

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ВЕДУЩЕЕ ВЫСШЕЕ УЧЕБНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИ-
ТЕТ»

УДК 616.981.5+576.8-095.23

Лебедкова Наталия Валерьевна

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ
CLOSTRIDIUM DIFFICILE И РАЗРАБОТКА СИСТЕМ
ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СТРОГИХ АНАЭРОБОВ**

03.00.07 - микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Минск 2003

Работа выполнена в Государственном учреждении «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь

Научный руководитель: член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, доктор медицинских наук, профессор Л. П. Титов, Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, директор

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор А. А. Адарченко, Белорусский государственный медицинский университет, главный научный сотрудник лаборатории внутрибольничных инфекций Центральной научно-исследовательской лаборатории

доктор медицинских наук, профессор И. И. Генералов, Витебский государственный медицинский университет ордена Дружбы народов, заведующий кафедрой клинической микробиологии

Оппонирующая организация:

Гродненский государственный медицинский университет

Защита состоится «7» октября 2003 г. в 15 ч. на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.05 при Белорусском государственном медицинском университете по адресу: 220116, г. Минск, пр. Дзержинского, 83, тел. 272-55-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Белорусского государственного медицинского университета.

Автореферат разослан «___» сентября 2003 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
доктор медицинских наук,
профессор

Г. Н. Чистенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации

Несмотря на то, что *Clostridium difficile* был выделен в 1935 г. как представитель нормальной микрофлоры кишечника новорожденных, а псевдомембранозный колит (ПМК) описан еще в 1893 г., этиологическая роль данного микроорганизма в возникновении дисфункций желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) была установлена только в 70-е годы. Применение антибиотиков является провоцирующим фактором развития указанных инфекционных процессов, что отразилось в их названиях: «антибиотико-ассоциированные диареи», «колиты» и «ПМК» [Bartlett J. G. e. a., 1994].

C. difficile имеет убикивитарное распространение, являясь постоянным обитателем кишечника различных видов как домашних, так и диких животных, а в ряде случаев обнаруживается в испражнениях взрослых здоровых людей с высоким уровнем носительства у детей первого года жизни - 30-90% [Малов В. А. и др. 1999]. Учитывая биологическую особенность возбудителя, а именно, способность к переходу в споровую форму, длительно сохраняющуюся на объектах внешней среды [Ward P. B. e. a., 1997], *C. difficile* представляет особую проблему для медицинских учреждений, обуславливая возникновение внутрибольничных инфекций в отделениях различного профиля [Hutin Y. e. a., 1997; Miller J. M. e. a., 1998; Nath S. K. e. a., 1994; Silva J., 1994; Wilson K. H. e. a., 1993].

Данное направление исследований является новым для Республики Беларусь. Научный интерес и практическую значимость представляет изучение закономерностей циркуляции *C. difficile* в популяции человека и молекулярно-биологических свойств полученных изолятов, а также разработка методов и средств диагностики.

Связь работы с крупными научными программами, темами

Работа выполнялась в рамках государственных научно-технических программ:

1. «Создать национальную коллекцию вирусов и бактерий, патогенных для человека» (№ госрегистрации 1996468, 1994-1996 гг.).
2. «Разработать газогенерирующую систему для анаэробного культивирования микроорганизмов и изучить биологическую характеристику анаэробных бактерий (*C. difficile*), выделенных из клинического материала» (№ госрегистрации 19971365, 3 кв. 1996-1997 гг.).
3. «Разработать газогенераторные системы для культивирования анаэробных микроорганизмов» (№ госрегистрации 19983418, 1998-2000 гг.).

4. «Разработать питательные среды для культивирования строгих анаэробов и капнофилов, среду для определения чувствительности к антибактериальным препаратам» (№ государственной регистрации 20012330, 2001-2002 гг.).

Цель и задачи исследования

Цель исследования - разработать методологию проведения микробиологической диагностики и мониторинга анаэробных инфекций, обусловленных *C. difficile* в Республике Беларусь.

В соответствии с поставленной целью в **задачи исследования** входило:

1. Исследовать частоту выделения *C. difficile* от лиц, обследующихся на дисбактериоз кишечника и пациентов с характерной для *C. difficile*-ассоциированных инфекций симптоматикой, обусловленной предшествующей антимикробной терапией.
2. Изучить частоту выделения данного микроорганизма с объектов внешней среды в отделениях различного профиля клинических больниц г. Минска.
3. Определить морфологические и культуральные свойства полученных изолятов, оценить их токсигенность на гено- и фенотипическом уровнях, провести генотипирование *C. difficile*.
4. Оптимизировать методические подходы к получению иммунных биологических жидкостей к главному фактору патогенности *C. difficile* – токсинокомплексу, как основы для создания отечественных диагностических тест-систем.
5. Разработать различные по принципам функционирования газогенерирующие системы для создания анаэробной атмосферы, предназначенные для использования как в анаэроостатах, так и в газонепроницаемых полиэтиленовых пакетах.

Объект и предмет исследования

1. Пациенты, подвергшиеся обследованию с целью выделения *C. difficile*.
2. Объекты внешней среды в отделениях различного профиля клинических больниц г. Минска.
3. Изоляты *C. difficile*.
4. Лабораторные животные.

Гипотеза

Циркуляция *C. difficile* имеет место на территории Республики Беларусь. У пациентов с нарушениями в составе кишечного микробиоценоза, чаще всего вследствие антимикробной терапии, токсигенные изоляты указанного микроорганизма могут быть причиной формирования инфекционного процесса. Популяция *C. difficile*, циркулирующая в различных биотопах, помимо присущих данному виду типичных биологических свойств, характеризуется вариабельностью генетической структуры.

Методология и методы исследования

1. Микроскопический метод.
2. Бактериологический метод.
3. Молекулярно-биологический метод:
полимеразная цепная реакция (ПЦР), генотипирование с использованием арбитражного праймера.
4. Серологический метод: реакции нейтрализации в культуре клеток, на животных; иммуноферментный анализ (ИФА).
5. Метод определения токсинопродукции в культуре клеток.
6. Биологический метод (получение иммунных биологических жидкостей).
7. Физико-химические методы.
8. Методы вариационной статистики с использованием компьютерных программ «Statistica 5.5», «Origin 5.0.».

Научная новизна и значимость полученных результатов

Впервые установлена циркуляция *S. difficile* на территории Республики Беларусь с выделением этого патогена с объектов внешней среды клинических больниц г. Минска и от пациентов.

Выявлены отделения с наибольшей частотой обнаружения на объектах внешней среды *S. difficile*, госпитализация в которые может быть расценена как фактор риска развития инфекций, ассоциированных с данным микроорганизмом. Это отделения интенсивной терапии и реанимации (ОИТР).

Установлены объекты больничной среды, контаминированные *S. difficile*, которые являются потенциальными факторами передачи данного патогена: подкладные судна, пол, стены, тумбочки, умывальники, другие санитарно-технические устройства, уборочный инвентарь.

Впервые изучена токсигенность изолятов *S. difficile*, выделенных в республике как на геномном (локус патогенности), так и на фенотипическом уровнях, с количественным определением токсинопродукции в культуре клеток. Установлено, что практически все изоляты содержат *tox* гены А и В, экспрессия которых проявляется средними уровнями токсинопродукции в культуре клеток – от 10^3 до 10^4 ЦТЕ в 1 мл.

Впервые получены данные о генетической гетерогенности изолятов *S. difficile*, выделенных в республике. Выявлено семь геногрупп с доминированием в структуре двух генотипов - I и IV.

Практическая значимость полученных результатов

Получены как прямые, так и косвенные доказательства наличия *S. difficile*-ассоциированных заболеваний в Республике Беларусь, что свидетельствует о целесообразности проведения микробиологического мониторинга указанных инфекций на изучаемой территории.

Оптимизирована схема выделения и идентификации *C. difficile* из клинического материала и на ее основе получены изоляты данного микроорганизма. Основываясь на клинических данных и результатах бактериологических исследований, были поставлены диагнозы: «ПМК, обусловленный *C. difficile*», «антибиотико-ассоциированный колит, обусловленный *C. difficile*», и назначена этиотропная терапия.

Оптимизированы методические подходы получения иммунных биологических жидкостей к главному фактору патогенности *C. difficile* - токсинокомплексу, что послужит основой создания отечественных иммунобиологических диагностикумов для выявления данной инфекции.

Разработана и зарегистрирована 27.03.02 г. № 12-02/25 в Белорусском Государственном институте стандартизации и сертификации каталитическая газогенерирующая система для создания анаэробной атмосферы «Анаэропак H_2+CO_2 », предназначенная для использования в анаэростатах с целью культивирования строгих анаэробов.

Разработан опытный образец бескатализаторной газогенерирующей системы для создания анаэробной атмосферы, предназначенный для использования в газонепроницаемых полиэтиленовых пакетах, что будет способствовать более широкому внедрению способов диагностики анаэробных инфекций в республике.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. *C. difficile* циркулируют в отделениях различного профиля клинических больниц г. Минска. Наиболее часто указанный микроорганизм обнаруживается в отделениях интенсивной терапии и реанимации. *C. difficile* выделяется от больных людей, является этиологическим агентом инфекционного процесса, характеризующегося общими закономерностями развития и течения, присущими этому патогену.
2. *C. difficile*, циркулирующие на территории Республики Беларусь, характеризуются типичными для данного микроорганизма морфологическими, культуральными свойствами и относятся к токсигенным вариантам этого вида. Экспрессия токсигенного генотипа (локус патогенности) *in vitro* проявляется средними уровнями токсинопродукции с развитием типичных для указанного микроорганизма морфо-дегенеративных и цитотоксических изменений в культуре клеток. Полученные из внешней среды и от больных людей изоляты *C. difficile* характеризуются генетической гетерогенностью с доминированием двух генотипов - I и IV.
3. Токсинокомплекс *C. difficile* в экспериментах *in vivo* и *in vitro* оказывает выраженный летальный и цитотоксический биологические эффекты. При использовании его в качестве антигена получены иммунные биологические жидкости, обладающие специфической антитоксической активно-

стью. Альтернативу поликлональным кроличьим антитоксическим сывороткам могут составить мышинные иммунные асцитические жидкости.

4. Газогенерирующие системы, обеспечивающие создание условий для культивирования анаэробных микроорганизмов с применением химических соединений, являются альтернативой вакуумзаместительному методу. Разработанные системы соответствуют своему назначению и по химическим и эксплуатационным характеристикам приближаются к лучшим зарубежным аналогам.

Личный вклад соискателя

Проведение экспериментальных исследований по выделению *C. difficile* с объектов внешней среды клинических больниц г. Минска и от пациентов с изучением их морфологических, культуральных, молекулярно-биологических и цитотоксических свойств, статистическая обработка, теоретическое обобщение результатов и оформление диссертационной работы выполнены лично автором на базе лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии.

Апробация результатов диссертации

Основные результаты исследований доложены и обсуждены на:

1. Международной конференции «Молекулярная генетика и биотехнология», г. Минск, 6-8 апреля 1998 г.
2. 1-ой Итоговой научно-практической конференции «Современные проблемы инфекционной патологии человека» (эпидемиология, клиника, микробиология, вирусология и иммунология), г. Минск, 8-9 апреля 1998 г.
3. Международной научно-практической конференции «Проблемы патологии, санитарии и бесплодия в животноводстве», п. Ратомка Минского района, 17-18 декабря 1998 г.
4. Республиканском научно-практическом семинаре «Актуальные вопросы диагностики, клиники, лечения и профилактики ВБИ» п. Лесное, Минская область, 25 февраля 1999 г.
5. Заседании Минского городского научного медицинского общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов, г. Минск, 4 ноября 1999 г.
6. Научно-практической конференции «Инфекция и иммунитет», г. Минск, 9-10 декабря 1999 г.
7. Научно-практическом семинаре «Современные методы лабораторной диагностики вирусных и бактериальных инфекций», г. Минск, 18-21 апреля 2000 г.
8. VIII Международном симпозиуме «Актуальные вопросы детской онкологии и гематологии», Минск, 27-29 апреля 2000 г.
9. Международном научно-практическом семинаре «Актуальные проблемы инфекционной патологии», г. Минск, 22 мая 2000 г.

10. 2-ой Итоговой научно-практической конференции НИИЭМ «Современные проблемы инфекционной патологии человека» (вирусология, микробиология, иммунология, эпидемиология и клиника), г. Минск, 18 января 2001 г.
11. Семинаре «Лабораторная диагностика гнойно-воспалительных заболеваний, обусловленных анаэробными микроорганизмами», Минск, 28 июня 2001 г.
12. 1-ом FEMS конгрессе европейских микробиологов, Словения, Любляна, 29 июня – 3 июля 2003 г.

Опубликованность результатов

Основные положения диссертации опубликованы в 11 научных работах, в том числе в рецензируемых изданиях – 3 статьи и 1 тезисы, в сборниках материалов съездов и конференций – 4 статьи и 3 тезисов, в том числе в иностранных изданиях – 1 статья и 1 тезисы. Суммарно основные результаты диссертации опубликованы на 52 страницах.

Структура диссертации

Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста, иллюстрирована 26 таблицами и 36 рисунками, состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка использованных источников, включающего 33 отечественных и 180 иностранных источников и приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования являлись пробы испражнений, полученные от госпитализированных пациентов с дисфункциями ЖКТ в виде диареи, послабления стула, возникшими на фоне приема антибиотиков или при наличии в анамнезе у этой категории больных антимикробной терапии (n=77); подозрительные на *C. difficile* колонии черного цвета с явлениями газообразования, образующиеся на среде Вильсона-Блера после посева проб стула от лиц, обследовавшихся на дисбактериоз кишечника (n=504).

Предметом исследований были также объекты внешней среды (n=1700) палат и мест общего пользования отделений терапевтического и хирургического профиля клинических больниц г. Минска.

Материалом для последующих исследований служили 65 изолятов *C. difficile*, полученных с объектов больничной среды и от пациентов.

Выделение *C. difficile* из первичного материала проводили общепринятым бактериологическим методом с использованием как селективных, так и

селективно-дифференциально-диагностических сред [Калиниченко Н. Ф. и др., 1989]. Селективными компонентами являлись D-cycloserine и ceftioxin в количестве 250 мг/л и 8 мг/л соответственно. У выделенных микроорганизмов изучали морфологические и культуральные свойства, что являлось основанием для их первичной идентификации. Указанный методический подход и сейчас относится к «золотому стандарту» лабораторной диагностики *C. difficile*-ассоциированных инфекций [Fedorko D. P. e. a., 1997].

Для выявления генов экзотоксинов А и В *C. difficile* применяли полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием набора праймеров YТ-28 и YТ-29 и YТ-17 и YТ-18 соответственно [Gumerlock P. H. e. a., 1993; Silva J. e. a., 1994; Tang Y.J. e. a., 1994]. Вышеуказанным методом был изучен локус патогенности, включающий помимо основных генов - *tcdA* и *tcdB* три вспомогательных гена - *tcdC*, *tcdD*, *tcdE*. Генотипирование изолятов *C. difficile* проводили с использованием арбитражного праймера в полимеразной цепной реакции [Titov L. e. a., 2000]. Молекулярно-генетическое типирование и изучение локуса патогенности части изолятов выполнено совместно с профессором Д. Сильвой в лаборатории бактериологии кафедры инфекционных болезней Калифорнийского университета в рамках международного сотрудничества.

Для выявления экспрессии токсигенного генотипа изолятов осуществляли исследование в культуре клеток с количественным определением уровней токсинопродукции. В качестве питательной среды для культивирования микроорганизмов с целью накопления токсинокомплекса использовали сердечно-мозговой бульон («Diagnostics Pasteur», Франция). Эксперимент проводили на перевиваемой клеточной линии BGM (почка африканской зеленой мартышки), полученной из банка культур клеток Института цитологии Российской Академии Наук. Степень цитопатического действия (ЦПД) оценивали по проценту погибших клеток в монослое по четырехплюсовой системе [Третьяков В. А. и др., 1987]. За 1 цитотоксическую единицу (ЦТЕ) принимали максимальное разведение образцов надосадочных жидкостей, при котором наблюдалась гибель 50% и более клеточного пласта.

При проведении иммунизации в качестве продуцента токсинокомплекса во всех экспериментах использовали высокотоксигенный референс-штамм *C. difficile* VPI 10463. Первая схема предполагала очистку токсинокомплекса от низкомолекулярных, балластных белков. Вначале его осаждали сульфатом аммония до 40% насыщения, а затем проводили гель-фильтрацию с применением сефадекса G-200. Концентрацию белка определяли по методу Лоури. Анатоксин получали по щадящей методике, согласно которой использовали формальдегид в конечной концентрации 0,4%, но материал предварительно обрабатывали 1% раствором лизина для его стабилизации [Королева В. М., 1992]. В обеих схемах анатоксин смешивали с адьювантом (эмульсиген производства США) в соотношении 1:2 соответственно. Антиген в концентрации

500 мкг белка на 1 инъекцию вводили внутримышечно кроликам породы Шиншилла массой ≈ 3 кг. Полный цикл иммунизации состоял из 11 инъекций с интервалом 7 дней. Во второй схеме иммунизацию проводили нативным токсинокомплексом в нарастающих дозах введения антигенного материала, начиная с 5 мл (37 мг белка) и заканчивая 20 мл (147 мг белка). Схема иммунизации состояла из пяти инъекций с интервалом 7 дней.

Иммунные асцитические жидкости получали на безлинейных белых мышцах весом 20-25 г. Анатоксин готовили по схеме изложенной выше. При проведении внутримышечных и подкожных инъекций использовали указанный адьювант, который смешивали с материалом в соотношении 1:2 соответственно. Апробированы три схемы иммунизации, основным отличием которых был способ введения антигена. Все схемы состояли из 7 инъекций с интервалом 7 дней, а между первым и вторым введением материала был сделан 10 дневный перерыв. В первой схеме животных иммунизировали внутрибрюшинно анатоксином с постепенным увеличением дозы (от 0,5 мл до 4 мл). Во второй схеме дополнительно подкожно вводили анатоксин вместе с адьювантом в объеме 1 мл на протяжении всего цикла иммунизации. В третьей схеме инъекции проводили внутримышечно анатоксином вместе с адьювантом в объеме 1 мл. Специфическую активность иммунных биологических жидкостей оценивали тремя методами (нейтрализацией ЦПД в культуре клеток и летальной активности на лабораторных животных, а также иммуноферментным анализом). За 1 антицитотоксическую единицу (АЦТЕ) принимали конечное разведение исследуемых биологических жидкостей, которое обеспечивало как минимум 50% защиту от цитопатического действия антигена взятого в дозе 100 ЦТЕ₅₀. За 1 антитоксическую единицу (АЕ) принимали максимальное разведение исследуемых биологических жидкостей, которое нейтрализовало действие антигена в дозе 100 D_{1m}. Эксперименты по иммунизации выполнены совместно с сотрудниками РНИУП «Института экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского Национальной академии наук Беларуси».

Одной из задач исследования являлась разработка различных по принципам функционирования газогенерирующих систем для создания анаэробной атмосферы, адекватной для культивирования указанной группы микроорганизмов. Состав газовой среды анализировали газохроматографическим методом на газовом хроматографе «Хром-5», оборудованном детектором по теплопроводности. Сравнительный анализ эксплуатационных характеристик, разработанных опытных и контрольных систем с использованием референтных штаммов строгих анаэробов (*C. difficile* VPI 10463, ATCC 9689, «Vorgiello»; *B. ovatus* ATCC 8483), проводили бактериологическим методом. Данный раздел выполнен совместно с сотрудниками лаборатории химии конденсированных сред НИИ физико-химических проблем Белгосуниверситета.

Статистическая обработка данных проведена с использованием компьютерных программ «Statistica 5.5», «Origin 5.0.».

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

*Биологическая характеристика изолятов *C. difficile*, полученных с объектов больничной среды и от пациентов*

При обследовании 1700 объектов в отделениях различного профиля клинических больниц г. Минска *C. difficile* выделены из 42 объектов ($2,5 \pm 0,4\%$). Преимущественная изоляция этого микроорганизма отмечалась в отделениях интенсивной терапии и реанимации, где показатель частоты его обнаружения на объектах больничной среды составил $5,7 \pm 0,9\%$ ($n=700$). По одному изоляту было получено из отделений гематологии и общей хирургии, а частота выделения составила $0,3 \pm 0,3\%$ ($n=350$) и $0,2 \pm 0,2\%$ ($n=650$) для отделений терапевтического (исключая ОИТР) и хирургического профиля соответственно.

При анализе частоты изоляции *C. difficile* с отдельных объектов внешней среды стационаров г. Минска было установлено, что с наибольшей частотой ($22,1 \pm 4,7\%$) данные микроорганизмы выделялись с подкладных суден, прошедших санитарную обработку. Из других объектов, таких как стены, уборочный инвентарь, тумбочки, умывальники, другие санитарно-технические устройства, пол, *C. difficile* изолировались в небольшом проценте случаев ($1,7-3,1\%$). Один изолят этого патогена был получен из смыва с телефона, находившегося на посту медицинской сестры.

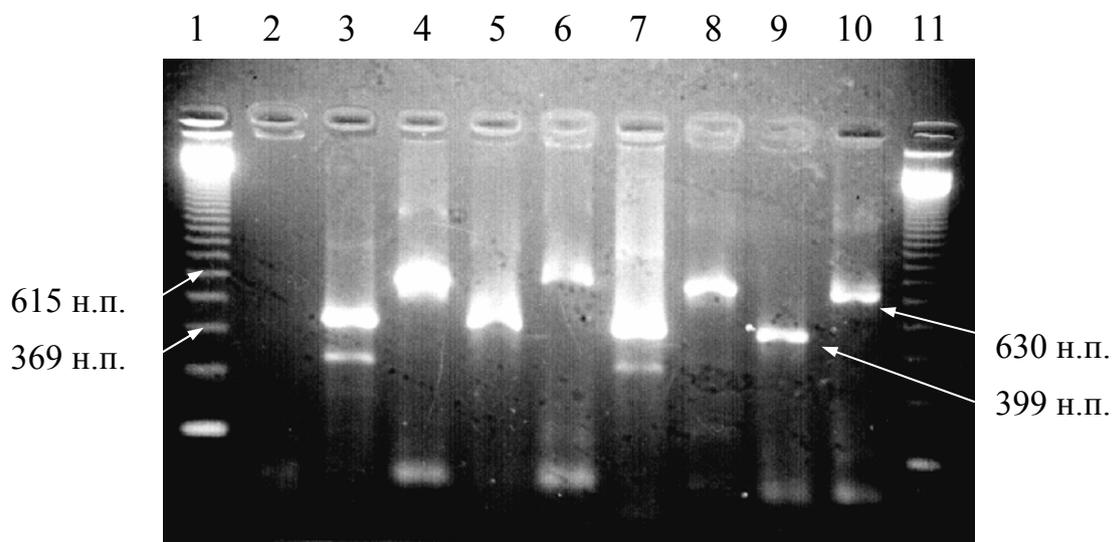
От лиц, подвергшихся обследованию на дисбактериоз кишечника, было получено 8 изолятов *C. difficile*. Низкая частота выделения $1,6 \pm 0,6\%$ этого патогена в данном случае может быть обусловлена спецификой контингента пациентов ($n=504$).

При бактериологическом обследовании пациентов, имеющих клиническую симптоматику типичную для *C. difficile*-ассоциированных инфекций и ее связь с предшествующей антимикробной терапией ($n=77$), частота выделения этого патогена составила $19,5 \pm 4,5\%$. Четырем больным на основании клинических наблюдений и результатов бактериологического исследования был поставлен диагноз ПМК. У всех лиц, колонизированных данным патогеном, наблюдалась диарея различной степени выраженности, а у двоих пациентов стул был до 15-20 раз в сутки. Связь вышеуказанных симптомов с антибактериальной терапией прослеживалась практически у всех больных. Препараты, возможно причастные к возникновению вышеуказанных дисфункций кишечника, были различны. Чаще других антибиотиков использовали линкомицин и левомицетин, причем у 8 пациентов это была комбинированная терапия. Больным, колонизированным *C. difficile*, с учетом результатов бактериологических исследований, назначался метронидазол, а при тя-

желом клиническом течении проводилось комбинированное лечение ванкомицином и метронидазолом в общепринятых дозах.

Молекулярно-биологическая характеристика изолятов *C. difficile*

Все изоляты, предварительно идентифицированные по результатам изучения морфологических и культуральных свойств как *C. difficile*, проходили тестирование методом ПЦР с целью обнаружения у них фрагментов генов экзотоксинов А и В. Исследовано 65 изолятов, 23 из которых были получены при обследовании пациентов. Все микроорганизмы, выделенные с объектов внешней среды (n=42), несли в своем геноме фрагменты обоих *tox* генов А и В *C. difficile*, что представлено на рис. 1. У изолятов были выявлены две специфические полосы на расстоянии, соответствующем пробегу фрагментов ДНК, равных 630 н.п. и 399 н.п., что характерно для *tox* генов А и В соответственно.



Условные обозначения:

Дорожки 1 и 11: маркер – «лестница» 123 н.п.

Дорожка 2: контроль системы (проба с деионизированной водой).

Дорожки 3-8: изоляты, полученные с объектов внешней среды.

Дорожки 3, 5, 7: амплифицированные фрагменты ДНК области гена В.

Дорожки 4, 6, 8: амплифицированные фрагменты ДНК области гена А.

Дорожки 9, 10: положительный контроль - референтный штамм *C. difficile* VPI 10463; где дорожка 9: фрагмент ДНК области гена В, а дорожка 10: фрагмент ДНК области гена А.

Рис. 1 Электрофоретический анализ в 2% агарозном геле продуктов ПЦР фрагментов *tox* генов А и В *C. difficile*

В геноме большинства *C. difficile*, выделенных от пациентов (за исключением одного), также как и у изолятов с объектов внешней среды, обнаруживали фрагменты обоих *tox* генов А и В. Изучение локуса патогенности 32 микроорганизмов показало наличие у всех исследованных бактерий трех дополнительных генов - *tcdC*, *tcdD*, *tcdE*, которые вместе с основными генами - *tcdA* и *tcdB* участвуют в его формировании.

Генотипирование 47 изолятов *C. difficile*, полученных с объектов внешней среды клинических больниц г. Минска и от пациентов, выявило наличие семи генотипов. Несмотря на их кажущееся разнообразие, большинство микроорганизмов было отнесено к двум из них, а именно, к I и IV, на долю которых суммарно приходилось 78,7%. Доминирующим был I генотип, занимающий в структуре 53,2±7,3%. Выявлены определенные генотипы бактерий, выделяющиеся только от пациентов (III) или только с объектов больницы (IV, V, VI, VII).

Оценка токсигенности C. difficile в культуре клеток

Для выявления экспрессии токсигенного генотипа микроорганизмов проводили исследование в культуре клеток с количественным определением уровней токсинопродукции. В эксперименте использовали перевиваемую клеточную линию VGM, рис. 2. Результаты исследования в культуре клеток находились в соответствии с ранее проведенным тестированием токсигенности бактерий на генетическом уровне. Все *tox*-позитивные *C. difficile* проявили цитотоксическую активность в культуре клеток с уровнями токсинопродукции от 10^3 до 10^4 ЦТЕ в 1 мл. У высокотоксигенного референс-штамма *C. difficile* VPI 10463 указанный показатель составил 10^6 ЦТЕ₅₀ в 1 мл. Характер дегенеративных изменений в культуре клеток был типичен для данного патогена. Отмечали нарушение межклеточных связей, утрату характерной морфологии клеток, они округлялись и выглядели в виде «бусин», диффузно разбросанных в поле зрения, рис. 3.

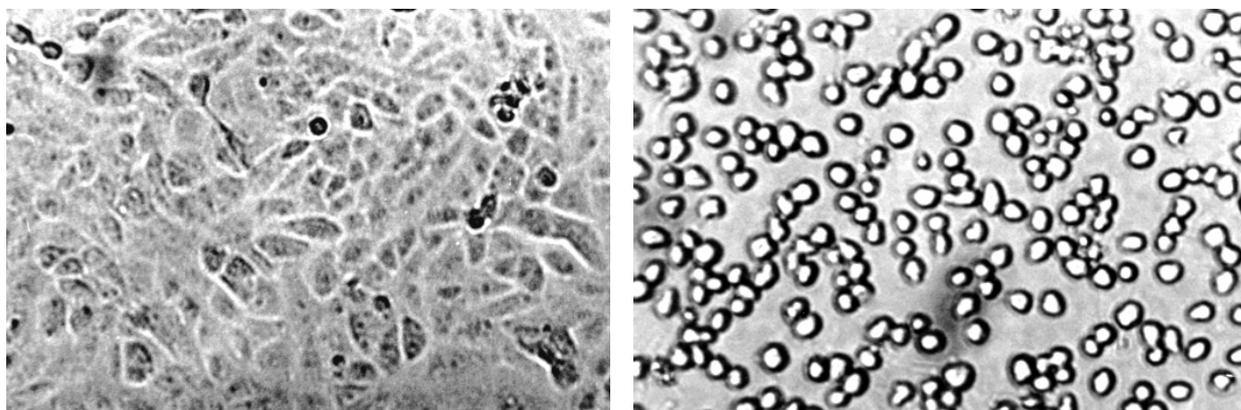


Рис. 2 Культура клеток ВGM (контроль, после 48 ч роста). х 100

Рис. 3 Культура клеток ВGM, подвергшаяся воздействию токсинокомплекса *C. difficile*

Получение диагностических антитоксических иммунобиологических препаратов

Наряду с классическим бактериологическим исследованием для лабораторной верификации диагноза *C. difficile*-ассоциированного заболевания широко применяются серологические методы, основанные на способности токсинов или микробных клеток вступать в реакцию с иммунными специфическими сыворотками. Принимая во внимание то, что главным фактором патогенности данного микроорганизма признаны вырабатываемые им токсины, мы сфокусировали свои исследования на получении антитоксических сывороток. При гель-фильтрации на сефадексе G-200 токсинокомплекс *C. difficile* элюировал в первом пике, объединенная фракция верхушки которого характеризовалась высокой как летальной (12,5 Dlm/100 мкг белка), так и цитотоксической (9756,1 ЦТЕ₅₀/100 мкг белка) активностью, и именно она была использована в качестве антигенного материала. Короткая схема иммунизации, состоящая из 5 инъекций, позволила получить сыворотку с довольно высоким титром антител в ИФА (1:25600), но вместе с тем она характеризовалась невысокой специфической активностью в реакции нейтрализации *in vivo* (3,2 АЕ/мл). Полученная сыворотка специфически взаимодействовала с 25 изолятами *C. difficile* из рабочей коллекции и не давала перекрестных реакций с 18 видами микроорганизмов, персистирующих в желудочно-кишечном тракте людей и животных (*Bacillus macer*, *Bacillus subtilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium perfringens* типы А, С, Е, *Clostridium septicum*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Haemophilus pleuropneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*).

Применение иммунизации с введением антигена в нарастающих дозах позволило получить антитоксическую сыворотку с высокой специфической активностью нейтрализующих антител в летальном (160 АЕ/мл), цитотоксическом (5120 АЦТЕ/мл) тестах и в ИФА (1:12800 титр).

Альтернативу сывороткам могут составить мышинные иммунные асцитические жидкости. Это удобный во многих отношениях подход, который нашел широкое применение при идентификации арбовирусов. Ограничивает использование мышинных сывороток малое количество крови, которое удается получить от этих животных, однако, при индукции асцита устраняется это препятствие [Гайдамович С. Я. и др., 1969; Самойлова Т. И. и др. 1974]. В данной биологической модели определяющим моментом в выработке антител является схема иммунизации, в которой оптимальным образом сочетают-

ся как способ введения антигенного материала, так и кратность инъекций. Результаты нашего эксперимента указывают на преимущества моновакцинации с внутримышечным введением антигенного материала и короткой (5 инъекций) схемы иммунизации, при которой удалось получить асцитические жидкости, обладающие специфической активностью (51,2 АЕ/мл, 320 АЦТЕ/мл, 1:51200 титр в ИФА) при небольшом расходе антигенного материала.

Разработка газогенерирующих систем для культивирования анаэробов

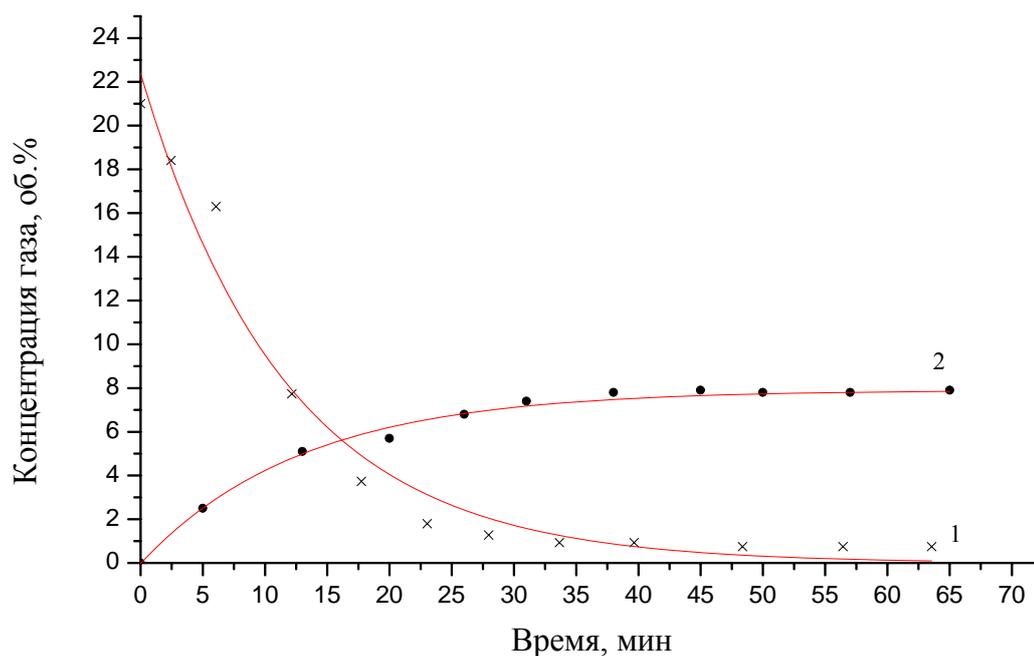
Наиболее чувствительными к составу газовой среды являются бактерии из группы строгих анаэробов. После 20-40 мин экспозиции на воздухе их количество снижается на 30-70%. Для культивирования строгих анаэробных микроорганизмов необходимо быстрое создание атмосферы с уровнем содержания кислорода менее 0,5 об.% [Imhof A., 1996].

При разработке указанных систем были применены два подхода, а именно: каталитический и бескатализаторный. Каталитические газогенерирующие системы предназначены для использования в анаэротатах, так как принцип их функционирования предполагает создание избыточного давления по водороду, окисление которого сопровождается локальным нагревом в области размещения катализатора. Бескатализаторные газогенерирующие системы относятся к разработкам нового поколения, которые могут применяться как в анаэротатах, так и в герметично закрывающихся газонепроницаемых полиэтиленовых пакетах, в которых происходит химическая реакция и культивирование посевов.

Каталитическая газогенерирующая система для создания анаэробной атмосферы - «Анаэропак H_2+CO_2 »

Принцип функционирования систем, предназначенных для культивирования анаэробных микроорганизмов, сводится к поглощению кислорода и обогащению атмосферы углекислым газом, который, в зависимости от вида бактерий, является или незаменимым, или стимулирующим их рост компонентом. При создании анаэробной атмосферы использован двухступенчатый подход. В результате взаимодействия борогидрида натрия и борной кислоты происходит выделение водорода, который в последствии в присутствии палладиевого катализатора окисляется кислородом воздуха, что сопровождается образованием воды. Одновременно с генерированием водорода выделяется углекислый газ в результате обменного взаимодействия гидрокарбоната натрия и лимонной кислоты. Система для создания анаэробной атмосферы «Анаэропак H_2+CO_2 » представляет собой комплект, состоящий из газогенерирующего пакета, катализатора низкотемпературного окисления водорода и индикаторной тест-полоски. На рис. 4 представлена кинетика процессов свя-

зывания кислорода и выделения углекислого газа, происходящих при ис-



пользовании каталитической газогенерирующей системы.

Рис. 4 Кинетические кривые поглощения кислорода (1) и выделения углекислого газа (2) каталитической газогенерирующей системы для создания анаэробной атмосферы - «Анаэропак H₂+CO₂»

Сравнительный анализ, разработанной каталитической газогенерирующей системы и аналогичных фирменных Gas Pak (BBL) систем в рабочих условиях с использованием контрольных штаммов строгих анаэробов, позволил констатировать отсутствие достоверных различий между показателями количества выросших колоний при использовании как опытных, так и контрольных систем.

Бескатализаторная газогенерирующая система для создания анаэробной атмосферы

Действие современных бескатализаторных газогенерирующих систем для культивирования строгих анаэробных микроорганизмов основано на окислении аскорбиновой кислоты или аскорбата натрия. Образующаяся при этом щавелевая кислота взаимодействует с гидрокарбонатом (карбонатом) натрия с выделением углекислого газа. На рис. 5 представлена кинетика процессов связывания кислорода и выделения углекислого газа, происходящих при использовании бескатализаторной газогенерирующей системы.

При оценке количества выросших бактерий в опытных и контрольных системах («Анаэропак H_2+CO_2 ») достоверности различий сравниваемых показателей не было установлено ($P>0,05$).

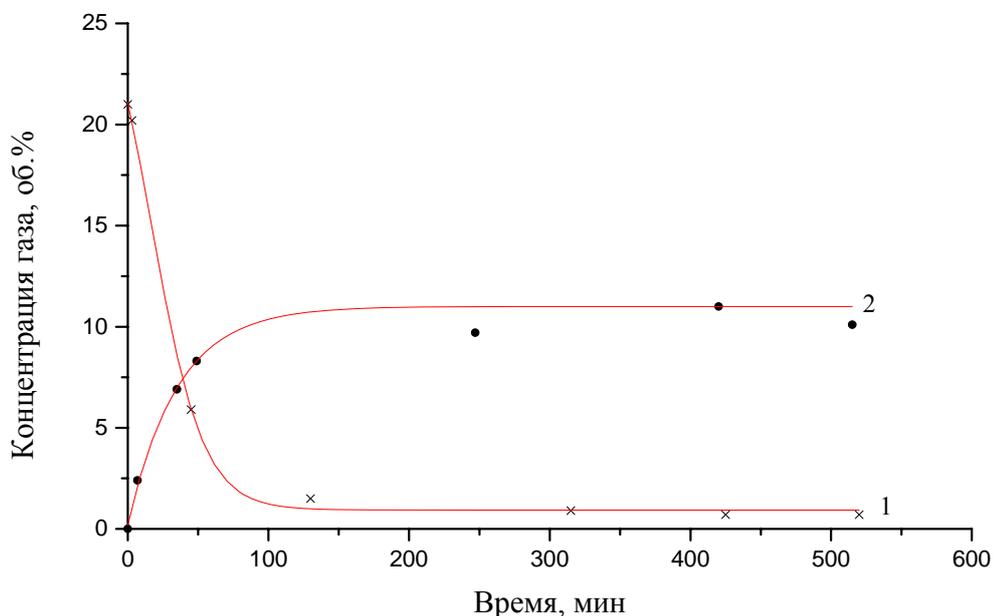


Рис. 5 Кинетические кривые поглощения кислорода (1) и выделения углекислого газа (2) бескатализаторной газогенерирующей системы для создания анаэробной атмосферы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Доказано наличие инфекций, обусловленных *C. difficile*, на территории Республики Беларусь с характерными для них закономерностями. При бактериологическом обследовании лиц, имеющих клиническую симптоматику типичную для *C. difficile*-ассоциированных инфекций и ее связь с предшествующей антибактериальной терапией, частота выделения этого патогена составила $19,5\pm 4,5\%$ [2, 3].

2. Контаминация спорами *C. difficile* объектов внешней среды клинических больниц г. Минска указывает на наличие в стационарах пациентов с заболеваниями, ассоциированными с данным микроорганизмом. Высокий риск развития вышеуказанных инфекций вероятен для отделений интенсивной терапии и реанимации, во внешней среде которых наиболее часто обнаруживали *C. difficile* ($5,7\pm 0,9\%$). Потенциальными факторами передачи этого патогена в стационарах могут являться следующие объекты: подкладные судна ($22,1\pm 4,7\%$), пол ($3,1\pm 1,4\%$), стены ($1,7\pm 0,8\%$), тумбочки ($2,0\pm 1,1\%$), умы-

вальники ($2,2 \pm 1,0\%$), другие санитарно-технические устройства ($3,1 \pm 1,8\%$), уборочный инвентарь ($1,7 \pm 0,8\%$) и др. [4, 5, 10, 11].

3. Абсолютное большинство изолятов, полученных от больных и с объектов внешней среды, относятся к токсигенным представителям вида *C. difficile*, что подтверждено как на молекулярно-биологическом уровне, так и фенотипическими проявлениями генотипа в цитотоксическом тесте в культуре клеток. В локусе патогенности изолятов, кроме основных генов - *tcdA* и *tcdB*, обнаружены три дополнительных гена - *tcdC*, *tcdD*, *tcdE*, участвующие в его формировании. Супернатанты *C. difficile* характеризовались цитотоксической активностью в отношении культуры клеток с типичным для данного микроорганизма ЦПД, в виде эффекта округления клеток. По уровню токсинопродукции изоляты были однородны, и указанный показатель находился в пределах от 10^3 до 10^4 ЦТЕ в 1 мл, что в сравнительном аспекте с референтным высокотоксигенным штаммом *C. difficile* VPI 10463 (10^6 ЦТЕ₅₀ в 1 мл) может быть оценено как средний уровень токсинопродукции [5, 6, 8, 11].

4. Популяция *C. difficile*, циркулирующая на территории республики, характеризуется гетерогенностью генетической структуры. Среди изученных изолятов выявлено семь геногрупп микроорганизмов с доминированием I и IV генотипов, на долю которых суммарно приходилось 78,7%. Отсутствовала четкая связь определенного генотипа с профилем отделения, клиникой или формой патологического процесса. Вместе с тем, выявлены определенные генотипы бактерий, выделяющиеся только от пациентов (III) или только с объектов больничной среды (IV, V, VI, VII) [8, 11].

5. Продуцируемый *C. difficile* токсинокомплекс характеризуется высокой летальной, цитотоксической и иммуногенной активностью. При использовании его в качестве антигена получены кроличьи иммунные антисыворотки и мышинные иммунные асцитические жидкости, обладающие специфической в отношении токсинокомплекса активностью. Данные иммунобиологические препараты могут явиться основой для создания отечественных диагностических тест-систем [1].

6. Разработаны отечественные каталитическая («Анаэропак H_2+CO_2 ») и бескатализаторная газогенерирующие системы, предназначенные для создания анаэробной атмосферы в анаэростате и в рабочих герметично закрывающихся полиэтиленовых пакетах, которые соответствуют предъявляемым для таких устройств требованиям, сопоставимы с лучшими зарубежными аналогами и могут использоваться для культивирования и изучения свойств строгих анаэробных микроорганизмов в бактериологических лабораториях [7, 9].

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Андросик Н. Н., Лысенко А. П., Финогенов А. Ю., Титов Л. П., Лебедкова Н. В. Метод получения диагностической антитоксической сыворотки к токсину А *Clostridium difficile* // Вести Нац. АН Беларуси: Серия аграрных наук.- 2002.- № 4.- С. 53-57.
2. Андросик Н. Н., Титов Л. П., Финогенов А. Ю., Лебедкова Н. В. Случай *Clostridium difficile*-ассоциированных колитов у собак // Материалы междунар. конф. «Роль антропогенных и природных патогенов в формировании инфекционных и неинфекционных болезней человека», Минск, 8-9 окт. 2002 г.- Минск, 2002.- С. 463-464.
3. Лебедкова Н. В., Титов Л. П., Счесленок Е. П., Григорович И. И., Короткина В. Ф., Рогачева Т. А. Частота выделения и определение токсигенности *C. difficile* у больных с дисфункциями желудочно-кишечного тракта // Актуальные вопросы инфекционных болезней: Сб. тр. 2-ой науч.-практ. конф., посвящ. памяти П. Л. Новикова.- Минск, 2001.- С. 54-58.
4. Лебедкова Н. В., Титов Л. П., Счесленок Е. П., Шабанов А. Г., Григорович И. И. Выделение *C. difficile* из объектов внешней среды отделений интенсивной терапии и реанимации клиник г. Минска // Актуальные вопросы детской онкологии и гематологии: Материалы VIII междунар. симпоз.- Минск, 2000.- С. 70-71.
5. Лебедкова Н. В., Титов Л. П., Шабанов А. Г., Григорович И. И., Сильва Д., Танг Я. Молекулярно-биологическая идентификация *Clostridium difficile*, выделенных из объектов больничной среды // Здоровоохранение.-2000.- № 2.- С. 25-27.
6. Счесленок Е. П., Лебедкова Н. В., Григорович И. И., Маринич Л. И., Титов Л. П. Разработка и апробация диагностической тест-системы для идентификации токсигенных штаммов *C. difficile* с использованием полимеразной цепной реакции // Достижения медицинской науки в Беларуси: Рец. науч.-практ. ежегодник.- Минск, 2000.- Вып. 5.- С. 102-103.
7. Титов Л. П., Лебедкова Н. В., Морозова О. М., Лесникович А. И., Воробьева С.А., Левчук С. М., Доронин В. С., Бордович Е. В., Тихомирова Н. А. Газогенерирующие системы для культивирования анаэробных, микроаэрофильных, капнофильных микроорганизмов // Материалы II науч.-практ. конф. по итогам выполнения ГНТП «Инфекционные болезни» 1998-2000 гг., Минск, 18 янв. 2001 г.- Минск: ФилСерв плюс, 2001.- С. 236-252.

8. Титов Л. П., Лебедкова Н. В., Шабанов А. Г., Григорович И. И., Танг Я., Сильва Д., Кохен С. Генотипическая характеристика госпитального патогена - *Clostridium difficile* // Инфекция и иммунитет: Материалы Респ. науч.-практ. конф., посвящ. 75 летию БелНИИЭМ, Минск, 9-10 дек. 1999 г.- Минск, 1999.- С. 233-239.
9. Титов Л. П., Лесникович А. И., Воробьева С. А., Лебедкова Н. В., Мушинский В. В., Гарбаренко В. В. Газогенерирующая система для анаэробного культивирования микроорганизмов в анаэроостате // Современные проблемы инфекционной патологии человека: Ст. и тез. докл. I итог. науч.-практ. конф., Минск, 8-9 апр. 1998 г.- Минск, 1998.- С. 470-474.
10. Titov L., Gorbunov V., Lebedkova N., Blyha K. Hospital strains antibiotics-resistance monitoring system in the Republic of Belarus // 10th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Abstracts book.- Stockholm, Sweden, 28-31 May.- Stockholm, 2000.- Vol. 6, Suppl. 1.- P. 132.
11. Titov L., Lebedkova N., Shabanov A., Tang Y. J., Cohen S. H., Silva J. Isolation and molecular characterization of *Clostridium difficile* strains from patients and the hospital environment in Belarus // J. Clin. Microbiol.- 2000.- Vol. 38, № 3.- P. 1200-1202.

Считаю своим долгом выразить искреннюю благодарность научному руководителю чл.-корр. НАНБ, профессору, д.м.н. Л. П. Титову за руководство, поддержку и помощь при выполнении диссертационной работы; к.м.н. А. С. Петкевичу; к.м.н. Г. В. Владыке; профессору Д. Сильве; к.б.н. А. Г. Шабанову; к.б.н. Е. П. Счесленок; И. И. Григоровичу; к.м.н. О. Т. Андреевой; В. Ф. Короткиной; к.х.н. С. А. Воробьевой; к.в.н. А. Ю. Финогенову; профессору, д.в.н. А. П. Лысенко; к.б.н. Т. И. Самойловой; д.м.н. А. С. Владыко; Л. А. Хватовой; д.м.н. Н. Н. Полещуку; к.б.н. З. Б. Квачевой; Т. А. Абловой; В. С. Доронино; А. М. Марейко; Н. И. Точко за помощь в выполнении отдельных разделов работы; всем сотрудникам лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии за помощь в повседневной работе; сотрудникам бактериологических лабораторий Минской городской инфекционной клинической больницы, Детской инфекционной клинической больницы, 1 Городской клинической больницы, Городского и Дорожного Центров гигиены и эпидемиологии, Главного управления лабораторно-профилактических и санаторно-курортных учреждений г. Минска за оказанное содействие в сборе лабораторного материала.

РЭЗІЮМЭ

Лебядкова Наталля Валер'еўна

БІЯЛАГІЧНАЯ ХАРАКТАРЫСТЫКА ІЗАЛЯТАЎ
CLOSTRIDIUM DIFFICILE І РАСПРАЦОЎКА СІСТЭМ
ДЛЯ КУЛЬТЫВІРАВАННЯ СТРОГІХ АНАЭРОБАЎ

Ключавыя словы: *Clostridium difficile*, таксіны, таксігеннасць, біялагічныя ўласцівасці, генатып, антытаксічныя сывараткі, газагенеруючыя сістэмы.

Аб'ект і прадмет даследвання: пацыенты, абследаваныя з мэтай выдзялення *C. difficile*; аб'екты навакольнага асяроддзя ў аддзяленнях рознага профілю клінічных бальніц г. Мінска; ізаляты *C. difficile*; лабараторныя жывёлы.

Мэта даследвання: распрацоўка метадалогіі правядзення мікрабіялагічнай дыягностыкі і маніторынгу анаэробных інфекцый, абумоўленых *C. difficile* ў Рэспубліцы Беларусь.

Метады: мікрабіялагічны, малекулярна-біялагічны, сералагічны, біялагічны, фізіка-хімічны, статыстычны.

Вынікі: атрыманы як непасрэдня, (ізаляцыя *C. difficile* ад пацыентаў), так і ўскосныя (выяўленне гэтага мікраарганізма на аб'ектах навакольнага асяроддзя клінічных бальніц г. Мінска) доказы наяўнасці *C. difficile*-асацыіраваных інфекцый ў Рэспубліцы Беларусь. Больш высокая рызыка іх развіцця магчыма ў аддзяленнях інтэнсіўнай тэрапіі і рэанімацыі, у навакольным асяроддзі якіх найбольш часта выяўлялі гэты патаген. Вывучана таксігеннасць ізалятаў як на геномным (локус патагеннасці), так і на фенатыпічным узроўнях з колькасным вызначэннем таксінапрадукцыі ў культуры клетак. Ізаляты *C. difficile* дэманстравалі тыповыя для гэтага віда мікраарганізма марфалагічныя, культуральныя, цытатаксічныя, малекулярна-біялагічныя ўласцівасці. Выяўлена, што папуляцыя *C. difficile*, якая цыркулявала на тэрыторыі рэспублікі, характэрызуецца пэўнай генетычнай структурай. Вызначана сем генагруп мікраарганізмаў з перавагай у структуры I і IV генатыпаў. Атрыманы імунныя біялагічныя вадкасці да галоўнага фактару патагеннасці *C. difficile* – таксінакомплексу. Распрацаваны айчынныя каталітычная і безкаталізатарная газагенеруючыя сістэмы, прызначаныя для стварэння анаэробнай атмасферы ў анаэрастатэ і ў поліэтыленавых пакетах.

Вобласць выкарыстання: мікрабіялогія, інфекцыйныя хваробы.

РЕЗЮМЕ

Лебедкова Наталия Валерьевна

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ
CLOSTRIDIUM DIFFICILE И РАЗРАБОТКА СИСТЕМ
ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СТРОГИХ АНАЭРОБОВ

Ключевые слова: *Clostridium difficile*, токсины, токсигенность, биологические свойства, генотип, антитоксические сыворотки, газогенерирующие системы.

Объект и предмет исследования: пациенты, подвергшиеся обследованию с целью выделения *C. difficile*; объекты внешней среды в отделениях различного профиля клинических больниц г. Минска; изоляты *C. difficile*; лабораторные животные.

Цель исследования: разработать методологию проведения микробиологической диагностики и мониторинга анаэробных инфекций, обусловленных *C. difficile* в Республике Беларусь.

Методы: микробиологический, молекулярно-биологический, серологический, биологический, физико-химический, статистический.

Результаты: получены как прямые (изоляция *C. difficile* от пациентов), так и косвенные (обнаружение данного микроорганизма на объектах внешней среды клинических больниц г. Минска) доказательства наличия *C. difficile*-ассоциированных инфекций в Республике Беларусь. Более высокий риск их развития вероятен в отделениях интенсивной терапии и реанимации, во внешней среде которых наиболее часто обнаруживали этот патоген. Изучена токсигенность изолятов как на геномном (локус патогенности), так и на фенотипическом уровнях с количественным определением токсинопродукции в культуре клеток. Изоляты *C. difficile* проявляли типичные для данного вида микроорганизма морфологические, культуральные, цитотоксические, молекулярно-биологические свойства. Установлено, что популяция *C. difficile*, циркулирующая на территории республики, характеризуется гетерогенной генетической структурой. Выявлено семь геногрупп микроорганизмов с преобладанием в структуре I и IV генотипов. Получены иммунные биологические жидкости к главному фактору патогенности *C. difficile* – токсинокомплексу. Разработаны отечественные каталитическая и бескаталитическая газогенерирующие системы, предназначенные для создания анаэробной атмосферы в анаэроостате и в рабочих полиэтиленовых пакетах.

Область применения: микробиология, инфекционные болезни.

SUMMARY

Natalia V. Lebedkova

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*
ISOLATES AND DEVELOPMENT SYSTEM FOR CULTIVATION
OF STRICT ANAEROBES

Key words: *Clostridium difficile*, toxins, toxigenicity, biological properties, genotype, antitoxic serum, gas-generating systems.

Object and subject of research: the patients, objects of environment of clinical hospitals of Minsk, isolates of *C. difficile*, laboratory animals.

The purpose of research: to elaborate of methodical approaches to the microbiological diagnostics and monitoring anaerobic the infections caused *C. difficile* in the Republic of Belarus.

Methods: microbiological, molecular-biological, serological, biological, physical and chemical, statistical.

Results: it was obtained both direct (isolation of *C. difficile* from patients) and indirect (detection of this microorganism on objects of hospitals environment) proves of the *C. difficile*-associated infections presence in Belarus. Higher risk of their reproduction is probable in intensive care units, where this pathogen was found most frequently in environment. The isolates toxigenicity has been investigated on the genomic level (pathogenicity locus) as well as on the phenotypic one with detection of toxin production in cell culture. *C. difficile* isolates had typical for this microorganism morphological, cultural, cytotoxic, molecular-biological properties. It was established that *C. difficile* population, circulating on the territory of the republic had heterogenic genetic structure. There have been revealed seven genotypes of microorganisms with the prevalence of I and IV genotypes within the structure. Immune biological fluids to the main factor of pathogenicity of *C. difficile*, toxinocomplex, have been obtained. The gas-generating systems for anaerobic atmosphere creation in anaerobic jar and anaerobic bags have been developed.

Application area: microbiology, infectious diseases.