

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ім. І. І. МЕЧНИКОВА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»**

КХЕДЕР САІД САЛЕХ

УДК 579.852.13:616.34-002-078

**УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДІВ БАКТЕРІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ
ЗАХВОРЮВАНЬ, ОБУМОВЛЕНИХ ТОКСИНПРОДУКУЮЧИМИ
ШТАМАМИ *S.DIFFICILE***



03.00.07 – мікробіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Державній установі «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України».

Науковий керівник: кандидат медичних наук, старший науковий співробітник **Воронкіна Ірина Анатоліївна**, Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України», вчений секретар

Офіційний опонент: доктор медичних наук, професор **Степанський Дмитро Олександрович**, Дніпровський державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології;

Офіційний опонент: доктор медичних наук **Джораєва Світлана Карьягдіївна**, ДУ «Інститут дерматології та венерології Національної академії медичних наук України», завідувач лабораторно-експериментальним відділом.

Захист відбудеться «07» травня 2021 року о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» за адресою: 61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 14-16.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 14-16).

Автореферат розісланий « 06 » квітня 2021 р.

В. о. вченого секретаря
спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01,
д.мед.н.



А. Ю. Волянський

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В останні роки в результаті широкого та неконтрольованого використання антибіотиків збільшилась кількість випадків кишкових інфекцій, викликаних умовно-патогенною мікрофлорою. Нині, *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) визнають одним із основних збудників антибіотикоасоційованих діарей (ААД) та ентероколітів (Соловей Н. В., 2013; Лобзин Ю. В., 2017). Цей мікроорганізм здатен призводити, як до легких форм діареї, так і до одного з найбільш важких гострих захворювань кишечника – псевдомембранозного коліту (ПМК).

До початку ери антибіотикотерапії зустрічались лише поодинокі випадки ентероколітів, пов'язаних з *C. difficile*, а діагноз ПМК встановлювали тільки після аутопсії за характерними змінами в кишечнику (Терлецкий В. П., 2016). З початком широкого вживання антибіотиків число хворих на ААД та ПМК почало стрімко зростати. Нині у багатьох країнах Європейського союзу та у США економічні втрати від CDI (*Clostridioides difficile* –інфекції) (враховуючи діагностику та лікування) становлять, в середньому, від 500 до 800 доларів на кожен випадок, що складає щорічно близько 3 млрд. доларів, а смертність досягає 15-30 тис. летальних випадків щорічно (Зінчук О. М., Столяр Г. Л., 2014; Lessa FC, Mu Y, Bamberg W. M., 2015).

Розвитку інфекції сприяють не тільки антибактеріальні препарати (перш за все кліндаміцин, амінопеніциліни, цефалоспорини III покоління), але й будь-які інші препарати, здатні порушувати мікробіоту кишечника (протипухлинні засоби, препарати платини, циклофосфаміди, антиметаболіти). «Тригерними» факторами також вважають похилий вік пацієнта, наявність гематологічних, імунодефіцитних захворювань та інше (Логінова О. П., 2019; Степанов Ю. М., Симонова Е. В., 2020).

Високе медико-соціальне значення захворювання вимагає розробки та удосконалення сучасних методів виявлення збудника. Чисельними дослідженнями встановлено, що для підтвердження діагнозу CDI необхідно довести токсинпродукуючі властивості збудника. Нині, для лабораторного встановлення CDI використовують, в основному, культуральні, серологічні та молекулярно-генетичні методи. Найбільшого розповсюдження отримав метод імуноферментного аналізу (ІФА) для виявлення токсинів *C. difficile*, а також спільного для родів *Clostridium* та *Clostridioides*, скринінгового антигену ферменту глутаматдегідрогенази. Метод ІФА відрізняється простотою постановки, відносно невисокою вартістю та швидким отриманням результатів. Специфічність методу досягає 95,0 %, а чутливість коливається в межах 70 – 80 %, за рахунок значної кількості псевдонегативних результатів, що є основним недоліком методу (Алешкин В. А., Селькова Е. П., 2015).

Використання молекулярно-генетичних методів дозволяє швидко виявити *C. difficile* у пацієнтів з клінічними ознаками захворювання. Більшість тестів дозволяють визначити гени, що кодують продукцію токсинів А/В (*tcdA* та/чи *tcdB*), але ці методи є тільки якісними і не дозволяють визначити кількість та життєздатність клостридій у клінічних зразках (Crobach M. J., 2016; Kamouri E., Croxatto A., 2021).

«Золотим» стандартом діагностики вважається бактеріологічне виділення чистої культури *C. difficile* при підтвердженні наявності специфічних токсинів іншими методами. Культуральний метод є одним з самих надійних та може бути широко застосований у практичній медицині. Він використовується з часів встановлення ролі *C. difficile* в розвитку ААД та ентероколітів. Але, відомо, що бактеріологічне виділення штамів *C. difficile* з випорожнень хворих пов'язано з рядом труднощів, у тому числі з невеликою кількістю збудника в кишечнику через наявність рідких частих випорожнень. Крім того, без визначення токсинпродукуючих властивостей виділених збудників, бактеріологічний метод не може бути використаний, як самостійний, для проведення діагностики (Krůtová M, Nyč O., 2018; Kampouri E., Croxatto A., 2021).

Отже, жоден з названих методів окремо не вважається абсолютно достатнім для встановлення діагнозу CDI і потребує підтвердження іншими методами досліджень.

З цих позицій, питання щодо створення нових поживних середовищ з високими селективними якостями для культивування та визначення токсинпродукуючих властивостей *C. difficile* є досить актуальним.

В Україні проводяться лише вибіркові наукові дослідження стану захворюваності в окремих медичних закладах. Загальна картина захворюваності відсутня, тому що більшість стаціонарів діагностику та реєстрацію випадків CDI не проводить. Це пов'язано з відсутністю необхідної нормативно-технічної документації, лабораторної бази, вітчизняних тест-систем та живильних середовищ, а також недостатньою поінформованістю лікарів.

Все вищевказане підтверджує актуальність основного завдання цієї роботи – підвищення ефективності лабораторної діагностики ентероколітів, обумовлених *C. difficile*, шляхом удосконалення бактеріологічних методів виділення збудника та методів встановлення його токсинпродукуючих властивостей.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом планової науково-дослідної роботи лабораторії анаеробних інфекцій Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»: «Удосконалення бактеріологічних методів виділення токсигенних штамів *C. difficile*», № державної реєстрації 0117U002282, при виконанні якої дисертантом проведені основні експерименти щодо виділення та вивчення властивостей штамів *C. difficile* від хворих з характерними клінічними проявами захворювання, в тому числі їх антибіотикочутливості та токсинпродукуючих властивостей; вивчення складу мікробіоти кишечника у хворих на CDI; розробки оптимальної схеми проведення бактеріологічного дослідження та нового селективного середовища для виділення *C. difficile* та виявлення специфічних токсинів.

Мета і завдання дослідження. *Мета* – підвищення ефективності лабораторної діагностики ентероколітів, обумовлених *C. difficile*, шляхом

удосконалення бактеріологічних методів виділення збудника та визначення його токсинпродукуючих властивостей.

Завдання дослідження:

1. Удосконалити схему бактеріологічного виділення *C. difficile* з клінічного матеріалу;
2. Провести бактеріологічне обстеження хворих з проявами CDI (наявність діареї після початку прийому антибіотиків або інших препаратів «групи ризику», симптоми інтоксикації, кишкові кровотечі, ендоскопічні ознаки ПМК);
3. Визначити біологічні властивості клінічних ізолятів *C. difficile*, в тому числі їх антибіотикочутливість та токсинпродукуючу активність;
4. Встановити зміни видового та кількісного складу мікробних асоціацій кишечника у хворих з підозрою на CDI.
5. Розробити нові бактеріологічні методи виділення *C. difficile* з патологічного матеріалу та виявлення їх токсинпродукуючих властивостей.

Об'єкт дослідження: зразки біологічного матеріалу (фекалії), що підлягають аналізу для виявлення *C. difficile*, відібрані від хворих з проявами CDI (наявність діареї після початку прийому антибіотиків або інших препаратів «групи ризику», симптоми інтоксикації, кишкові кровотечі, ендоскопічні ознаки ПМК), референтні та клінічні штами *C. difficile*, поживні середовища для виділення та вивчення токсинпродукуючих властивостей *C. difficile*.

Предмет дослідження: біологічні властивості штамів *C. difficile* (морфологічні, тінкторіальні, культуральні, біохімічні, здатність до токсиноутворення, чутливість до антибіотиків), ефективність різних схем та різних поживних середовищ для виділення та вивчення штамів *C. difficile*.

Методи дослідження: бактеріологічні (виділення та ідентифікація клінічних ізолятів *C. difficile*, вивчення їх морфологічних, тінкторіальних, культуральних, біохімічних властивостей; чутливість до антибіотиків; визначення характеру дисбіотичних змін мікрофлори кишечника у хворих з підозрою на CDI; вивчення ефективності різних схем виділення *C. difficile* з біотичного матеріалу), біологічні (визначення токсинпродукуючих властивостей штамів *C. difficile*), математико-статистичні (статистичний аналіз отриманих результатів).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в Україні розроблено та запатентовано склад нового середовища для культивування *C. difficile*, яке має високі ростові якості та селективну дію у порівнянні з аналогами та, за рахунок оптимальної прозорості та щільності, придатне для детекції токсинів у реакції специфічної імунопреципітації з антитоксином. Удосконалено схему бактеріологічної діагностики CDI, яка дозволяє виділяти токсиноутворюючі штами *C. difficile*.

Удосконалено схему бактеріологічної діагностики CDI, яка дозволяє виявляти токсинпродукуючі штами та забезпечує достатньо високий рівень чутливості культурального методу (10^3 - 10^4 КУО *C. difficile* в 1 г фекалій), специфічності 100 % та відтворюваності результатів досліджень > 95 %.

Доповнено дані щодо змін мікробіоти кишечника у хворих з CDI. При обстеженні хворих з діареєю та підозрою на CDI, збудник *C. difficile* було виділено у 9,7 % обстежених. Характер порушень мікрофлори в обох групах (з підтвердженою та не підтвердженою CDI) відповідав 2-му та 3-му ступеням тяжкості дисбіозу.

Встановлено, що виділені клінічні штами *C. difficile* зберігають високу чутливість до препаратів вибору – метронідазолу та ванкоміцину, що дозволяє і надалі вважати їх першочерговими у виборі етіотропного лікування та призначати хворим, враховуючи ступінь ризику рецидивуючого перебігу хвороби.

Досліджено токсинпродукуючі властивості виділених клінічних ізолятів та порівняно їх з музейними штамами *C. difficile*. За допомогою біологічної проби на білих мишах визначено, що виділені клінічні ізоляти (n=7) не продукували токсини, що дозволило попередньо вважати їх такими, які не мають епідемічного значення.

Практичне значення одержаних результатів. Впровадження в практику схеми бактеріологічного виділення збудника, з використанням нового селективного середовища, підвищує якість лабораторної діагностики CDI. Запропонований метод дозволяє без додаткових діагностичних етапів (імунологічних та молекулярно-генетичних досліджень) ідентифікувати *C. difficile* з токсигенними властивостями, що, в свою чергу, скоротить строки (на 24 години та більше) та економічні витрати (на 30-40 %) на лабораторну діагностику антибіотико-асоційованих діарей, обумовлених *C. difficile*.

Результати вивчення чутливості циркулюючих штамів *C. difficile* до антибіотиків підтверджують високу чутливість до ванкоміцину та метронідазолу (МІК \leq 2,0 мг/л). Ці препарати залишаються препаратами вибору для лікування CDI в Україні.

Отримані результати наукових досліджень щодо використання бактеріологічної схеми та нового селективного середовища для виділення *C. difficile* використовують в роботі та в навчальних програмах вищих медичних закладів, закладів післядипломної освіти МОЗ України та клінічній лікарні: кафедри загальної та клінічної імунології та алергології ХНУ ім. В. Н. Каразіна (акт впровадження від 03.09.2019 р.), кафедри клінічної імунології та мікробіології ХМАПО (акт впровадження від 02.09.2019 р.), кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДЗ "Дніпропетровська медична академія МОЗ України" (акт впровадження від 02.09.2020 р.), лабораторії анаеробних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН» (акт впровадження від 12.05.2020 р.), бактеріологічній лабораторії КНП ХОР «ОДКЛ № 1» (акт впровадження від 02.07.2020 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто проведено інформаційно-патентний пошук та аналіз літературних джерел за темою дисертаційного дослідження.

Разом з науковим керівником обрав напрям дослідження, сформулював план роботи, визначив тему, мету і завдання роботи, підібрав відповідні методи дослідження.

Автором самостійно виконано основні дослідження щодо вивчення змін видового та кількісного складу мікробних асоціацій кишечника у хворих на ААД, пов'язані з CDI; вивчення частоти виявлення *C. difficile* у хворих з характерними клінічними проявами захворювання та встановлення біологічних властивостей ізолюваних культур, у тому числі чутливості до антибіотиків та токсиноутворюючих властивостей; дисертантом самостійно проведено експерименти з розробки нової схеми бактеріологічної діагностики та складу нового середовища з високою селективною дією для виділення токсиноутворюючих штамів *C. difficile* від хворих.

Дисертантом проведено аналіз та статистичну обробку результатів досліджень, що дозволило йому обґрунтувати основні наукові положення дисертації, сформулювати узагальнюючі висновки та практичні рекомендації.

Персональний внесок автора у всіх опублікованих із співавторами працях наведено у тексті дисертації та в авторефераті у списку наукових робіт.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи обговорювалися та доповідалися на: науково-практичній конференції «Здобутки та перспективи у боротьбі з інфекційними захворюваннями (мікробіологія, ветеринарія, фармація)» (Харків, 2017); міжнародній науково-практичній конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини» (Львів, 2017); XV з'їзді Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Одеса, 2017); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» (Чернівці, 2018); міжнародній науково-практичній конференції «Медична наука та практика: виклики і сьогодення» (Львів, 2018); international scientific and practical conference «Medical sciences : history, the present time. the future, eu experience» (Wloclawek, Republic of Poland, 2019); науково-практичній конференції «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І. І. Мечникова (за участю міжнародних спеціалістів)» (Харків, 2020).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових праць (2 одноосібно): 5 статей (4 – у фахових виданнях України, 1 – у міжнародному виданні, 5 включено до наукометричних баз), 1 патент на корисну модель, 1 технологія та 8 тез доповідей у матеріалах міжнародних науково-практичних конференцій та з'їздів.

Структура й обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 131 сторінці машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень з аналізом та узагальненням результатів, висновків, практичних рекомендацій та 4 додатків. Робота містить 15 таблиць і 7 рисунків. Список використаних джерел складається зі 135 робіт кирилицею та латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У огляді літератури, який містить 3 тематичні підрозділи, ґрунтовно висвітлено сучасний стан захворюваності в Україні та

світі на ААД та ПМК, обумовлені *S. difficile*. Проаналізовано ефективність різних методів лабораторної діагностики цих захворювань. Акцентовано увагу на проблему діагностики CDI в Україні, що пов'язано з відсутністю відповідного обладнання, тест-систем в державних закладах охорони здоров'я та недостатньою поінформованістю лікарів.

Матеріали і методи. Дослідження проводились в лабораторії анаеробних інфекцій (ЛАІ) Державної установи «Інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» («Свідоцтво про відповідність системи вимірювань вимогам ДСТУ ISO 10012:2005 № 01-0182/2019 від 19.12.2019 р.). Дослідження виконані згідно Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи медичних досліджень за участю людини.

Матеріал для дослідження отримували з клінічних установ, згідно договорів про науково-практичне співробітництво: з КЗОЗ «Міська клінічна лікарня №13», Державною установою «Інститут медичної радіології ім. С.П.Григор'єва НАМН України», Харківським національним медичним університетом кафедрою дитячих інфекційних хвороб, КЗОЗ «Обласна клінічна лікарня – центр екстреної медичної допомоги та медицини катастроф».

Група обстежених складала 73 пацієнти, віком від 20 до 60 років. Всі хворі були з проявами CDI (наявність діареї після початку прийому антибіотиків або інших препаратів «групи ризику», симптоми інтоксикації, кишкові кровотечі, ендоскопічні ознаки псевдомембранозного коліту (ПМК).

Приготування поживних середовищ здійснювалось відповідно до вимог виробника. Контроль якості поживних середовищ проводили за рекомендаціями фірм-виробників, які викладено у сертифікатах до продукції, а також згідно з Інформаційним листом МОЗ України №05.4.1/1670 «Бактеріологічний контроль поживних середовищ», Київ, 2000.

Для визначення біохімічної активності тест-культур мікроорганізмів використовували АРІ системи Rapid ID 32A (identification system for anaerobes), виробництва bio Mérieux, Франція. Для створення анаеробних умов культивування застосовували GEN box anaer, bio Mérieux (Франція). Контроль анаеробних умов вирощування проводили за допомогою анаеробних тестів-індикаторів, bio Mérieux (Франція).

Приготування суспензії мікроорганізмів з визначеною концентрацією мікробних клітин (у фізіологічному розчині з рН 7,0-7,2) здійснювали з використанням приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія).

Мікробіологічні дослідження клостридіальних інфекцій проводили згідно рекомендацій (Волянський Ю. Л., Чернявський В. И., Бирюкова С. В., 2013).

Для порівняльного вивчення різних схем бактеріологічного виділення збудника з клінічного матеріалу використовували наступні схеми: схема 1 – відбір донорських фекалій, попередньо контамінованих клостридіями у кількості не менш ніж 5 мл у пробірку-тампон з середовищем Еймса, з наступним висівом на бульйон Шадлера (БШ), через 48 год 0,1 мл досліджуваної суміші висівався на СДА; схема 2 – відбір донорських фекалій, попередньо контамінованих клостридіями у кількості не менш ніж 5 мл у

пробірку-тампон з середовищем Еймса, з наступним висівом на бульйон з серцево-мозковою витяжкою (БСМВ), через 48 год 0,1 мл досліджуваної суміші також висівався на СДА; контроль – відбір донорських фекалій, попередньо контамінованих клостридіями у кількості не менш ніж 5 мл у пробірку-тампон з середовищем Еймса, з наступним висівом на щільне середовище СДА. Для цього досліджуваний штам *C.difficile* № 258 вирощували 48 годин на СДА в анаеробних умовах. Готували мікробні зависі 2,0 за Mc Farland, робили серію десятикратних розведень у фосфатно-буферному розчині в інтервалі від 10^8 до 10^3 КУО/мл. З цих розведень контамінували донорські фекалії (1:10), потім проводили досліди за запропонованими схемами.

Отримані проби підлягали дослідженню на дисбіоз та наявність збудника *C. difficile*-інфекції.

Ідентифікацію супутньої мікрофлори проводили загальноприйнятими класичними бактеріологічними методами.

Ступінь дисбіотичних порушень складу мікрофлори кишечника встановлювали згідно з визначеними рекомендаціями (Чернявский В. И., Бирюкова С. В., Волянский А. Ю., 2018). Вивчення кількісних показників кишкової мікробіоти проводили шляхом посіву серійних розведень фекалій, показники висіваємості виражали у колонієутворюючих одиницях на г (КУО/г).

Для визначення чутливості мікроорганізмів до антимікробних препаратів використовували агар Мюллера-Хінтона (HiMedia, Індія) з додаванням 5,0 % дефібринованої крові та 20 мг/л β -нікотинаміду аденіндінуклеотиду (МХ-В). Чутливість тестованих штамів мікроорганізмів до антибіотиків перевірялась за «Методикою визначення та оцінки чутливості мікроорганізмів до антимікробних препаратів» рекомендовану EUCAST (2020) та згідно з рекомендаціями Інституту клінічних і лабораторних стандартів (CLSI – Institute of Clinical Laboratory Standards).

Отримання клостридіального токсину проводили за методикою (Бирюкова С. В., Калиниченко Н. Ф., 2002).

Для визначення летальної дії отриманих токсинів, проводили біологічну пробу на безпородних білих мишах, самцях, вагою 15-20 г, та визначали LD_{50} /мл (Ашмарин И. П., Воробьев А. А., 1962; Ramakrishnan MA., 2016).

Досліди на тваринах проводили згідно вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних і інших наукових цілей та науково-практичних рекомендацій (European Convention, 1986).

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами за допомогою програми Microsoft Excel 2003 та Statistica 6.0 (Лапач С. М., Чубенко А. В., Бабич П. Н., 2001; Гланц С., 1998). Вираховували середні арифметичні значення для ряду даних (M) та похибки середніх величин (m). Відмінності вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати власних досліджень викладено у третьому – шостому розділах роботи.

З метою покращення бактеріологічної діагностики ентероколітів, обумовлених *C. difficile*, проведено вивчення різних схем виділення збудника та

ефективності транспортного середовища Еймса (Amies) для забору та збереження (здатності до виживання) *C. difficile* протягом 1-5 діб.

Експеримент проводили шляхом внесення мікробних сумішей музейних штамів *C. difficile* № 258, № 281 А та *C. difficile* № 2 (клінічний штам) у пробірки з середовищем Еймса в кінцевій концентрації 10^7 КУО на 1 мл. Зберігали пробірки при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ - $+5^{\circ}\text{C}$ та робили висіви на Clostridium Difficile Agar (CDA) кожного дня, упродовж 5 діб. Після цього, підраховували кількість колоній, що вирости. Триразова перевірка ефективності середовища Еймса для забору та збереження культур *C. difficile* протягом 1-5 діб показала, що кількість виростилих колоній статистично не змінювалась протягом всього терміну збереження ($p > 0,05$). Тобто можна вважати, що збереження досліджуваного матеріалу в транспортному середовищі при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ - $+5^{\circ}\text{C}$ протягом 5 діб суттєво не впливало на результати досліджень.

Наступним етапом дослідження було проведення порівняльного вивчення різних схем бактеріологічного виділення збудника з клінічного матеріалу з метою відпрацювання та розробки найбільш ефективної схеми (рис. 1).

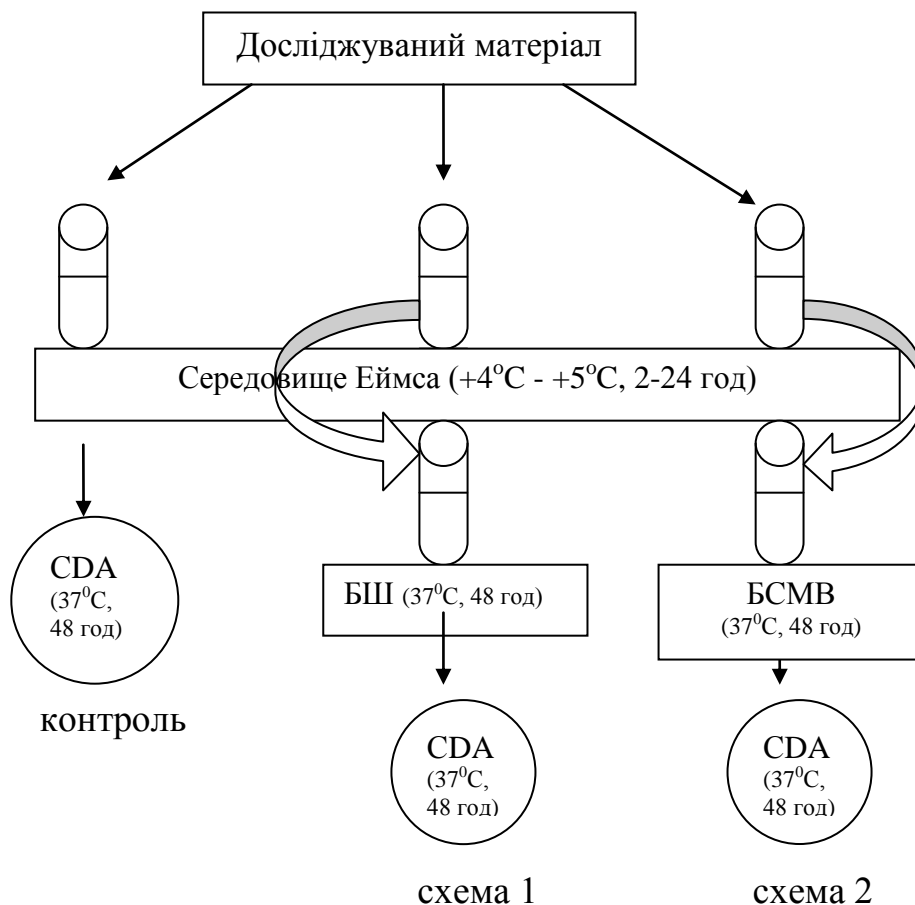


Рис.1. Схема культурального виділення *C. difficile* з досліджуваного матеріалу

Результати порівняльного вивчення різних методів виділення *C. difficile* показали, що при використанні схем з висівом на рідкі середовища збагачення (схеми 1 та 2) з усіх розведень виділялась досліджувана культура у кількості від

($2,42 \pm 0,32$) до ($5,12 \pm 0,34$) ІgКУО/мл. При використанні тільки щільного середовища CDA (контроль) чутливість метода значно знижувалась. Результат був позитивним при вмісті збудника в пробі не менше 10^7 КУО/мл (табл. 1).

Таблиця 1

Ефективність різних схем виділення *C. difficile*

Поживні середовища	Кількість вирослих колоній (lg КУО/мл) з розведення:		
	10^3 (M ± m)	10^5 (M ± m)	10^7 (M ± m)
БШ, CDA (схема 1)	$2,42 \pm 0,32$	$3,32 \pm 0,61$	$4,96^* \pm 0,24$
БСМВ, CDA (схема 2)	$2,78 \pm 0,27$	$3,26 \pm 0,54$	$5,12^* \pm 0,34$
CDA (контроль)	в/р	в/р	$3,24 \pm 0,51$

Примітки: в/р – відсутність росту; * - $p < 0,05$ проти контролю.

При порівнянні ефективності схем 1 та 2 поміж собою встановлено, що в усіх випадках вірогідно значущої різниці між цими схемами за кількістю вирослих колоній не виявлено. Таким чином, використання перевірених рідких середовищ збагачення підвищувало ефективність виділення *C. difficile*. На відміну від використання лише тільки середовища CDA, схеми виділення зі застосуванням рідких середовищ збагачення дозволяли виділяти бактерії *C. difficile* з усіх перевірених розведень культури.

Узагальнюючи отримані результати, можна зробити висновок, що найбільш ефективною схемою виділення *C. difficile* з експериментального матеріалу був пересів з транспортного середовища Еймса в рідкі середовища збагачення (бульйон Шадлера або бульйон СМВ), а потім – на CDA.

Виділення бактерій *C. difficile* з клінічного матеріалу проводили за обраною схемою бактеріологічного дослідження. З твердого селективного середовища відбирали колонії з характерною морфологією, проводили попередню ідентифікацію за результатами мікроскопії пофарбованих за Грамом мазків, наявністю спор та специфічного запаху. Подальша ідентифікація ізолюваних культур проводилась з урахуванням культуральних та біохімічних ознак (рис. 2).

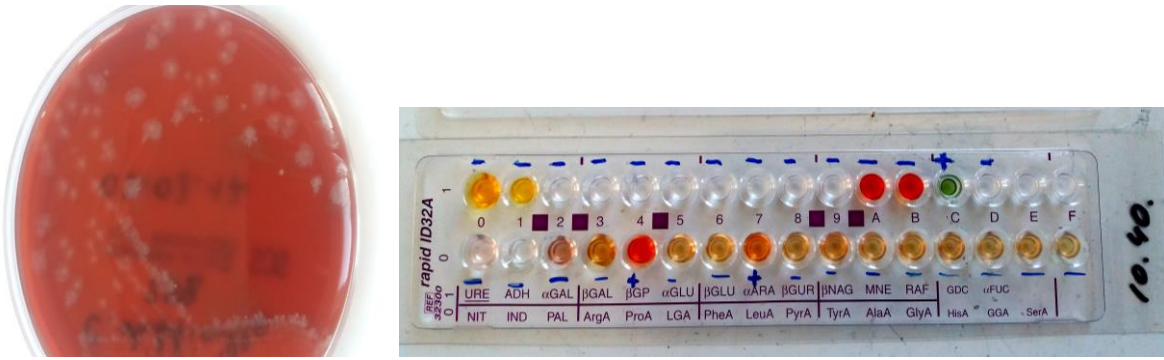


Рис. 2. Характерні колонії штаму *C. difficile* на CDA (HiMedia, Індія) та ідентифікація за допомогою тест-системи Rapid ID 32A.

Усі клінічні штами мали характерні для штамів *C. difficile* ідентифікуючі ознаки. Ідентифікація ізольованих культур проведена за допомогою аналізу на тест-системі Rapid ID 32A. Отримані результати підтвердили приналежність виділених штамів до виду *C. difficile*.

При бактеріологічному обстеженні 73 пацієнтів з діареєю та підозрою на СДІ виявлено, що у всіх хворих відмічались кількісні та якісні порушення складу мікрофлори кишечника. *C. difficile* виділено у 7 пацієнтів, що складало 9,6 % від загальної кількості обстежених.

Аналіз кишкової мікробіоти у пацієнтів, з виділеною *C. difficile*, показав, що у всіх хворих була знижена кількість нормальної *E. coli* до ($6,3 \pm 0,6$) lg КУО/г, знижена кількість інших представників нормобіоценозу, а саме *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., у 10 і більше разів (5–7 lg КУО/г та 4–6 lg КУО/г відповідно), підвищена кількість мікроорганізмів роду *Enterococcus* ($8,0 \pm 0,6$) lg КУО/г та *Staphylococcus* у всіх пробах, що обумовило перевагу кокових форм у загальній кількості мікробів до ($73,0 \pm 0,2$) % (нормопоказник – до 25,0 %). Також характерною ознакою порушень мікрофлори кишечника у пацієнтів з визначеною *C. difficile*, було підвищення кількості грибів роду *Candida* в усіх пробах до ($5,9 \pm 0,6$) lg КУО/г (рис. 3).

У пацієнтів, у фекаліях яких *C. difficile* не була виділена, також спостерігались дисбіотичні порушення, як то зниження кількості представників нормобіоценозу: загальної кількості *E. coli* – ($6,1 \pm 0,1$) lg КУО/г, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. (7 lg КУО/г і нижче), мікроорганізмів роду *Enterococcus* (до 5 lg КУО/г). У даної групи пацієнтів виявлено патогенну флору (патогенна *E. coli*, *S. enteritidis*). Також у значній кількості (5 lg КУО/г і більше) виділялись представники умовно патогенної мікрофлори: *P. vulgaris/mirabilis*, *E. aerogenes/cloaceae*, *K. pneumoniae/oxytoca*, *M. morganii* та ін.

Характер порушень мікрофлори в обох групах відповідав 2-му та 3-му ступеням тяжкості дисбактеріозу, при цьому у групі, в якій *C. difficile* не виявлено, спостерігалась кількісна перевага таких умовно патогенних мікроорганізмів, як *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *P. aeruginosa* тощо.

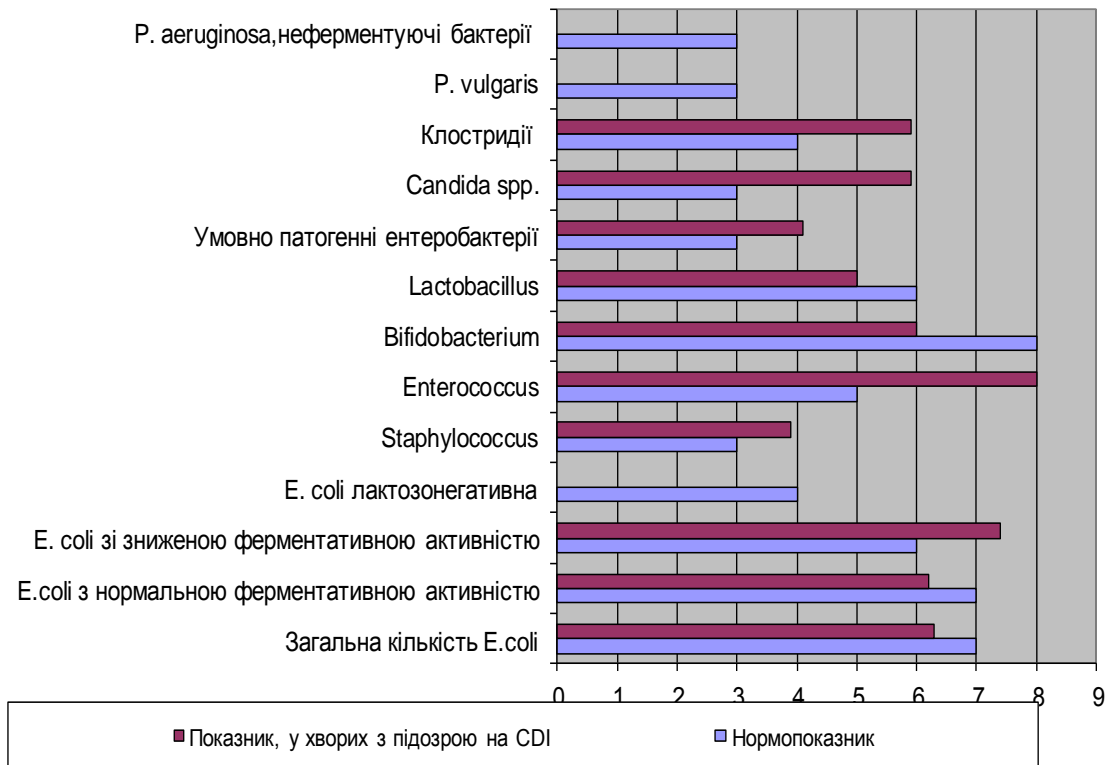


Рис. 3. Показники стану мікрофлори кишечника (lg КУО/г) у хворих на CDI, у порівнянні з нормопоказниками.

Враховуючи високу актуальність проблеми розвитку антибіотикорезистентності серед циркулюючих штамів *C. difficile*, нами проводились дослідження рівня чутливості виділених збудників до антибактеріальних препаратів.

Проведено вивчення чутливості свіжевиділених клінічних штамів *C. difficile* до ванкоміцину, метронідазолу та моксіфлоксацину.

Отримані результати свідчать про те, що всі ізоляти, які тестувались на чутливість до антибактеріальних препаратів були чутливими до ванкоміцину та метронідазолу (МІК $\leq 2,0$). По відношенню до моксіфлоксацину резистентними виявились 3 клінічні штами (*C. difficile* № 3, *C. difficile* № 4 *C. difficile* № 7), МІК яких була > 4 мг/л (стовпці зі штриховкою на рисунку) (рис. 4.)

Отже, проведені дослідження виявили високу чутливість перевірених клінічних ізолятів *C. difficile* до препаратів вибору – ванкоміцину та метронідазолу.

Ключову роль у патогенезі CDI відіграє такий фактор патогенності, як здатність збудника до продукції токсинів – А, В та бінарного. Токсин А та токсин В мають сильну цитотоксичну та запальну дію, здатні індукувати апоптоз та некроз епітеліальних клітин, беруть участь у тканезахисних запальних процесах, стимулюють масивні клітинні реакції у вигляді нейтрофільної інфільтрації.

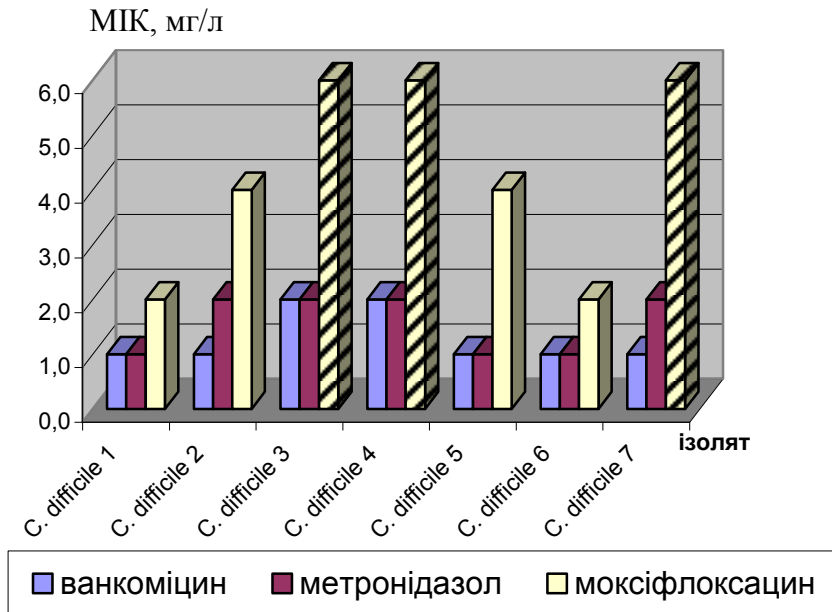


Рис. 4. Чутливість до антибактеріальних препаратів штамів *C. difficile*

Перевірено токсинпродукуючу активність 7-ми виділених клінічних штамів та 2-х музейних. Досліджено летальну дію нерозведеного культурального фільтрату. Для цього білим безпородним мишам вагою 16-18 г вводили по 0,5 мл фільтрату. Через 18 годин оцінювали летальну дію токсину. Фільтрати, отримані з клінічних штамів *C. difficile*, не виявили летальної дії при внутрішньоперитоніальному введенні мишам. Нерозведені фільтрати, отримані з музейних штамів *C. difficile* 258 та 281 А, виявили летальну дію через 18 годин після введення. Після цього готували послідовні десятикратні розведення фільтратів та визначали $LD_{50}/мл$. Оскільки, фільтрати, отримані з клінічних штамів *C. difficile*, не виявили летальної дії при внутрішньоперитоніальному введенні мишам, це дає можливість попередньо вважати їх нетоксигенними та такими, що не мають епідемічного значення. Музейні штами продукували летальні токсини різної активності. Токсин продукуюча активність штаму *C. difficile* 281 А була достовірно вищою ($p \leq 0,05$), ніж штаму *C. difficile* № 258. Відмічено також, що на серцево-мозковому бульйоні токсинпродукуюча активність обох штамів була достовірно вищою, ніж на печінковому.

Бактеріологічне виділення штамів *C. difficile* з випорожнень хворих пов'язано з рядом труднощів, в тому числі з невеликою кількістю збудника в кишечнику через наявність рідких частих випорожнень. Крім того, до складу відомих комерційних середовищ для культивування бактерій, зі складними поживними потребами, як правило, входять додаткові ростові фактори, наприклад, кров або різні еритроцитарні добавки. При створенні нового середовища для проведення реакції імунопреципітації необхідно було зберегти прозорість та відсутність забарвлення. Необхідність відмови від компонентів крові спонукала до додавання інших факторів росту.

Вивчено вплив різних поживних компонентів на інтенсивність росту *C. difficile*. Для дослідження були обрані різні концентрації широко відомих

добавок, що виявляють найбільш суттєвий вплив на ріст більшості бактерій: глюкоза, дріжджовий екстракт, вітамін К. Встановлено, що додавання до живильного середовища таких речовин, як розчин глюкози, дріжджовий екстракт та вітамін К в концентраціях 1,0 %, 2,0 % та 1,0 % відповідно, сприяло статистично достовірному збільшенню кількості мікробних клітин, порівняно з контрольним середовищем.

Оскільки, головною метою роботи було створення середовища для виділення чистої культури *C. difficile*, що придатне також для проведення одночасної постановки специфічної реакції імунопреципітації для виявлення токсинів, запропоноване середовище повинно мати високі ростові якості, при достатній селективності.

Проведено перевірку селективних якостей взятого за основу комерційного середовища. Для цього використовували референс-штами *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* 461, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Shigella flexneri* 170, *Clostridium perfringens* 12, *Peptostreptococcus* spp., *C. difficile* 281 A з лабораторної колекції. З референс-штамів готували мікробні суспензії добових культур з концентрацією мікробних клітин 1,0 за McF ($6,5 \cdot 10^7$ КУО/мл), робили серію десятикратних розведень і висівали по 0,1 мл на чашки з розлитим поживним середовищем. Результати вираховували через 48 годин культивування в анаеробних умовах при 37⁰С.

Отримані результати засвідчили про те, що середовище CDA створювало недостатній селективний ефект. Комбінація антибіотиків циклосерина та цефокситина не затримувала ріст анаеробних коків (пептострептококів).

З метою підвищення селективної якості середовищ для виділення *C. difficile*, проведено вивчення антимікробної дії по відношенню до пептострептококів та штамів *C. difficile* антибіотика амоксициліну, беталактамного препарату широкого спектру дії з групи пеніцилінів, який характеризується високою активністю по відношенню до анаеробних коків і низькою – до штамів *C. difficile*. Вивчення антимікробної дії проводили загальноприйнятим методом серійних розведень у напіврідкому тіогліколевому середовищі.

Отримані результати дозволили визначити найменший рівень концентрації антибіотика амоксициліну (16 мг/л), який затримував ріст всіх перевірених штамів анаеробних коків і не пригнічував би ріст штамів *C. difficile*. Введення амоксициліну в кількості 16 мг/л до складу запропонованого нами середовища дозволило підвищити його селективну дію порівняно з аналогом (табл. 2).

За основу нового середовища було взято склад комерційного середовища CDA. До основного складу входили наступні компоненти: протеаза пептон, гідрофосфат динатрію, калію дигідрофосфат, сульфат магнію, хлористий натрій, фруктоза, агар, антибіотики циклосерин та цефокситин. Для того, щоб середовище, яке нами розробляється було незабарвленим та прозорим, ми не включали до його складу еритроцитарні добавки та барвники. З метою покращення ростових якостей до середовища були додані живильні компоненти, які в попередніх наших дослідженнях ефективно підвищували

інтенсивність росту штамів *C. difficile* (глюкоза, дріжджовий екстракт та вітамін К в концентраціях 1,0 %, 2,0 % та 1,0 % відповідно). Селективна дія середовища була посилена за рахунок введення до його складу антибіотика амоксициліну в кількості 0,016 г/л. Порівнянні складу запропонованого та комерційного середовища наведено в таблиці 3.

Таблиця 2

Активність амоксициліну по відношенню до штамів *Peptostreptococcus spp.* та *C. difficile*

Мінімальні інгібуючі концентрації амоксициліну			
Штами <i>Peptostreptococcus spp.</i>	МІК (мг/л)	штами <i>C. difficile</i>	МІК (мг/л)
№ 1 (музейний)	8	№ 258 (музейний)	32
№ 1 (клінічний)	16	№ 1(клінічний)	128
№ 2 (клінічний)	4	№ 2(клінічний)	64
№ 3 (клінічний)	8	№ 3(клінічний)	64

Таблиця 3

Порівняння складу та селективних якостей запропонованого середовища та середовища CDA

Найменування та одиниці виміру	Запропоноване середовище	CDA
Типова формула	г/л	г/л
Протеаза пептон	40,0	40,0
Гідрофосфат динарія	5,0	5,0
Калія дигідрофосфат	1,0	1,0
Сульфат магнія	0,1	0,1
Хлористий натрій	2,0	2,0
Фруктоза	6,0	6,0
Агар	15,0	15,0
pH	7,4 ± 0,2 при 25°C	7,4 ± 0,2 при 25°C
Глюкоза	1,0	-
Вітамін К	1,0	-
Дріжджовий екстракт	2,0	-
Еритроцитарна добавка	-	(еритроцити барана 7 %)
Циклосерин	0,5	0,5
Цефокситин	0,016	0,016
Амоксицилін	0,016	-
Колір середовища	блід-жовтий, прозоре	червоний непрозоре

Продовження табл. 3

Найменування та одиниці виміру	Запропоноване середовище	CDA
Контроль якості:		
- Позитивний контроль: <i>Clostridium difficile</i>	хороший ріст, сіро-білого кольору колонії	хороший ріст, сіро-білого кольору колонії
- Негативні контролю: <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Proteus mirabilis</i>	немає росту	немає росту
<i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i>	немає росту	ріст від поодиноких колоній до помірного

Як видно з таблиці 3, селективна дія запропонованого нами середовища була вищою, ніж комерційного, середовище відповідало необхідним вимогам до ростових та селективних якостей.

Результати порівняльного вивчення ростових якостей запропонованого нами середовища та середовища Clostridium Difficile Agar (CDA) (HiMedia, Індія) засвідчили, що, запропонований склад середовища підвищує чутливість культурального методу виділення *C. difficile* і дозволяє виявляти збудника при значно меншій його кількості в клінічному матеріалі (10^3 КУО/мл), а також має кращі ростові якості порівняно з комерційним середовищем (табл. 4).

Таблиця 4

Порівняння ростових якостей запропонованого та відомого середовища, для виділення *C. difficile*, КУО/мл

Початкові розведення культур	Clostridium Difficile Agar (HiMedia, Індія)		Запропоноване середовище	
	<i>C. difficile</i> 281A	<i>C. difficile</i> №1	<i>C. difficile</i> 281A	<i>C. difficile</i> №1
Кількість мікробних клітин КУО/мл, (M ± m)				
10^6	$(1,8 \pm 0,6) \times 10^5$	$(1,6 \pm 0,4) \times 10^5$	$(2,3 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1,8 \pm 0,5) \times 10^5$
10^5	$(5,4 \pm 0,5) \times 10^4$	$(5,4 \pm 0,3) \times 10^4$	$(5,8 \pm 0,7) \times 10^4$	$(5,6 \pm 0,7) \times 10^4$
10^4	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^3$	$(4,4 \pm 0,3) \times 10^3$	$(4,1 \pm 0,4) \times 10^3$	$(4,6 \pm 0,4) \times 10^3$
10^3	Немає росту	Немає росту	10^3	$(1,2 \pm 0,3) \times 10^3$

На запропонованому середовищі було проведено специфічну реакцію імунопреципітації. Для виявлення токсиноутворюючих властивостей штамів *C. difficile* запропоноване селективне середовище розливали в чашки Петрі по 15,0 - 20,0 мл. На поверхню агару накладали диски, діаметром 5 мм, (можна використовувати паперові смужки розміром 5,0 на 40,0 мм) просочені розчином антитоксину. Для постановки реакції з виділеними чистими культурами з чашки з первинним посівом через 48 годин вирощування відбирали декілька колоній, ідентифікованих за своїми культуральними та морфологічними властивостями як *C. difficile* і засівали «бляшками» на поверхню агару, навколо диска з антитоксином, на відстані 5 мм. Через 24-48 годин вирощування в анаеробних умовах проводили візуальне виявлення ліній преципітації та оцінку результатів позитивного та негативного контролю. Відсутність ліній преципітації біля нетоксиноутворюючого штаму (негативний контроль) та наявність ліній біля токсиноутворюючого штаму (позитивний контроль) та біля досліджуваної культури свідчили про те, що присутній токсигенний штам (рис. 5).

Таким чином, проведені дослідження дозволили шляхом удосконалення комерційних середовищ для виділення штамів *C. difficile*, розробити склад нового середовища. На відміну від існуючих аналогів, запропоноване середовище за рахунок оптимальної прозорості та щільності, придатне для детекції токсигенних властивостей штамів в реакції специфічної імунопреципітації з антитоксином.

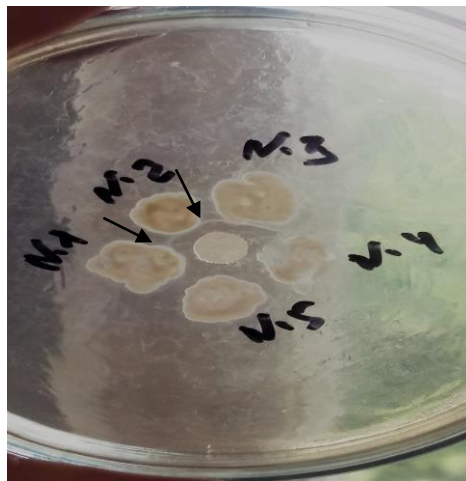


Рис. 5. Токсиноутворюючі властивості штамів *C. difficile* на новому середовищі (№ 1, № 2 – *C. difficile* № 281 А, № 3 – *C. difficile* № 258, № 4, № 5 – *C. difficile*, клінічні ізоляти, в центрі паперовий диск зі специфічним антитоксином, стрілками вказано наявність ліній преципітації).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та вирішення науково-практичної задачі, що полягає в оптимізації підходів до

бактеріологічної діагностики захворювань, обумовлених токсинпродукуючими штамми *C. difficile*, на підставі удосконаленої схеми бактеріологічного виділення збудника та нового селективного середовища для визначення токсинпродукуючих штамів *C. difficile*.

1. Найбільш ефективною схемою виділення *C. difficile* з експериментального матеріалу є відбір клінічних зразків у транспортне середовище Еймса з подальшим висівом у рідкі середовища збагачення (БШ, БСМВ), а потім – на СДА або на розроблене нове середовище для виявлення токсинпродукуючої активності.

2. При обстеженні 73 хворих, віком від 20 до 60 років, з діареєю та підозрою на CDI, збудник *C. difficile* було виділено у 9,7 % обстежених. Характер порушень мікрофлори в усіх хворих (у групі з виявленою *C. difficile* та у групі, де збудник не виділявся) відповідав 2-му та 3-му ступеням тяжкості дисбіозу.

3. Перевірені клінічні штами *C. difficile* характеризувались типовими біологічними властивостями та зберігали високу чутливість до препаратів вибору – метронідазолу та ванкоміцину. Це дозволяє і надалі вважати їх першочерговими у виборі етіотропного лікування та призначати хворим, враховуючи ступінь ризику рецидивуючого перебігу хвороби.

4. Перевірка в дослідках на мишах показала, що культуральні фільтрати вивчених клінічних ізолятів *C. difficile*, не містили токсинів та не виявляли летальної дії.

5. Розроблене нове селективне середовище для виділення *C. difficile* має оригінальний склад та фізико-хімічні властивості, які забезпечують високу чутливість культурального методу (10^3 КУО *C. difficile* в 1 г фекалій), та, на відміну від відомих аналогів, дозволяють одночасно за результатом специфічної реакції імунопреципітації визначати токсин-продукуючі штами.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для покращення якості бактеріологічної діагностики у хворих з підозрою на CDI рекомендується для відбору та збереження клінічного матеріалу застосовувати транспортне середовище Еймса (при $+4^{\circ}\text{C}$ - $+5^{\circ}\text{C}$, протягом 1-5 діб). Виділення збудника проводиться з використанням рідких середовищ збагачення (БШ, БСМВ), з наступним висівом на запропоноване нове селективне середовище. Для виявлення токсинпродукуючих властивостей збудника, одночасно з культивуванням, проводиться постановка специфічної реакції імунопреципітації.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Kheder Said Saleh Development of the Selective Nutrient Medium for Isolation of Toxin Producing Strains of *C. difficile*. *World Science*. № 8 (60). 2020. P. 34–40. doi: 10.31435/rsglobal_ws/31102020/7216.

2. Стан проблеми захворювань, пов'язаних з *C. difficile* інфекцією, в Україні та світі / Воронкіна І. А., Городницька Н. І., Марющенко А. М., Кхедер С. С.

Вісник проблем біології і медицини. 2017. Вип. 3, Т. 1 (137). С. 25–29. (дисертант проаналізував дані за темою, узагальнив матеріали та підготував до публікації).

3. Порівняльне вивчення ефективності виділення *Clostridium difficile* з досліджуваного матеріалу в експерименті з різними поживними середовищами / Воронкіна І. А., Дяченко В. Ф., Городницька Н. І., Кхедер С. С., Бірюкова С. В. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип.4, Т. 2 (140). С. 38–41. (дисертантом проаналізовано літературні дані за темою, обґрунтування перспективи вибраного напрямку дослідження).

4. Характеристика складу мікрофлори кишківника у хворих з діареєю та підозрою на *Clostridium difficile*-інфекцію / Воронкіна І. А., Кхедер С. С., Марющенко А. М., Дяченко В. Ф. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2019. № 4 (40). С. 58–63. (дисертант забезпечував підбір літературних джерел, провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації).

5. Летальна активність токсинів музейних та клінічних штамів *C. difficile* / Воронкіна І. А., Кхедер С. С., Бірюкова С. В., Марющенко А. М., Дяченко В. Ф. *Annals of Mechnicov Institute*. 2019. №. 4. С. 51–54. (дисертант проаналізував літературні дані за темою, провів статистичну обробку даних, проаналізував та узагальнив результати дослідження).

6. Селективне середовище для виявлення токсигенних штамів *C. difficile* : пат. 140454 UA. и 201908746 / Воронкіна І. А., Кхедер С. С., Бірюкова С. В., Марющенко А. М., Дяченко В. Ф. ; заявл. 19.07.2019 ; опубл. 25.02.2020. Бюл. 13. 5 с. (дисертант провів експериментальні дослідження, аналіз результатів, оформлення заявки на патент).

7. Технологія технологічного виділення токсигенних штамів *C. difficile* : технологія 0620U000047 / Воронкіна І. А., Кхедер С. С., Марющенко А. М., Дяченко В. Ф. (дисертант приймав участь у розробці схеми виділення *C. difficile* з клінічного матеріалу).

8. Експериментальне вивчення впливу деяких компонентів живильних середовищ на інтенсивність росту штамів *C. difficile* / Дяченко В. Ф., Воронкіна І. А., Марющенко А. М., Кхедер С. С., Тараненко Г. П. *Додаток до журналу Імунологія та алергологія*. 2019. № 1. С. 45–46. (дисертант провів експериментальні дослідження, аналіз результатів).

9. Бактеріологічний метод виділення токсигенних штамів *C. difficile* / Воронкіна І. А., Кхедер С. С., Дяченко В. Ф., Марющенко А. М., Бірюкова С. В. *Medical sciences : history, the present time. the future. eu experience : international scientific and practical conference, September 27-28. Wloclawek, Republic of Poland, 2019. P. 208–210.* (дисертант забезпечував підбір літературних джерел, провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації).

10. Сучасні підходи до лабораторної діагностики *C. difficile* інфекції / Кхедер С. С., Дяченко В. Ф., Воронкіна І. А., Марющенко А. М. *Здобутки та перспективи у боротьбі з інфекційними захворюваннями (мікробіологія, ветеринарія, фармація) : матеріали науково-практичної конференції*. Харків,

2017. С. 93–94. (дисертант забезпечував підбір літературних джерел, провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації).

11. Воронкіна І. А., Городницька Н. І., Кхедер С. С. Сучасні підходи до попередження розвитку та поширення захворювань, пов'язаних із *C. difficile* інфекцією. *Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини*: матеріали міжнародної науково-практичної конференції. Львів, 2017. С. 71–73. (дисертант провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації).

12. Характеристика антибіотикочутливості клінічних штамів *C. difficile* / Воронкіна І. А., Дяченко В. Ф., Кхедер С. С., Городницька Н. І., Марющенко А. М. *Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності* : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю. Чернівці, 2018. С. 41. (дисертант провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації).

13. Воронкіна І. А., Кхедер С. С., Тараненко Г. П. Експериментальне вивчення впливу концентрації глюкози в поживному середовищі на інтенсивність росту *C. difficile*. *Медична наука та практика: виклики і сьогодення* : матеріали міжнародної науково-практичної конференції. Львів, 2018. С. 74–76. (дисертант провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації).

14. Кхедер С. С. Порівняльне вивчення різних схем культурального виділення *Clostridioides difficile* Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І. І. Мечникова (за участю міжнародних спеціалістів) : матеріали науково-практичної конференції, 16–17 вересня 2020 р. Харків, 2020. С. 53–54. (дисертант забезпечував підбір літературних джерел, провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації).

15. *C. difficile* - інфекція: сучасний стан проблеми / Воронкіна І. А., Марющенко А. М., Кхедер С. С., Дяченко В. Ф., Бірюкова С. В.. Тези доповідей XV з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського. Одеса, 2017. С. 177. (дисертант провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали).

АНОТАЦІЯ

Кхедер С. С. Удосконалення методів бактеріологічної діагностики захворювань, обумовлених токсинпродукуючими штамми *C. difficile*. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України», Харків, 2021.

Дисертація присвячена питанням удосконалення методів бактеріологічної діагностики захворювань, обумовлених *C. difficile*.

Удосконалено схему бактеріологічної діагностики CDI, яка дозволяє виділяти токсиноутворюючі штами *C. difficile*. Розроблено склад нового середовища для культивування *C. difficile*, яке має високі ростові якості та придатне для детекції токсинів у реакції специфічної імунопреципітації.

Доповнено дані щодо змін мікробіоти кишечника у хворих з CDI.

Визначення чутливості *C. difficile* до антибіотиків показало високу чутливість *C. difficile* до метронідазолу та ванкомицину. Це дозволяє і надалі вважати їх першочерговими у виборі етіотропного лікування та призначати хворим, враховуючи ступінь ризику рецидивуючого перебігу хвороби.

Ключові слова: *Clostridioides difficile*, псевдомембранозний коліт, токинопродукуючі властивості, бактеріологічна діагностика, поживне середовище.

АННОТАЦИЯ

Кхедер С. С. Усовершенствование методов бактериологической диагностики заболеваний, обусловленных токсинпродуцирующими штаммами *C. difficile*. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.07 – микробиология. – ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова НАМН Украины», Харьков, 2021.

Диссертация посвящена вопросам совершенствования методов бактериологической диагностики заболеваний, обусловленных *C. difficile*.

Усовершенствована схема бактериологической диагностики CDI, которая позволяет выделять токсинопродуцирующие штаммы *C. difficile*. Разработан состав новой среды для культивирования *C. difficile*, которая имеет высокие ростовые качества и пригодна для детекции токсинов в реакции специфической иммунопреципитации.

Дополнены данные об изменениях микробиоты кишечника у больных с CDI. При определении чувствительность *C. difficile*, показана высокая чувствительность *C. difficile* к метронидазолу и ванкомицину. Это позволяет и в дальнейшем считать их первоочередными в выборе этиотропного лечения, назначать больным, учитывая степень риска рецидивирующего течения болезни.

Ключевые слова: *Clostridioides difficile*, псевдомембранозный колит, токинопродуцирующие свойства, бактериологическая диагностика, питательная среда.

SUMMARY

Kheder Said Saleh. Improvement of the bacteriological diagnostic methods of disorders caused by toxin producing *C. difficile* strains. – Manuscript copyright.

Thesis for receiving Candidate of Medical Science Degree in the specialty 03.00.07 «Microbiology». - State Institution "I. Mechnikov Institute of Microbiology

and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkov, 2021.

Recently, due to the widespread and uncontrolled use of antibiotics, the incidence of intestinal infections caused by conditionally pathogenic microflora. *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) is acknowledged as one of the main causative agents of the antibiotic-associated diarrheas (AAD) and enterocolitis. This microorganism can cause both mild forms of diarrhea and one of the most acute and severe intestinal disorders – pseudomembranous colitis (PMC). High medical and social importance of the disorder requires development and improvement of the modern methods of pathogen identification.

The thesis is devoted to the problems of improvement of bacteriological diagnostic methods of disorders caused by *C. difficile*.

To improve bacteriological diagnosis of enterocolitis caused by *C. difficile*, different regimens of pathogen isolation and efficacy of transport Amies medium for collection and preservation (survival ability) of *C. difficile* cultures in course of 1-5 days were studied. The study of efficacy of Amies medium for collection and preservation of *C. difficile* cultures for 1-5 days has shown that the quantity of grown colonies has not changed statistically during the whole period of preservation ($p < 0,05$).

To increase the quality of bacteriological diagnosis of CDI a scheme was proposed that includes the transfer of clinical material from the transport Amies medium to the liquid enrichment media (Schadler broth or BHI broth), and then to the differentially diagnostic media or proposed medium for the identification of the toxin-producing strains of the agent. The preliminary inoculation to the liquid media significantly increased the method sensitivity (allowed the isolation of the agent at the minimal content of the latter in the clinical material, starting from the 3,0 lg CFU/g).

During the bacteriological study of the 73 patients with diarrhea and possible CDI infection, it was found that all patients had quantitative and qualitative disbalances of the intestinal microflora composition. *C. difficile* was isolated in 7 patients, which constituted 9,6 % from the total quantity of the studied patients. The disbalance of microflora in both patient groups corresponded to the 2nd and 3rd stages of dysbacteriosis, while in the group where *C. difficile* was not isolated, qualitative advantage was observed for several conditionally pathogenic microorganisms, such as *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc.

Sensitivity of the freshly isolated clinical strains of *C. difficile* to vancomycin, metronidazole, moxifloxacin, rifampicin was studied. It was shown that all isolates tested for sensitivity to antibacterial agents were sensitive to vancomycine and metronidazole ($MIC \leq 2,0$). For moxifloxacin, 3 clinical strains were resistant (*C. difficile* № 3, *C. difficile* № 4 *C. difficile* № 7), for which MIC was 4-6 mg/l. This allows to consider these antibiotics as agents of the first order during selection of etiotropic therapy and prescribe them to patients, considering the level of the recurrent course of the disease risk.

A new medium for *C. difficile* cultivation was developed. The main content of the medium is composed of peptone protease, disodium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, magnesium sulfate, sodium chloride, fructose, agar, antibiotics cycloserine and cefoxitin. To make the medium free or coloring and transparent, no erythrocyte additives or dyes were added. In order to improve the growth qualities of the medium nutritive components were added, that effectively increased the growth intensity of *C. difficile* strains (glucose, yeast extract and vicasol at the concentrations of 1,0 %, 2,0 % and 1,0 % respectively). Selective effect of the medium was increased due to the addition of antibiotic amoxicillin in the quantity of 0,016 g/l. New medium for *C. difficile* cultivation has high growth properties and selective effect compared to its analogs, and, due to its optimal transparency and density, is suitable for the detection of toxins in the specific immune precipitation reaction with antitoxin.

The introduction to clinical practice the bacteriological scheme of the pathogen isolation with the use of new selective medium would increase the quality of laboratory diagnosis of CDI. The proposed method allows isolation and identification of the toxin producing strains of the pathogen.

Key words: *Clostridioides difficile*, pseudomembranous colitis, toxin producing properties, bacteriological diagnostics, nutrient medium.

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ААД - антибіотико-асоційована діарея

БСМВ - бульйон з серцево - мозковою витяжкою

БШ - бульйон Шадлера

ІФА - імуноферментний аналіз

КУО – колонієутворюючі одиниці

МІК - мінімальна інгібуюча концентрація

МХ-В - середовище Мюллера-Хінтона з додаванням β -нікотинаміда аденіндинуклеотида

ПМК- псевдомембранозний коліт

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- Європейський комітет з визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків)

CDA - Clostridium Difficile Agar

CDI - *Clostridioides difficile* –інфекція

CLSI – Institute of Clinical Laboratory Standards