

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО НАРОДНОМУ ОБРАЗОВАНИЮ

ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ  
УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ имени ПАТРИСА ЛУМУМБЫ

989-1  
904-2

*На правах рукописи*

ТРЕТЬЯКОВ Виктор Александрович

УДК 576.851.557△576.8.078

**CLOSTRIDIUM DIFFICILE:**  
**ВЫДЕЛЕНИЕ И МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ**  
*(03.00.07 — микробиология)*

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва — 1988

Работа выполнена в Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича Минздрава СССР.

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор **Б. Д. Быченко**,  
доктор биологических наук, профессор **А. П. Простяков**.

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, ст. научный сотрудник  
**О. Ш. Джексенбаев**,  
кандидат медицинских наук, доцент **Е. Г. Волина**.

Ведущее учреждение — Московский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова.

Защита диссертации состоится «        »        1989 г.  
в        часов на заседании специализированного совета К 053.22.16 в ордена Дружбы народов Университете дружбы народов им. Патриса Лумумбы по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Университета дружбы народов им. П. Лумумбы (Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6).

Автореферат разослан «        »        1988 г.

Ученый секретарь  
специализированного совета  
кандидат биологических наук,  
доцент

Л. Ф. ЛЕВИНА

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Намеченный XXVII съездом КПСС курс на ускорение социально-экономического развития страны предусматривает реализацию крупных социальных программ, которые обеспечат охрану и укрепление здоровья людей. Одним из важных вопросов партия и государство считает улучшение качества диагностики заболеваний, в том числе и инфекционных.

Борьба с острыми кишечными инфекциями человека до сих пор остается нерешенной проблемой. Проведение исследований, посвященных изучению возбудителей этой обширной группы заболеваний, является одним из важнейших звеньев в цепи мероприятий, направленных на лечение и профилактику кишечных инфекций.

В настоящее время многочисленными исследованиями показана роль клостридий - условно-патогенных микроорганизмов - в возникновении и развитии кишечных заболеваний детей и взрослых.

В последние годы в результате применения антибиотиков отмечается учащение случаев антибиотикозависимых кишечных инфекций, вызванных *Clostridium difficile* / J. Bartlett, 1979; S. Borrielle, et al. 1981; V. Aronsson, 1985/, которые относятся к семейству Bacillaceae.

В 1977 году H. Larson, et al. впервые обнаружили в стуле больных псевдомембранозным колитом / ПМК / токсический фактор, оказывающий цитотоксическое действие на культуры клеток. В дальнейшем, в содержимом кишечника больных ПМК в 20% случаев обнаружили токсины, обладающие летальным действием на лабораторных животных и цитотоксическим - на культуры клеток.

В материале от больных ПМК обнаруживали токсигенные штаммы *C. difficile*. По данным зарубежных специалистов / J. Al-Jumaili, et al., 1981; M. Ellis, 1984 / эти микроорганизмы являются возбудителями ПМК в 90-100%, других антибиотикозависимых колитов в 15-20% случаях.

Для выбора эффективных специфических средств, методов лечения и профилактики клостридиозов крайне важно своевременное бактериологическое подтверждение специфических экзотоксинов в материале от больных при учете соответствующих симптомов заболевания.

Применяемые в настоящее время схемы бактериологической

диагностики клостридиозов трудоемки и требуют длительного времени.

Широкое распространение клостридиозов, обусловленных *C. difficile* и отсутствие простых схем выделения и идентификации делают очевидной необходимостью разработки и усовершенствования способов бактериологической диагностики ПМК и других диарейных заболеваний.

#### Цель и задачи исследований

Основной целью наших исследований являлась разработка и усовершенствование методов индикации и идентификации возбудителя ПМК — *C. difficile* с учетом патогенетической значимости его экзотоксинов.

Задачами исследований являлись:

1. изучение биологических, морфологических и ферментативных свойств *C. difficile* ;
2. определение тестов, обеспечивающих четкую дифференциацию *C. difficile* от других видов клостридий;
3. усовершенствование метода индикации *C. difficile* на основе определения специфичности токсинокомплекса этих микроорганизмов в патологическом материале и в среде культивирования;
4. разработка схемы выделения *C. difficile* из клинического материала и идентификации этих микроорганизмов;
5. разработка методов препаративного выделения токсинокомплекса-АВ *C. difficile* с целью изучения его физико-химических свойств и действия как энтеро- и цитотоксина.

#### Научная новизна результатов исследований

Результаты исследования расширяют сведения о роли токсигенных штаммов *C. difficile* в патогенезе острых кишечных заболеваний людей.

На основании результатов изучения чувствительности *C. difficile* к антибиотикам подтверждены механизмы развития ПМК и некротизирующего энтероколита / НЭК /, как антибиотикозависимых колитов.

Впервые в нашей стране изучены физико-химические свойства очищенного препарата токсинокомплекса-АВ *C. difficile* и его био-

логическая активность /in vivo и in vitro/.

#### Практическое значение результатов исследования

Результаты исследования имеют большое значение в бактериологической практике при постановке и уточнении диагноза энтероколитов и диарейных заболеваний у взрослых людей и детей раннего возраста.

Разработана схема выделения и идентификации *C. difficile* из клинического материала.

Впервые для определения активности токсинокомплекса-АВ *C. difficile* использованы перевиваемые линии клеток / 4647, Fl ДКЧ /.

Разработан метод препаративного выделения токсинокомплекса-АВ *C. difficile* хроматографическим и седиментационным способами.

Показана возможность использования очищенного препарата токсинокомплекса-АВ в качестве антигена для иммунизации животных / получение антитоксина / и в серологических реакциях.

#### Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Результаты исследований биологических, морфологических и ферментативных свойств *C. difficile*.
2. Схема выделения и идентификации *C. difficile* из клинического материала.
3. Использование перевиваемых культур клеток для определения активности токсинов этих микроорганизмов.
4. Метод препаративного выделения токсинокомплекса-АВ *C. difficile* хроматографическим и седиментационным способами.
5. Использование препаративно очищенного токсинокомплекса-АВ *C. difficile* в качестве антигена для получения специфических антисывороток, пригодных для диагностических целей.

#### Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на конферен-

циях ГИСК им. Л.А. Тарасевича / Москва, 1984, 1985, 1986, 1987 гг./

Диссертационная работа апробирована на заседании Ученого совета ГИСК им. Л.А. Тарасевича / 19.04.1988 г./.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 статей.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 129 страницах и включает 114 страниц текста, 18 таблиц, 16 рисунков и 3 схемы. Список литературы включает 120 источника / 7 отечественных и 113 иностранных авторов /.

#### СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы. В работе применялись микробиологические, биохимические и иммунологические методы исследования.

Для проведения опытов была собрана коллекция культур из 33 штаммов *S. difficile*: 3 штамма получены в СССР, 8 - из Швеции, 9 - из Англии, 9 - из США и 4 штамма изолированы нами от больных диарейными заболеваниями. Коллекция культур включает референс-штаммы ATCC 9689, UPI-10463. Для выращивания штаммов и хранения культур применяли среду типа Кит-Тароцци. Морфологию колоний определяли в процессе роста культур на поверхности плотных питательных сред таких, как Бреввер-агар /"Merck"/, сердечно-мозговой агар /"Oxoid"/.

Для изучения биохимических свойств *S. difficile* и других видов клостридий, взятых в качестве контроля, применяли среды Гисса, "СИБ" - систему индикаторную бумажную / Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РСФСР /, систему мультитестов "API-20A" / Франция /. Нами разработан метод идентификации *S. difficile*, выделенных из материалов больных диарейными заболеваниями, по биохимическим свойствам, который основан на способности *S. difficile* разлагать маннит и мелезитозу с образованием кислоты и газа, но проявления инертности в отношении сахарозы. Были приготовлены индикаторные среды на основе 2% агара Хоттингера, 1% углевода с добавлением 2% индикатора Андреде.

Энтеротоксическое действие токсинокомплекса-AB, полученного из разных токсигенных штаммов *S. difficile*, определяли на

3-4-х-дневных белых мышах массой 2,5-3,5 г. За основу была принята методика Е.А. Lozano /1981/ с некоторой модификацией в наших условиях эксперимента. Результаты оценивали по коэффициенту действия энтеротоксина /энтеротоксический эффект/ - Кээ, который равен отношению массы кишечника к массе тела мыши. Результат считался положительным, то есть фиксировалось наличие энтеротоксического эффекта в том случае, если значение Кээ соответствовало величине  $\geq 0,085$ .

Цитотоксическое действие нативного токсинокомплекса-AB *S. difficile* определяли на культурах клеток разного вида и происхождения: FL - клетки амниона человека; M-7, M-19, M-20 - диплоидные линии клеток человека /ДКЧ - фибробласты из кожно-мышечной ткани эмбриона человека/; 4647 - перевиваемая линия клеток почек зеленых мартышек; Л-4I - моноциты крови человека, больного лейкоемией; ПЗМ - первично-трипсинизированные клетки почек зеленых мартышек; СНО-КI - клетки из ткани яичника китайского хомячка. Цитотоксическое действие /ЦТД/ оценивали "плюсами", соответственно проценту погибших клеток в монослое: 100% - /++++/, 75% - /+++/, 50% - /++/, 25% - /+/, отсутствие ЦТД - /-/-.

Чувствительность штаммов *S. difficile* к антибиотикам изучали, используя стандартный метод дисков, рекомендованный Всемирной организацией здравоохранения /WHO, Tech. Rep. Ser., 1982, 683 Annex. 5., P. 144-178. / и методом серийных разведений. Использовали антибактериальные антибиотики: аминогликозиды /мономицин, стрептомицин сульфат/; макролиды /эритромицина фосфат/; пенициллины /ампициллина натриевая соль, бензилпенициллина натриевая соль, карбенициллина динатриевая соль/; линкомицина гидрохлорид; тетрациклина гидрохлорид. Минимальную ингибирующую концентрацию /МИК/ устанавливали в соответствии с требованиями действующей инструкции методом серийных разведений в пробирках.

Очистку токсинокомплекса-AB *S. difficile* от балластных веществ проводили методом хроматографии с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-100 в колонке 2,6 x 60 см. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури, чистоту фракций - электрофорезом в 7,5% полиакриламидном геле. Концентрирование исходного фильтрата или его фракций осуществляли путем диализа против полиэтиленгликоля с м.м. 6000 д. Токсичное действие фракций, полученных в результате очистки на сефадексе G-100, определяли на новорожденных белых мышах.

Для выделения токсинокомплекса-АВ из культуральной жидкости после выращивания штаммов *S. difficile* использовали также и метод осаждения полиэтиленгликолем с м.м. 5000 ± 1000 д./ПЭГ II5/. Полноту выделения определяли на фотоэлектроколориметре КФК-2 по величине мутности /светорассеяния/ при красном свето-фильтре /длина волны 670 нм, рабочая ширина кюветы - 1,0 см/. Токсичность выделенных фракций исследовали на мышках-сосунках.

Электрофорез в полиакриламидном геле / ПААГ / использовали для подтверждения чистоты препаратов токсинокомплекса-АВ *S. difficile*, полученных с помощью препаративной хроматографии. Электрофорез проводили по методу А.Вагера /1970/ в аппарате фирмы "Reanal". Столбики геля для расшифровки фракционного состава белка помещали в пробирки с отмывной жидкостью или дистиллированной водой и учитывали результаты электрофоретического разделения.

С целью получения антисыворотки к препарату токсинокомплекса, выделенного методом хроматографии, нами была отработана схема иммунизации. В качестве продуцентов использованы самцы кроликов массой 2,5-3,0 кг. За основу взята схема, предложенная В.Агонссоном /1985/, согласно которой кроликам внутримышечно в область верхней трети каждой голени вводили по 0,5 мл антигенного материала, смешанного с равным объемом полного адьюванта Фрейнда. Концентрация белка в препарате токсинокомплекса-АВ составляла 0,14 мг/мл.

Для определения титра антител к токсинокомплексу-АВ *S. difficile* проводили реакцию диффузионной преципитации / РДП /методом Сухтерлони в 1,5% агаре Дифко /США/ в веронал-мединаловом буфере /рН 7,4/, как это описано в сборнике "Иммунологические методы" /1979/.

Статистическую обработку результатов опытов в тех случаях, когда это было необходимо проводили с учетом рекомендаций И.Г. Лавровой /1984/.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для установления вида возбудителя кишечных заболеваний большое значение имеет определение его способности ферментировать различные углеводы и другие субстраты. Нами были изучены свойства 24-часовых культур 29 музейных штаммов *S. difficile* и



4-х, выделенных нами от больных, при помощи трех систем для определения их биохимических свойств: "СИБ", "АРІ-20А" и цветного ряда Гисса. Результаты исследования представлены в таблице I.

Таблица I  
Сравнительная оценка ферментации углеводов  
штаммами *C.difficile*.

	Биохимические системы					
	"АРІ-20А"		"СИБ"		Цветной ряд Гисса	
ГЛЮКОЗА	+	100%	+	100%	+	100%
ЛАКТОЗА	-	0%	-	0%	-	0%
САХАРОЗА	-	0%	-	0%	-	0%
МАННОЗА	+	66%	+	70%	+	70%
МАЛЬТОЗА	-	0%	-	0%	-	0%
КСИЛОЗА	+	94%	+	94%	+	91%
ЖЕЛАТИН	-	0%	-	0%	-	0%
АРАБИНОЗА	-	0%	-	0%	-	0%
МАННИТ	+	100%	+	100%	+	100%
ГЛИЦЕРИН	-	0%	-	0%	-	0%
МОЧЕВИНА	-	0%	-	0%	-	0%
САЛИЦИН	+	91%	+	94%	+	91%
МЕЛЕЗИТОЗА	+	100%	+	100%	+	100%

На основании проведенных исследований мы предложили проводить индикацию и идентификацию *C.difficile* с использованием наиболее информативных биохимических свойств. Характерной особенностью *C.difficile* является способность разлагать маннит и мелезитозу с образованием кислоты и газа, а также инертности в отношении сахарозы. Полученные данные показали, что выбранная нами триада углеводов с достаточной достоверностью позволяет отличить *C.difficile* от других видов клостридий. Этот метод дифференциации прост и доступен для выполнения в практических лабораториях и, наравне с традиционными методами бактериологической диагностики, может быть использован для идентификации этих бактерий у больных с диагнозом ПМК или НЭК.

Энтеротоксическую активность токсинокомплекса-АВ *C.difficile* оценивали по накоплению жидкости в просвете кишечника ново-

рожденных белых мышей и определения величины Кэз. По интенсивности реактивности мышей на введение фильтратов штаммов *S. difficile*, были установлены три степени токсигенности последних: I степень - высокотоксигенные; II - токсигенные и III - нетоксигенные штаммы. Было установлено, что при введении цельных фильтратов высокотоксигенных штаммов, мыши погибали в 100% через 1,5-2,0 часа. При введении фильтратов токсигенных штаммов гибель мышей отмечалась только в 25-30% случаев к 4 часам после введения. Таким образом, по накоплению жидкости в просвете кишечника и определению Кэз можно судить о наличии энтеротоксина в фильтрате изучаемого штамма. Гибель мышей, наступающая через 2,0 часа, свидетельствует о высокой энтеротоксической активности комплекса-AB *S. difficile*.

Поскольку этот метод позволяет определить энтеротоксичность фильтратов питательной среды после культивирования в ней штаммов и фильтратов, полученных из образцов стула больных при одновременной постановке реакции нейтрализации с антитоксином *S. difficile*, его можно использовать как метод индикации токсино-комплекса-AB.

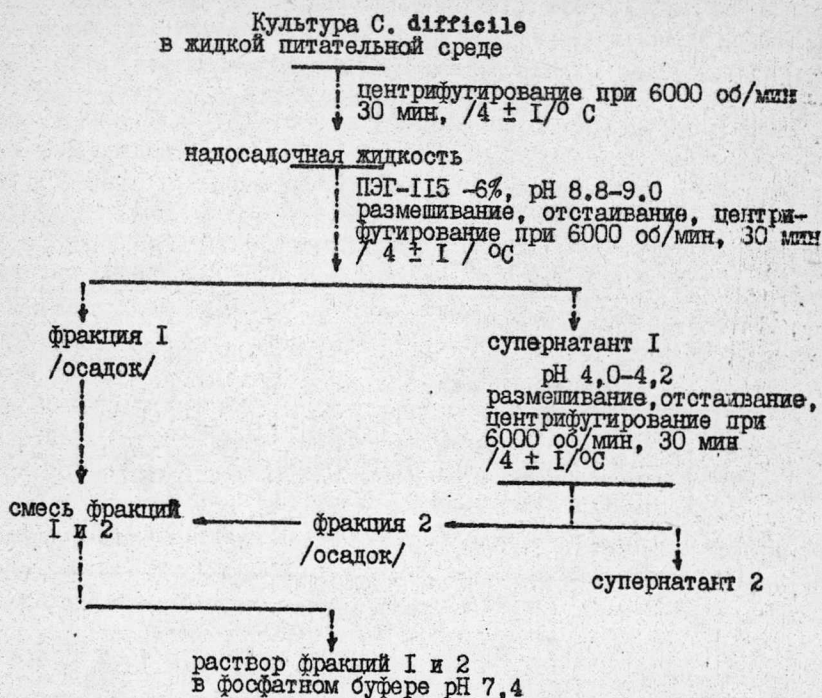
При исследовании фильтратов штаммов *S. difficile* на модели *in vitro* /клеточные культуры разного вида и происхождения/ было установлено, что высокотоксигенные штаммы 279-A, 281-A, "B" вызывают морфологические изменения в монослое клеток уже через 15 мин после введения цельного фильтрата. При этом установлено, что минимальное значение ЦТД высокотоксигенного штамма в культурах клеток FL, ДКЧ, Л-41 в  $10^{-4}$  раз меньше, чем доза фильтрата этих штаммов при которой отмечается токсический эффект *in vivo*.

По ЦТД на клетки можно выявить предельно малые концентрации токсинов *S. difficile*, содержащиеся в фильтратах культуры. Использование культур клеток в качестве тест-системы позволяет количественно оценить степень цитотоксической активности изучаемых штаммов *S. difficile* и фильтратов стула больных ПМК. Реакция нейтрализации с антитоксическими сыворотками против *S. difficile*, проведенная на культуре клеток дает более унифицированные и достоверные результаты.

В результате проведенных исследований была отработана схема препаративного выделения токсинокомплекса-AB *S. difficile* с помощью полиэтиленгликоля /схема I/. Наиболее полное осаждение белков, с молекулярной массой близкой к массе токсинокомплекса, достигается 6%-ным насыщением культуральной жидкости ПЭГом при

pH 4,0-4,2 и 8,8-9,0.

## Схема I

Схема выделения токсинокомплекса-AB *C. difficile*

Полученный препарат токсинокомплекса-AB *C. difficile* использован в качестве антигена для получения антитоксической сыворотки. РИП между цельной антисывороткой кролика и культуральной жидкостью после выращивания *C. difficile* образуются две дуги преципитации, что соответствует двум фракциям / токсины А и В /.

Мы также использовали метод гель-фильтрации для выделения токсинокомплекса-AB. Полученный хроматографический профиль проб среды культивирования и исходного фильтрата показал, что в исходном фильтрате присутствуют в основном два вида белковых субъединиц / токсин-А и токсин-В /.

Для установления чистоты выделенного препарата токсина, а также для подтверждения его присутствия в среде культивирования после выращивания *C. difficile*, был проведен сравнительный электрофоретический анализ исходной среды культивирования, культураль-

ной жидкости после выращивания *S. difficile*, а также полученного препарата токсинокомплекса. Результаты сравнительной оценки электрофорграмм свидетельствуют, что в исходном фильтрате, как и в препарате, полученном хроматографически, присутствуют два вида белковых молекул, характерных для А и В фракций токсинокомплекса-АВ *S. difficile*. Для подтверждения полученных результатов, исследовали токсичность хроматографически выделенного материала

/таблица 2/.

Таблица 2

Активность различных препаратов токсинокомплекса-АВ *S. difficile*

	К о н т р о л ь				О б р а з ц и				
	интакт- ные мы- ши	среда куль- тив-я	буфер	энте- роток- син <i>E.coli</i>	конц. фильт- рат	№ 10	№ 11 <sup>ж</sup>	№ 12	объединен- ный препа- рат I шика
Кээ	0,040 <sup>х</sup>	0,050	0,051	0,100	0,100	0,120	0,120	0,110	0,100
	0,040	0,055	0,055	0,100	0,100	0,120	0,120	0,100	0,100
	0,045	0,055	0,050	0,095	0,110	0,110	0,120	0,100	0,095
	0,050	0,060	0,050	0,095	0,095	0,110	0,120	0,100	0,095

<sup>х</sup> - среднее арифметическое значение Кээ 4-х мышей взятых в опыт;

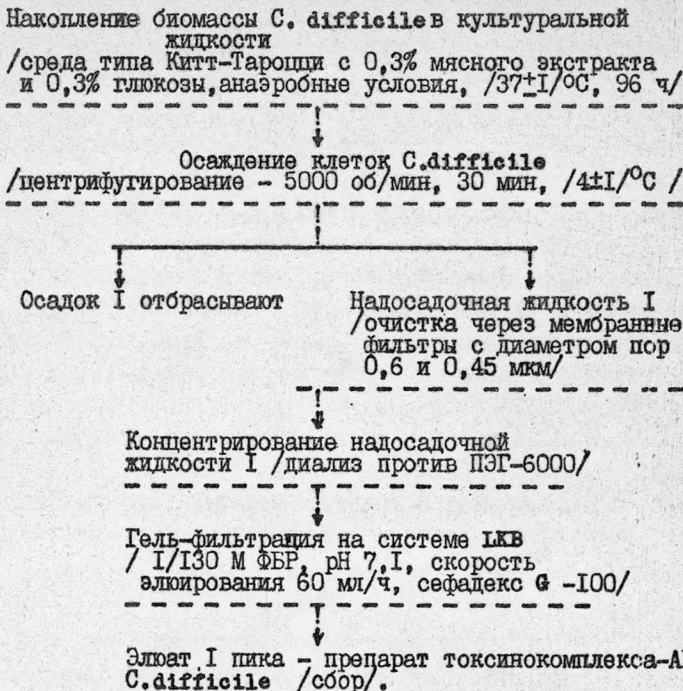
<sup>ж</sup> - все мыши пали через 1,5 часа инкубации.

Анализируя результаты проведенных исследований можно заключить, что токсичность культуры *S. difficile* обусловлена продукцией гетерогенного токсина, представленного двумя фракциями А и В. Использование препаративного метода колоночной хроматографии позволяет выделять этот токсинокомплекс в очищенном виде. Такой препарат обладает выраженной биологической активностью при изучении на модели *in vivo*. Он может быть использован в качестве антигена в серологических реакциях и для иммунизации животных с целью получения антисыворотки.

На основе полученных результатов предложена схема получения препарата токсинокомплекса-АВ *S. difficile* методом хроматографии /схема 2/.

Методы выделения комплекса-АВ с помощью полиэтиленгликоля и колоночной хроматографии просты, надежны и могут быть использованы в специализированных лабораториях.

Схема получения токсинокомплекса-АВ *S. difficile*  
методом хроматографии на сефадексе G -100



С целью получения антисыворотки против токсинокомплекса-АВ *S. difficile* нами была модифицирована схема иммунизации кроликов, внутримышечное введение в область верхней трети каждой голени по 1,0 мл активного материала, смешанного с равным объемом полного адьюванта Фрейнда. Величина титра, если для иммунизации применяли антиген, полученный фракционированием полиэтиленгликолем, составляла 1 : 4, при применении фроматографического метода выделения токсинокомплекса - 1 : 32.

Полученная таким образом антисыворотка может быть использована в реакции нейтрализации *in vivo* и *in vitro* для определения токсичности фильтратов изучаемых штаммов *S. difficile*, а также фильтратов материала от больных ПМК и НЭК. Она может быть использована для постановки серологических реакций: РН, РДП, иммуноэлектрофореза и радиальной иммунодиффузии по Манчини.

Для экспериментального обоснования выбора антибиотиков при лечении заболеваний, обусловленных *S. difficile*, мы методом серийных разведений исследовали чувствительность всех изучаемых нами штаммов к антибиотикам, наиболее часто применяемым в клиниках.

Установлено, что *S. difficile* обладают широким диапазоном чувствительности к антибиотикам. Наиболее сильным бактерицидным действием по отношению к этим возбудителям обладали тетрациклин, ампициллин и мономицин, для которых минимальная ингибирующая концентрация /МИК/ составляла от 0,1 до 2,0 мкг/мл. Наряду с этим выявлена высокая устойчивость штаммов *S. difficile* к стрептомицину /МИК > 128 мкг/мл/. Образование токсина штаммами этих микроорганизмов может происходить и в среде с антибиотиками. Так, например, при концентрации от 0,1 до 0,4 мкг/мл тетрациклина и до 2,0 мкг/мл гентамицина наблюдаются положительные значения Кээ. Особого внимания заслуживает стрептомицин, так как при концентрации этого антибиотика от 16 до 128 мкг/мл в среде культивирования, клетки *S. difficile* не снижали синтез токсина. Величины Кээ при этом были положительными /Кээ > 0,085/.

Для выделения чистой культуры *S. difficile* с плотных питательных сред можно использовать и коммерческие диски с антибиотиками /таблица 3/.

Таблица 3

Распределение штаммов *S. difficile*  
по чувствительности к антибиотикам в дисках

антибиотики	устойчивые		малочувствительные		чувствительные	
	кол-во!	%	кол-во!	%	кол-во!	%
пенициллин	26	78,7	4	12,1	3	9,2
ампициллин	22	66,6	8	24,2	3	9,2
эритромицин	28	84,8	2	6,0	3	9,2
метициллин	21	63,6	6	18,2	6	18,2
олеандомицин	20	60,6	6	18,2	7	21,2
мономицин	14	42,4	7	21,2	12	36,4
оксациллин	19	57,6	3	9,2	11	33,2
левомицетин	14	42,4	4	12,1	15	45,5
тетрациклин	23	69,7	6	18,2	4	12,1
линкомицин	30	90,9	1	3,0	2	6,1

Размеры зон задержки роста культуры на плотных питательных

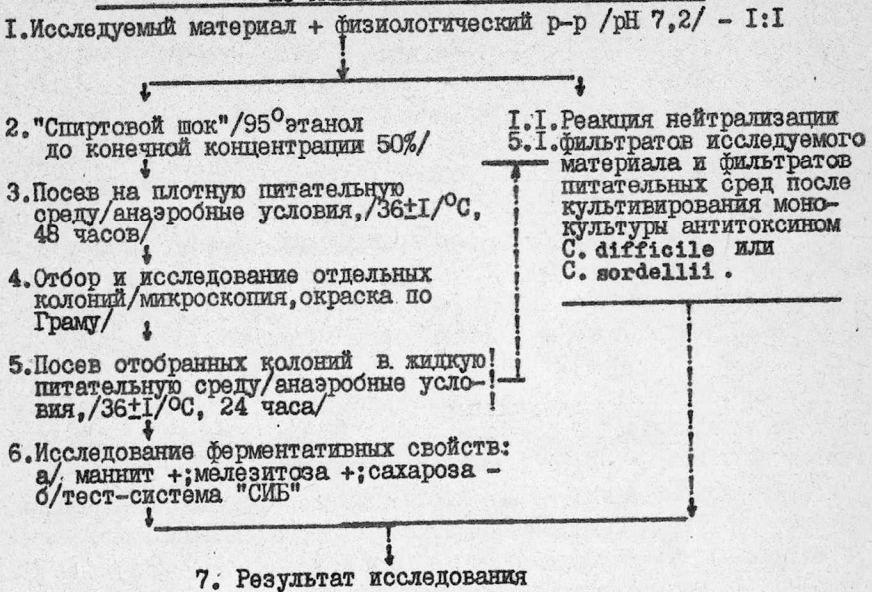
средах зависели от степени чувствительности возбудителя к данному антибиотику и оценивались по общепринятой методике. Полученные результаты свидетельствуют о том, что 90,9 %/30 штаммов/ были устойчивы к линкомицину /15 мкг/, 84,8 % /28/ к эритромицину /15 мкг/ и 78,7 % /26/ к пенициллину /10 ЕД/. Для идентификации *S. difficile* на плотных питательных средах приемлемо добавление линкомицина и эритромицина, которые подавляют рост сопутствующей микрофлоры. Поэтому в зоне действия дисков с этими антибиотиками следует проводить поиск и изучение колоний *S. difficile*.

На основании изучения морфологических, культуральных, биохимических свойств и способности к токсинообразованию нами предложена схема выделения и идентификации *S. difficile*, примененная для обнаружения этого микроорганизма в материалах от больных /схема 3/.

206 образцов стула были получены от 103 детей, находящихся в детской клинической больнице № 1 г. Москвы. Образцы брали от детей всех возрастов, страдающих проявлениями диареи, колитом, дисбактериозом, развившимися после усиленной антибиотикотерапии, а также колитами невыясненной этиологии. Нам удалось выделить *S. difficile* из четырех образцов. При микроскопии обнаружены полиморфные грамположительные палочки. Все выделенные штаммы разлагали маннит, мелезитозу с образованием кислоты, газа и были инертны в отношении сахарозы. При исследовании фильтратов выделенных культур *in vivo* было установлено, что величина положительного Кээ была в пределах  $0,096 \pm 0,004$ . Антитоксическая сыворотка *S. difficile* полностью нейтрализовала энтеротоксическое действие полученных фильтратов культур в жидкой питательной среде.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что широко используемые в педиатрической практике антибиотики способствуют быстрому размножению *S. difficile*, выделяющим токсины с высокой активностью. Поэтому при исследовании образцов стула от детей необходимо направленно вести поиски этого микроорганизма и проводить терапию с учетом чувствительности возбудителя к конкретному антибиотику.

Схема выделения и идентификации *C. difficile*  
из клинического материала



С целью разработки и усовершенствования методов индикации и идентификации возбудителя ПМК - *C. difficile* и его экзотоксинов нами изучены морфологические, биохимические, биологические свойства этих микроорганизмов по сравнению с референс-штаммами. Определены тесты, обеспечивающие четкую дифференциацию *C. difficile* от других видов клостридий. Усовершенствованы методы индикации возбудителя ПМК, позволяющие установить специфичность токсинокомплекса-АВ *C. difficile* в патологическом материале и в среде культивирования. Разработаны методы препаративного выделения токсинокомплекса-АВ с целью изучения его физико-химических, энтеротоксических и цитотоксических свойств. Предложена схема выделения и идентификации *C. difficile* при диареях детей и взрослых.

#### ВЫВОДЫ

1. При сравнительной оценке результатов изучения *C. difficile* на системах индикаторной бумажной /"СИБ"/, импортной системе мультитестов "API-20A" и средах Гисса показано, что отличитель-



ной особенностью *C. difficile* является ее способность разлагать маннит и мелезитозу и не сбраживать сахарозу, что позволяет отличить эти микроорганизмы от других видов клостридий.

Для индикации *C. difficile* считаем возможным рекомендовать использование указанной триады углеводов.

2. Определение энтеротоксической активности фильтрата культуры *C. difficile* на среде культивирования *in vivo* /новорожденные белые мыши/ и расчет величины коэффициента энтеротоксического эффекта /Кэз/ позволяет проводить индикацию как токсинов, так и культуры *C. difficile*.
3. Предлагаемая нами модель — перевиваемые культуры клеток FL 4647, Л-41, ДКЧ позволяет определять цитотоксическое действие /ЦТД/ токсинокомплекса-АВ *C. difficile* в предельно малых концентрациях, содержащихся в фильтрах.
4. В связи с тем, что *C. difficile* обладает высокой устойчивостью к ряду антибиотиков и при этом сохраняет способность к токсинообразованию, целесообразно вносить в питательные среды МИК антибиотиков для подавления сопутствующей микрофлоры при исследовании клинического материала от больных ПМК и НЭК.
5. Разработаны и предложены методы препаративного выделения токсинокомплекса-АВ *C. difficile* путем осаждения полиэтиленгликолем. Такой препарат токсинокомплекса может быть использован в качестве антигена для получения антитоксических сывороток, применяемых в серологических реакциях.  
Использование препаративной колоночной хроматографии позволяет выделить токсинокомплекс в очищенном и нативном виде, что делает его пригодным для изучения токсических и физико-химических свойств.
6. Предложена модифицированная схема иммунизации кроликов анатоксином для получения высокоактивной и специфичной сыворотки, которая обеспечивает проведение реакции нейтрализации *in vivo* и *in vitro*.
7. На основе результатов исследования предложена схема выделения *C. difficile*, которая обеспечивает индикацию и идентификацию возбудителя ПМК и НЭК.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Третьяков В.А. Бактериологическая диагностика Клостридиум диффициле // Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов. - М., ГИСК: 1984. - С.12-14.
2. Третьяков В.А. Clostridium difficile - как одна из причин энтероколитов у человека // Журн.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. - 1986. - № 7. - С.102-104.
3. Третьяков В.А., Быченко Б.Д. Метод биохимической индикации Клостридиум диффициле // Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов. - М., ГИСК: 1986. - С.16-18.
4. Сопоставление значимости биохимических тест-систем при идентификации анаэробных микроорганизмов / Л.Ф.Шимчук, В.А.Третьяков, Д.С.Курдина, К.Я.Соколова // Новое в практике лабораторных исследований. - Горький: 1987. - С.94-99.
5. Определение биологической активности токсинов Clostridium difficile в экспериментах ин vivo и ин vitro / В.А.Третьяков, Г.П.Червонская, З.М.Андреева и др. // Журн.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. - 1987. - № 6. - С.11-15.
6. Караваев Б.Е., Титова Е.Г., Третьяков В.А. Выделение и очистка токсина C. difficile из культуральной жидкости // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов. - М., ВИНКИ: 1987. - С.74-75.
7. К вопросу о сохраняемости основных биологических свойств лиофилизированных музейных культур рода Clostridium / О.П.Калдунова, В.А.Третьяков, Б.Д.Быченко и др. // Журн.лаб.дело. - 1988. - № 1. - С.56-60.
8. Червонская Г.П., Третьяков В.А., Миронова Л.Л. Сравнительная характеристика морфологических изменений, вызванных цитотоксическим действием фильтрата Clostridium difficile штамма В в культурах клеток // Журн.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. - 1988. - № 7. - С.3-6.

*В.А.Третьяков*

Тематический план 1988 г., № 399

Подписано в печать 12.12.88 г. Л-67829. Формат 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Ротапринтная  
печать. Усл. печ. л. 1,0. Усл. кр.-отт. 1,25. Уч.-изд. л. 0,96. Тираж 100 экз.  
Заказ 1510. Бесплатно.

Издательство Университета дружбы народов  
117923, ГСП-1, Москва, ул. Орджоникидзе, 3

---

Типография Издательства УДН.  
117923, ГСП-1, Москва, ул. Орджоникидзе, 3

607



2014286688