічність, відносно невисока вартість і відсутність необхідності роботи з культурами клітин [40]. Але разом із цим, необхідно пам'ятати, що деякі штами збудника (зокрема, *C. difficile* серогрупи F) продукують тільки токсин В, а у деяких клінічних ізолятів toxA+, токсин А не визначається у зв'язку з мутацією гена *tcdA* у 139-й позиції [41]. Тому, в окремих лабораторіях для підтвердження діагнозу Cld-AI використовують комбінацію двох методів – ЦПД-тест та ІФА, що підвищує ефективність діагностики до 81% [42].

Для якісного виявлення антигенів токсинів А і В у випорожненнях можуть використовуватись імунохроматографічні експрес-тести (ІХА). Постановка цих тестів відрізняється простотою і швидкістю (до 15 хв.), високою чутливістю (до 93%) та низькою собівартістю сучасних комерційних наборів [43]. Але ІХА-метод можна використовувати лише як скринінговий тест і для остаточної діагностики необхідно проводити 2-3-кратне додаткове дослідження [44].

Запропонована реакція латекс-аглотинації (РЛА) для виявлення токсину А та ГДГ у випорожненнях не отримала належного визнання у зв'язку із невисокою чутливістю і специфічністю, незважаючи на низьку вартість РЛА, простоту постановки та швидкість отримання результату (0,5 години) [29, 45]. Виявилось, що позитивну реакцію в РЛА можуть давати як токсикогенні так і не токсикогенні штами *C. difficile*, а ГДГ може бути присутнім у різних видів клостридій.

Аналіз літературних даних та досвід фахівців з мікробіологічної діагностики свідчить про вагому роль лабораторних методів дослідження при діагностиці захворювань, обумовлених *C. difficile*. При цьому, пріоритет надається аналітично надійним методикам з високим ступенем достовірності отриманих результатів. Оцінка ефективності кожного з розроблених методів свідчить про те, що на сьогоднішній день жоден з лабораторних тестів не може бути використаний в якості самостійного методу діагностики Cld-AI. Оптимальним є використання комбінації двох або трьох лабораторних тестів, що дозволяє досягти максимально високої чутливості і специфічності дослідження. Тобто, провідну роль у встановленні і підтвердженні діагнозу цієї інфекції грають специфічні лабораторні методи дослідження спрямовані як на виявлення збудника, так і його токсинів [46]. Нажаль, у більшості мікробіологічних лабораторій діагностика Cld-AI зводиться лише к проведенню бактеріологічного дослідження і виділенню чистої культури збудника без вивчення її токсигенних властивостей, через що отриманий

результат не може вважатись достовірним. Необхідно пам'ятати, що бактеріологічний метод з подальшим тестуванням виділених штамів на токсигенність володіє практично 100% чутливістю і рівнозначною специфічністю та є надійним методом діагностики Cdl-AI, незважаючи на тривалість дослідження (до трьох-чотирьох діб) й необхідність використання спеціального обладнання для роботи з анаеробними культурами. Сучасна практика показала, що найчастіше при важкому перебігу ААД і ПМК використовуються прискорені методи визначення токсинів А/В *C. difficile* та ГДГ у фекаліях. Інтерес до прискорених методів лабораторної діагностики Cdl-AI обумовлений, в першу чергу, потребами призначення своєчасної етіотропної терапії. В цьому аспекті треба акцентувати увагу на тому факті, що ІФА та ІХА можуть використовуватись лише як скринінгові методи. На сьогодні, найперспективнішим методом ранньої діагностики Cdl-AI є різні модифікації ПЛР (з чутливістю до 95,5% і специфічністю до 99,0%), що дозволяють визначити присутність геному *C. difficile*, наявність тох-генів і генів резистентності до антибіотиків та означити ключову роль клостридій у патогенезі коліту. Крім того, використання ПЛР, як одного з етапів алгоритму діагностики Cdl-AI дозволяє діагностувати більше випадків, що можуть бути пропущені при дослідженні біоматеріалу будь-яким іншим методом. Таким чином, впровадження у практичну діяльність мікробіологічних лабораторій трьох етапного алгоритму дослідження забезпечить достовірну і своєчасну діагностику Cdl-AI та ефективне проведення протиепідемічного нагляду.

Висновки

1. В сучасних умовах безконтрольного використання антибіотиків в установах охорони здоров'я захворюваність на Cdl-AI має сталу тенденцію до зростання.
2. Дотримання певного алгоритму діагностики Cdl-AI необхідно для своєчасного виявлення ААД і ПМК та запобігання розвитку тяжких форм.
3. Послідовне виконання етапів діагностики ААД і ПМК дозволяє уникнути розповсюдження нозокоміальних штамів клостридій в умовах лікарняного закладу.

Modern algorithm of microbiological diagnostics of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis due to *Clostridioides difficile*

Kyryk D. L., Polishchuk N. M., Kolycheva N.L., Yeryomina A.K., Kucher T.V.

Introduction. Today, the problem of *C. difficile*-associated infection (Cdl-AI) is most often associated with two clinical manifestations - antibiotic-associated diarrhea (AAD) and pseudomembranous colitis (PMC), which are frequent side effects of antibacterial drugs and are manifested from a mild form to a severe course of the disease. According to the authors, AAD is registered in 3.2–29.0% of patients, and the risk of developing PMK in operated patients ranges from 14 to 27%. The problem

of detection and treatment of Cdl-AI is extremely relevant today due to the increased frequency of AAD and PMK registration in patients with coronavirus disease (COVID-19), who received high doses of antibiotics and cytokine storm blockers during treatment. In modern foreign literature, AAD and PMK are described as "nosocomial colitis". The category of patients - asymptomatic carriers of *C. difficile*, which are becoming an epidemiologically dangerous category, maintaining the circulation of the pathogen in hospitals is of particular concern. The relevance of Cdl-AI requires the search for effective methods and measures of laboratory diagnosis of AAD and PMK, aimed at identifying and studying the biological properties of pathogens of these diseases.

Materials and methods. To achieve this goal, a literature search was conducted using the English-language text database PubMed using the keywords "*C. difficile*-associated infection", "antibiotic-associated diarrhea", "pseudomembranous colitis". **Results and discussion.** The basis of research algorithms in the diagnosis of Cdl-AI is the detection of the enzyme glutamate dehydrogenase (GDG) with the determination of the presence of exotoxins or genes encoding GDG, TcdA, TcdB and binary toxin and bacteriological examination of the material to identify pure cultures of the pathogen and study its biological properties. The American and European Societies of Microbiologists recommend a two-step algorithm that includes a screening test for the detection of GDG in feces and the detection of exotoxins (TcdA, TcdB) using serological methods such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunochromatographic analysis. If the ELISA or IHA test is positive, a bacteriological examination of the material is performed, followed by a study of the toxigenic properties and sensitivity of the isolated *C. difficile* strains to ABP. The most optimal is a three-step algorithm for laboratory diagnosis of Cdl-AI, which involves the determination of genes encoding GDG, toxins A / B and binary toxin *C. difficile*. Obtaining a negative PCR result makes it possible to stop the search for the pathogen in the test material, and vice versa: obtaining a positive result (the first stage) involves a bacteriological examination of samples to isolate pure culture of the pathogen (the second stage) and study its sensitivity to antibiotics (the third stage). To increase the specificity of the PCR method, a two-step PCR protocol has been proposed, with using primers to the 16S region of *C. difficile* ribosomal RNA, which made it possible to identify more than 150 ribotypes and 24 *C. difficile* toxinotypes. As an alternative to PCR ribotyping, the MALDI-TOF method of mass spectrometry (Matrix assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry) has been proposed to investigate epidemic outbreaks, profiles of bacteria and identify pure cultures of *C. difficile*. MALDI-TOF mass spectrometry and PCR ribotyping can be used to monitor the spread of the pathogen and to carry out anti-epidemic measures.

Conclusions. 1. Under the current conditions of uncontrolled use of antibiotics in health care facilities, the incidence of Cdl-AI has a steady upward trend. 2. Adherence to a certain algorithm for the diagnosis of

CdI-AI is necessary for the timely detection of AAD and PMK and prevent the development of severe forms. 3. Consistent implementation of the stages of diagnosis of AAD and PMK avoids the spread of nosocomial strains of clostridia in a hospital.

Keywords: microbiological diagnostics, algorithm, antibiotic-associated diarrhea, pseudomembranous colitis, *Clostridioides difficile*

References

1. Moskaliuk V. D., Rudan I. V., Balaniuk I. V. [et al.] Antibiotic-associated diarrhea due to *Clostridium difficile* // Zaporozhye medical journal. 2018. Vol. 20, N 5(110). C. 729–733. DOI: <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2018.5.141730>
2. Malov V.A. Antibiotic-Associated Diarrhea // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2002. Vol. 4, N 1. P. 185–197. URL: <https://cmac-journal.ru/publication/2002/1/cmac-2002-t04-n1-p022/cmac-2002-t04-n1-p022.pdf>
3. Lysyuk Yu. S., Andryushchenko V.P., Kohut L.M. [et al.] Pseudomembranous colitis: multidisciplinary principles of prevention, diagnosis and treatment policy // Scientific Bulletin of Uzhgorod University. Series: Medicine. 2016. N 2. P. 105–111. URL: <https://dspace.uzhnu.edu.ua/jspui/handle/lib/11822>
4. Yu. S. Lysiuk, L. M. Kohut, D. L. Romanchak [et al.] Pseudomembranous colitis – the practical aspects of diagnosis and treatment (brief literature review) // Hospital surgery. 2017. N 4. P. 96–100. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/shpkhir_2017_4_20
5. Hall I.C., O'Toole E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis* // Am. J. Dis. Child. 1935. N 49. P. 390.
6. Stepanov Y.M., Simonova E.V., Budzak I.Y. [et al.] *Clostridium difficile*-associated colitis: literature review, case report // Gastroenterology. 2020. N 54 (3). P. 188–201. DOI: <https://doi.org/10.22141/2308-2097.54.3.2020.211739>
7. Chyornenkaya T.V. Pseudomembranous colitis: diagnosis, treatment and prevention // Russian Sklifosovsky Journal "Emergency Medical Care". 2016. N 1. P. 33–39. URL: <https://www.jnmp.ru/jour/article/view/114/115>
8. Bartlett J.G., Onderdonk A.B., Cisneros R.L. [et al.] Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters // *J. Infect. Dis.* 1977. N 136. P. 701–705. URL: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/136.5.701>
9. Nasser H., Munie S., Shakaroun D. [et al.] *Clostridium difficile* Enteritis after Total Abdominal Colectomy for Ulcerative Colitis // *Case Rep. Crit. Care.* 2019. P. 1–4. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/2987682>
10. Kato H., Kato N., Watanabe K. [et al.] Analysis of *Clostridium difficile* Isolates from Nosocomial Outbreaks at Three Hospitals in Diverse Areas of Japan // *J. Clin. Microbiol.* 2001. N 39(4). P. 1391–1395. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1391-1395.2001>
11. Kazanowski M., Smolarek S., Kinnarney F. [et al.] *Clostridium difficile*: epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities – a systematic review // *Tech. Coloproctol.* 2014. N 18 (3). P. 223–232. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10151-013-1081-0>
12. Spigaglia P. COVID-19 and *Clostridioides difficile* infection (CDI): Possible implications for elderly patients // *Anaerobe.* 2020. N 64: 102233. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102233>
13. Ferreira Ed.O., Penna B., Yates E.A. Should We Be Worried About *Clostridioides difficile* During the SARS-CoV2 Pandemic? // *Front. Microbiol.* 2020. N 11. P. 1–4. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581343>
14. Sipos S., Vlad C., Prejbeanu R. [et al.] Impact of COVID-19 prevention measures on *Clostridioides difficile* infections in a regional acute care hospital // *Experimental and therapeutic medicine.* 2021. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10649>
15. Crobach M.J.T., Vernon J.J., G.L. Vivian [et al.] Understanding *Clostridium difficile* Colonization. // *American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews.* 2018. N 31(2). P. 1–29. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-17>
16. Guh Y., L. McDonald Cl. Active Surveillance and Isolation of Asymptomatic Carriers of *Clostridium difficile* at Hospital Admission: Containing What Lies Under the Waterline Alice // *JAMA Intern. Med.* 2016. N 176(6). P. 805–806. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.1118>
17. Chandrasekaran R., Lacy D. The role of toxins in *Clostridium difficile* // *FEMS Microbiology Reviews.* 2017. N 41(6). P. 723–750. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux048>
18. Kostic A. D., Xavier R. J., Gevers D. The Microbiome in inflammatory bowel diseases: current status and the future ahead // *Gastroenterology.* 2014. N 146 (6). P. 1489–1499. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.009>
19. Bacci S., Mølbak K., Kjeldsen M. [et al.] Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection // *Emerg. Infect. Dis.* 2011. N 17(6). P.976–982. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1706.101483>
20. Warny, M., Pepin, J., Fang, A. [et al.] Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe // *Lancet.* 2005. N 366(9491). P 1079–1084. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67420-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67420-X)
21. Stanley, J., Bartlett, J., Dart, B. [et al.] *Clostridium difficile* infection // *Curr. Probl. Surg.* 2013. N 50. P. 302–337. DOI: <https://doi.org/10.1067/j.cpsurg.2013.02.004>
22. He, M.; Miyajima, F.; Roberts, P. [et al.] Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile* // *Nat. Genet.* 2013. N 45(1). P. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.2478>
23. Davies K.A., Ashwin H., Longshaw C.M. [et al.] Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: Results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013 // *Eurosurveillance.* 2016. N 21(29). P. 1–11. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.29.30294>
24. Azimirad M., Azizi O., Alebouyeh M. [et al.] Molecular analysis and genotyping of pathogenicity locus

- in Clostridioides difficile strains isolated from patients in Tehran hospitals during the years 2007-2010 // Infect. Genet. Evol. 2019. N 71. P. 205-210. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.010>
25. Putsathit P., Maneerattanaporn M., Piewngam P. [et al.] Prevalence and molecular epidemiology of Clostridium difficile infection in Thailand // New Microbes and New Infections. 2017. N 15(1). P. 27-32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.10.004>.
26. Shelygin Yu.A., Aleshkin V.A., Sukhina M.A. [et al.] Clinical recommendations of the National Association of specialists for the healthcare related infections control and the russian association of coloproctology on diagnosis, treatment and prophylaxis of Clostridium difficile-associated diarrhea // coloproctology. 2018. N 3 (65). P. 7-23.
27. Crobach M.J., Dekkers O.M., Wilcox M.H. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI) // Clin. Microbiol. Infect. 2009. N 15(12). P.1053- 1066. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03098.x>.
28. A practical guidance document for the laboratory detection of toxigenic Clostridium difficile.-Washington, DC: American Society for Microbiology, 2010. URL: <http://www.asm.org/images/pdf/Clinical/clostridiumdifficile9-21.pdf>.
29. Lobzin Yu.V, Zakharenko S.V., Ivanov G.A. Current Understanding of Clostridium difficile infection // Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy. 2002. N 4(3). P. 200–232. URL: <https://cmac-journal.ru/publication/2002/3/cmhc-2002-t04-n3-p200/cmhc-2002-t04-n3-p200.pdf>
30. BBL Clostridium difficile Selective Agar. URL: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=24511>
31. Darkoh Ch., DuPont H.L., Kaplan H.B. Novel One-Step Method for Detection of Clostridium difficile Strains Directly from Isolation of ActiveToxin-Producing Stool Samples // J. Clin. Microbiol. 2011. N 49(12). P. 4219-4224. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01033-11>
32. Kyryk D.L. Molecular techniques in diagnostic microbiological practice and epidemiological analysis // Preventive medicine. 2015. N 1-2(24). P.127-135. URL: https://duieih.kiev.ua/documents/journal/1-2_2015%20.pdf
33. Griffiths D., Fawley W., Kachrimanidou M. [et al.] Multilocus Sequence Typing of Clostridium difficile // J.Clin. Microbiol. 2010. N 48(3). P. 770–778. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-365-7_6
34. Goorhuis A., Legaria M.C., van den Berg R.J. [et al.] Application of multiple-locus variablenumber tandem-repeat analysis to determine clonal spread of toxin A-negative Clostridium difficile in a general hospital in Buenos Aires, Argentina // Clin. Microbiol. Infect. 2009. N 15(12). P. 1080–1086. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02759.x>.
35. Kuhl S.J., Tang Y., Navarro L. [et al.] Diagnosis and monitoring of Clostridium difficile infections with the polymerase chain reaction // Clin. Infect. Dis. 1993. N 16(4). P. 234–238. DOI: https://doi.org/10.1093/clinids/16.supplement_4.s234
36. Calderaro A., Buttrini M., Martinelli M. [et al.] Rapid Classification of Clostridioides difficile Strains Using MALDI-TOF MS Peak-Based Assay in Comparison with PCR-Ribotyping. Microorganisms. 2021. N 9(3). P.1-12. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030661>
37. Ruxin Li, Di Xiao, Jing Yang. Identification and Characterization of Clostridium difficile Sequence Type 37 Genotype by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J. Clin. Microbiol. 2018. N 56(5). P.1-9. DOI:<https://doi.org/10.1128/JCM.01990-17>
38. Borriello S.P., Wren B.W., Hyde S. [et al.] Molecular, immunological and biological characterization of a toxin A negative, toxin B positive strain of Clostridium difficile // Infect. Immun. 1992. N 60(10). P. 4192–4199. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.60.10.4192-4199.1992>
39. Kvetnaya A.S., Makridi P.S., Behtereva M.K. Modern Recent on the Laboratory Diagnosis of Clostridium Difficile-associated Infection // Journal of infectiology. 2013. N 5(3). P.5-12. URL: <https://journal.niidi.ru/jofin/article/viewFile/180/174>
40. Vanpoucke H., Baere T.De, Claeys G. [et al.] Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of Clostridium difficile toxin and/or antigen in stool specimens // Clin. Microbiol. Infect. 2001. N 7(2). P. 55–64. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00141.x>
41. Sambol, S.P., Merrigan M. M., Lysterly D. [et al.] Toxin gene analysis of a variant strain of Clostridium difficile that causes human clinical disease // Infect. Immun. 2000. N 68(10). P. 5480–5487. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.68.10.5480-5487.2000>
42. Staneck J.L., Weckbach L.S., Allen S.D. [et al.] Multicenter evaluation of four methods for Clostridium difficile detection: ImmunoCard C. difficile, cytotoxin assay, culture, and latex agglutination // J. Clin. Microbiol. 1996. 34(11). P. 2718–2721.
43. Gerding, D.N., Johnson S., Peterson L.R. [et al.] Clostridium difficile associated diarrhea and colitis // Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 1995. 16(8). P.459–477
44. Sukhina M.A., Safin A.L. The actual condition of laboratory diagnostic of Clostridium difficile-associated diarrhea; the methods of detection of toxigenic strains (review of publications) // Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2017. 62(10). P.635-640. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-635-640>.
45. Shahrabadi M.S., Bryan L.E., Gaffney D. [et al.] Latex agglutination test for detection of Clostridium difficile toxin in stool samples // J. Clin. Microbiol. 1984. 20(3). P. 339–341.
46. Kim H., Jeong S. H., Kim M. [et al.] Detection of Clostridium difficile toxin A/B genes by multiplex real-time PCR for the diagnosis of C. difficile infection // Journal of Medical Microbiology. 2012. 61(2). P. 274–277. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.035618-0>