

ЛЕТАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ТОКСИНІВ МУЗЕЙНИХ ТА КЛІНІЧНИХ ШТАМІВ *C. difficile*

Воронкіна І. А., Кхедер С. С., Бірюкова С. В.,
Марющенко А. М., Дяченко В. Ф., Панченко Л. О.

Державна установа «Інститут мікробіології та
імунології ім. І. І. Мечникова Національної
академії медичних наук України»

Вступ. На сьогодні в усьому світі *C. difficile*-інфекцію (CDI) офіційно розглядають, як нозокоміальну, цю проблему ретельно вивчають, проводять масштабні моніторингові дослідження.

Для діагностики CDI нині існує досить велика кількість різноманітних тестів. Це цитопатогенний тест та реакція нейтралізації токсину (визначення токсину В), латекс-агломінація (визначення глутаматдегідрогенази), ІФА (визначення токсину А або А і В одночасно), ПЛР. Та за даними деяких дослідників самим надійним, з широким використанням, методом діагностики *C. difficile*-інфекції є культуральний метод (бактеріологічний), який має високу чутливість [1]. У той же час відомо, що виділення збудника та його ідентифікація без визначення здатності продукувати токсин є недостатніми, адже нетоксигенні штами не відіграють роль у патології людини. Отже, бактеріологічний метод без визначення токсигенних властивостей штаму, не може бути використаний, як самостійний метод діагностики. Таким чином, доцільним є подальше визначення токсигенності виділених штамів іншими методами (наприклад, цитопатогенним тестом у культурі клітин) [2]. Нині в Україні сучасні методи діагностики (ПЛР, ІФА та ін.) не набули достатнього поширення у лабораторіях державних закладів охорони здоров'я, у зв'язку з їх складністю та коштовністю, крім того вони не можуть забезпечити всіх аспектів вирішення цієї проблеми таких, як вивчення якостей та мінливості самого збудника.

Головну роль у патогенезі CDI відіграє такий фактор патогенності, як здатність збудника до токсинуотворення.

Першим кроком у патогенезі CDI є адгезія бактерій до епітеліальних клітин кишківника. До факторів вірулентності, які забезпечують адгезію та колонізацію кишечника, відносять протеолітичні ферменти (цистеїнову протеазу), адгезини (білок клітини Swr66, білок теплового шоку GroEL, фібрoneктин 68 кДа – зв'язуючий білок), а також компоненти джгутиків FlhC (флагеллін) і FlhD (білок флагеллярної шапки) [3-5].

Друга фаза – це синтез двох екзотоксинів: токсину А (TcdA) і токсину В (TcdB) [6].

Дослідження кінця 90-х початку 2000-их років ретельно розглядають роль токсинів у розвитку CDI та підтверджують домінуючу роль токсину А у патогенезі захворювання, вказуючи на те, що токсин В, за відсутності токсину А, не має ніякого впливу на інтактну слизову оболонку. Це пояснювали тим, що епітеліальні клітини кишечника не мають специфічних рецепторів до токсину В, отже, проникнення токсину

В вглиб слизової оболонки є можливим лише за умови попереднього її пошкодження токсином А [7-10]. Нині, цю теорію впевнено спростовано. Доведено, що токсин В виконує ключову роль у патогенезі як локалізованої, так і системної CDI [11].

Токсин А та токсин В мають сильну цитотоксичну та запальну дію. Ці токсини є ферментами глюкозилтрансферазами, що каталізують інактивацію білків Rho, які відповідають за організацію актинового цитоскелету та функцію епітеліального бар'єру [12-14]. Глюкозилювання білків Rho призводить до дезагрегації актинового цитоскелету, збільшенню проникності мембран, втраті бар'єрної функції, склеюванню клітин та їх загибелі [14]. Руйнування епітеліальних клітин призводить до порушення водно-електролітного обміну вцілому, що сприяє секреції рідини у кишковий простір

Токсини *C. difficile* здатні індукувати апоптоз та некроз епітеліальних клітин, беруть участь у тканезахисних запальних процесах, стимулюють масивні клітинні реакції у вигляді нейтрофільної інфільтрації з підвищенням активності та вивільненням цитокінів (IL-8, IL-6, IL-1 β , лейкотрієнів B4, інтерферону γ) [15-16].

Отже, роль токсинів *C. difficile* у патогенезі CDI не викликає сумнівів. Сучасні дослідження підтверджують важливу роль як токсину А, так і токсину В, і поширення клінічних проявів за межі кишечника на інші органи (серце, нирки, мозок), що вказує на наявність системної токсемії та грає основну роль щодо прогнозу CDI [11, 17].

У лабораторії анаеробних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН» протягом 2017-2019 років проводяться дослідження по виявленню та вивченню циркулюючих клінічних штамів *C. difficile*.

Мета. Перевірити токсин продукуючі властивості клінічних та музейних штамів *C. difficile* на різних поживних середовищах.

Матеріали та методи

Перевірено токсинпродукуючу активність 7-ми виділених клінічних штамів та 2-х музейних.

Для отримання токсину мікроорганізми культивували на печінковому (Liver Broth, HiMedia) та серцево-мозковому бульйоні (СМБ) (Brain Heart Infusion Broth, HiMedia). Флакони з мікробною суспензією культивували 72 години при 37⁰ С в анаеробних умовах. Через 72 години бактеріальні клітини видаляли шляхом центрифугування протягом 30 хв при 8 000 об/хв з наступною фільтрацією надосадової рідини через мембранні фільтри 0,45 μ m (Sartorius). Фільтрати розливали у стерильні флакони для подальшого дослідження [2, 18].

Летальну активність визначали шляхом внутрішньо-перитоніального введення безпородним білим мишам вагою 16-18 г 0,5 мл нативних культуральних фільтратів та фільтратів розведених фізіологічним розчином.

Наступним етапом вираховували кількість тварин, що загинули через 18-20 годин після введення фільтрату. Далі, за методом [18, 19], проводили розрахунок LD₅₀/мл за формулою:

$$\text{Lg LD}_{50} = - [(\sum Li + 0,5) \times \delta] \quad (1)$$

де Li – кількість загиблих тварин / загальна кількість тварин, яким введено дану дозу;
 i – індекс (номер дози);
 $\sum Li$ – сума значень Li ;
 δ – коефіцієнт логарифмічного розведення.

Визначення верхньої та нижньої межі довірчого інтервалу, в якому з достовірністю 95 % знаходиться дійсне значення lg LD_{50} визначали за формулою:

$$(\text{lg LD}_{50})_{\max} = \text{lg LD}_{50} + \delta G_+ \quad (2)$$

$$(\text{lg LD}_{50})_{\min} = \text{lg LD}_{50} - \delta G_-$$

де $(\text{lg LD}_{50})_{\max}$ та $(\text{lg LD}_{50})_{\min}$ – значення верхньої та нижньої меж довірчого інтервалу;

δ – логарифм відношення кожної наступної дози до попередньої;

G_+ та G_- – табличні коефіцієнти [18].

Досліди на тваринах проводили згідно вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин,

що використовуються для дослідних і інших наукових цілей та науково-практичних рекомендацій [20-21].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми Statistica 6.0.

Результати та обговорення

На першому етапі досліджено летальну дію нерозведеного культурального фільтрату. Для цього білим безпородним мишам вагою 16-18 г ввели 0,5 мл фільтрату ($n=3$, де n – кількість тварин у групі на кожний штамп). Через 18 годин оцінювали летальну дію токсину. Фільтрати, отримані з клінічних штамів *C. difficile*, не виявили летальної дії при внутрішньочеревному введенні мишам. Нерозведені фільтрати, отримані з музейних штамів *C. difficile* 258 та 281 А, виявили летальну дію через 18 годин після введення.

Наступним етапом було приготування послідовних десятикратних розведень фільтратів та визначення $\text{LD}_{50}/\text{мл}$ за формулою 2.

Результати визначення летальної активності культуральних фільтратів досліджуваних штамів представлені на рисунку 1.

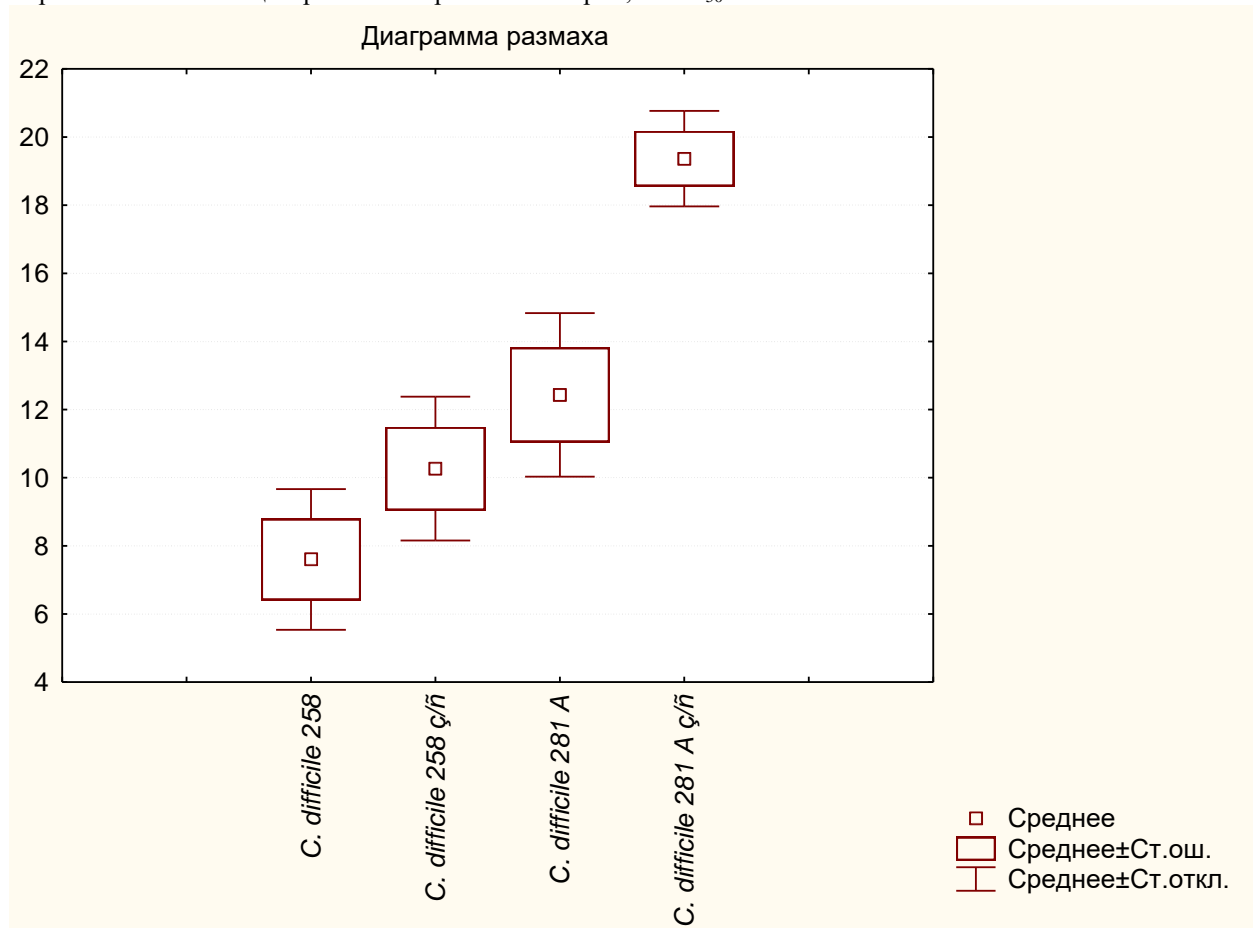


Рисунок 1 – Летальна активність культуральних фільтратів музейних штамів *C. difficile* ($\text{LD}_{50}/\text{мл}$)

Проведені експериментальні дослідження показали, що музейні штами *C. difficile* продукували токсини з різною летальною активністю. В культуральному фільтраті музейного штаму № 258, отриманому на печінковому бульйоні, летальна активність дорівнювала $7,9 \text{ LD}_{50}/\text{мл}$ ($\text{LD}_{50 \max} = 1:5,4 \text{ мл}$;

$\text{LD}_{50 \min} = 1:9,5 \text{ мл}$, $p = 0,05$), на серцево-мозковому бульйоні – $10,0 \text{ LD}_{50}/\text{мл}$ ($\text{LD}_{50 \max} = 1:8,3 \text{ мл}$; $\text{LD}_{50 \min} = 1:12,5 \text{ мл}$, $p = 0,05$). Музейний штамп № 281 А продукував більш активний токсин. Так, летальна активність досягала відповідно $12,5 \text{ LD}_{50}/\text{мл}$ ($\text{LD}_{50 \max} = 1:10,0 \text{ мл}$; $\text{LD}_{50 \min} = 1:14,8 \text{ мл}$, $p = 0,05$), та – $19,9$

LD₅₀/мл (LD_{50max} = 1:17,8 мл; LD_{50 min} = 1:20,5 мл, p = 0,05).

Висновки

Фільтрати, отримані із клінічних штамів *C. difficile*, не виявили летальної дії при внутрішньочеревному введенні мишам, що дає нам можливість попередньо вважати їх нетоксигенними та такими, що не мають епідемічного значення.

Вивчені музейні штами *C. difficile* № 258 та 281 А продукували летальні токсини різної активності. Токсин продукуюча активність штаму *C. difficile* 281 А була достовірно вищою (p≤0,05), ніж штаму *C. difficile* № 258.

На серцево-мозковому бульйоні токсинпродукуюча активність обох штамів була достовірно вищою, ніж на печінковому.

Lethal activity of the museum and clinical strains of *C. Difficile*

Voronkina I. A., Kheder S. S., Biryukova S. V., Maryuschenko A. M., Dyachenko V. F., Panchenko L. O.

Introduction. At present *C. difficile* infection (CDI) is considered to be nosocomial worldwide, this problem is studied in depth and currently there are large-scale monitoring studies being carried out. There is a considerable quantity of different tests for CDI diagnosis. These tests include the cytopathogenic test and the toxin neutralization reaction (determination of toxin B), latex agglutination (determination of the glutamatedehydrogenase), ELISA test (determination of the A or B toxins, or determination of the A and B toxins simultaneously), PCR. At the same time, it is known that the isolation of the agents and its identification without determination of the ability of the latter to produce toxins is insufficient, as the non-toxicogenic strains do not play any role in the human pathology. The modern diagnostic methods present in Ukraine (PCR, ELISA, etc.) have not become widespread in the laboratories of the state health establishments because of their complexity and cost, moreover, they cannot provide for all aspects required for the solution of this problem, such as the study of the properties and variability of the agent itself. The toxins A and B have powerful cytotoxic and pro-inflammatory properties. These toxins are glycosyltransferase enzymes that catalyze the inactivation of Rho proteins responsible for actin cytoskeleton organization and epithelial barrier function. The destruction of the epithelial cells leads to the disruption of the water-electrolyte exchange, which facilitates the secretion of the fluid into the intestinal space. The modern studies confirm the important role of both toxins A and B, and the distribution of the clinical symptoms beyond the intestine to other organs (heart, kidneys, brain), which points to the presence of the systemic toxemia and plays the main role in the prognosis of the CDI development. In the laboratory of the anaerobic infections of the SI "IMI NAMS" in the 2017-2019 years, studies devoted to the identification and study of the circulating clinical *C. difficile* strains were carried out. **Aim of the study.** To verify the toxin-producing properties of the clinical and museum strains of *C.*

difficile in different nutrient media. **Materials&methods.** The toxin producing properties were verified in 7 isolated clinical strains and 2 museum strains (*C. difficile* №258, №281 А), obtained from the L. V. Tarasevich SISK in 1988. In order to isolate the toxin, the microorganisms were cultivated on the liver and heart-brain broth (HBB) in anaerobic conditions. After 72 hours of cultivation, bacterial cells were isolated with the help of centrifugation for 30 minutes at 8 000 rpm with the subsequent filtration of the supernatant through 0,45 μm membranous filters (Sartorius) [2, 18]. Lethal activity was determined in the experiments on white mice with the help of the LD₅₀/ml determination method [18, 19]. The animal experiments were carried out according to the requirements of the European Convention of the Protection of Vertebrate animals that are used for research and other scientific purposes and practical scientific recommendations [20-21]. **Results&discussion.** The carried out experimental studies have shown that the museum strains of *C. difficile* produced toxins with different lethal activity. In the cultural filtrate of the museum strain № 258, obtained on the liver broth, the lethal activity was 7,9 LD₅₀/ml (LD_{50 max} = 1:5,4 ml; LD_{50 min} = 1:9,5 ml, p = 0,05), on the heart-brain broth – 10,0 LD₅₀/ml (LD_{50 max} = 1:8,3 ml; LD_{50 min} = 1:12,5 ml, p = 0,05). Museum strain № 281 А produced a more active toxin. Its lethal activity was correspondingly 12,5 LD₅₀/ml (LD_{50 max} = 1:10,0 ml; LD_{50 min} = 1:14,8 ml, p = 0,05), and – 19,9 LD₅₀/ml (LD_{50max} = 1:17,8 ml; LD_{50 min} = 1:20,5 ml, p = 0,05). **Conclusion.** Filtrates obtained from clinical strains of *C. difficile* have not demonstrated lethal activity after an intraperitoneal injection into mice, which allows us to consider them non-toxicogenic in advance and as such as those that do not have epidemic significance. The studies museum strains of *C. difficile* № 258 and 281 А produced lethal toxins of different activity. The toxin-producing activity of the *C. difficile* 281 А strain was reliably (p≤0,05) higher than that of the *C. difficile* № 258 strain. The toxin-producing activity of both strains was reliably higher on the heart-brain broth compared to the data obtain on the liver broth.

Key words. *C. difficile*, toxin-producing activity, nutrient media.

References

1. Peterson L. R. The role of the clinical microbiology laboratory in the management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Infect. Dis.* 1993. Vol. 7. № 2. P. 277–293. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
2. Biryukova S. V., Kalinichenko N. F., Dyachenko V. F., Starobinets Z. G. Antibiotic-associated colitis and diarrhea caused by *Clostridium difficile*. *Clinic. antibiotic therapy.* 2002. No. 4. P. 31–32.
3. Hennequin C., Janoir C., Barc M., Collignon A., Karjalainen T. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology.* 2003. № 149. P. 2779–2787
4. Tasteyre A., Barc M., Collignon A., Boureau H., Karjalainen T. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun.* 2001. № 69. P. 7937–7940

5. Waligora A., Hennequin C., Mullany P., Bourlioux P., Collignon A., Karjalainen T. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect Immun*. 2001. № 69. P. 2144–2153
6. Leffler D. A., Lamont J. T. *Clostridium difficile* infection. *N. Engl. J. Med.* 2015. № 373. P. 287–288.
7. Carman R.J., Stevens A.L., Lyerly M.W., Hiltonsmith M.F., Stiles B.G., Wilkins T.D. *Clostridium difficile* binary toxin (CDT) and diarrhea. *Anaerobe*. 2011. № 17. P. 161–165. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.02.005
8. Jank T., Belyi Y., Aktories K. Bacterial glycosyltransferase toxins. *Cell. Microbiol.* 2015. № 17. P. 1752–1765. doi: 10.1111/cmi.12533.
9. Högenauer C., Hammer H. F., Krejs G. J., Reisinger E. C., Voth D. E., Ballard J. D. *Clostridium difficile* toxins: Mechanism of action and role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005. № 18. P. 247–263. doi: 10.1128/CMR.18.2.247-263.2005.
10. Lyerly D.M., Saum K.E., MacDonald D.K., Wilkins T.D. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect. Immun.* 1985. № 47. P. 349–352.
11. *Clostridium difficile* Toxins A and B: Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects. *Toxins (Basel)*. 2016. № 3. doi: 10.3390/toxins8050134. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27153087>
12. Jank T., Giesemann T., Aktories K. Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. *Glycobiology*. 2007. № 17. P. 15–22.
13. Schirmer J., Aktories K. Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins. *Biochim Biophys Acta*. 2004. № 1673. P. 66–74.
14. Voth D., Ballard J. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol.* 2005. Rev 18. P. 247–263
15. Fiorentini C., Fabbri A., Falzano L., Fattorossi A., Matarrese P., Rivabene R., et al. *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infect Immun*. 1998. № 66. P. 2660–2665.
16. Carter G. P., Chakravorty A., Nguyen T. A. P. et al. Defining the roles of tcdA and tcdB in localized gastrointestinal disease, systemic organ damage, and the host response during *Clostridium difficile* infections. *MBio*. 2015. doi: 10.1128/mBio.00551
17. Tretyakov V.A., Chervonskaya G.P., Andreeva Z.M. et al. Determination of the biological activity of *Clostridium difficile* toxins in in vivo and in vitro experiments. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1987. No. 6. S. 11-15.
18. Ashmarin I.P., Vorobyov A.A. Statistical methods in microbiological research. L.: “MEDGIZ”, 1962. 179 p.
19. Muthannan Andavar Ramakrishnan. Determination of 50% endpoint using a simple formula. *World J Virol*. 2016. Vol. 12. № 5(2). P. 85–86. doi: [10.5501/wjv.v5.i2.85]
20. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg, 18.III.1986. URL : <https://www.coe.int/ru/web/conventions/fulllist/conventions/rms/090000168007a67b>
21. Scientific and practical advice on the content of laboratory animals and to work with them: Monograph / YM Kozhemyakin, A. Khromov, NE Boldyrev, NV dobrela, GA Sayfedinova. Kiev Interservis, 2017. 182 p.