

Поступила 28.08.2022
Принята в печать 19.01.2023
Опубликована 30.08.2023

PREVENTION OF INFECTIOUS DISEASES

© AUTHORS, 2023

Marina F. Sukhina^{1,2}, Sergei M. Yudin², Angelika V. Zagaynova²

Prevention of nosocomial diarrhea using autostrains of lactobacilli isolated from wastewater and from the intestinal biotope of patients

¹Centre for Strategic Planning, Moscow, 119121, Russian Federation;

²Ryzhikh National Medical Research Centre for Coloproctology, Moscow, 123423, Russian Federation

Introduction. The work is devoted to evaluating the results of own studies on the possibility of using autostrains of lactobacilli isolated from wastewater and the intestinal biotope of patients, based on their antagonistic properties to prevent of nosocomial diarrhea associated with toxigenic *Clostridioides difficile*. *There are presented results of studies on an animal model of antibiotic-associated diarrhea to determine the effectiveness of lactobacilli when eliminating toxigenic C. difficile.*

Materials and methods. Studies were conducted on the antagonistic activity of clinical cultures of lactobacilli isolated from wastewater and intestinal biotope of patients against toxigenic strains of *C. difficile* isolated from patients with nosocomial diarrhea. Preclinical tests of the efficacy of the selected highly antagonistically active strain of *Lactobacillus paracasei* CTR079 *in vivo* were carried out in an animal model of *C. difficile*-associated infection in mice of the C57BL line.

Results. As a result of the studies, lactobacilli with high, medium, and without antagonistic activity were isolated. Antagonistically inactive strains were unable to inhibit the growth of *C. difficile*, unlike highly active strains. A strain of *Lactobacillus paracasei* CTR079 was selected to study the possibility of its use as a probiotic strain for the prevention and treatment of *C. difficile* associated infection in an *in vivo* experiment. Various changes in the intestinal epithelium as a result of the development of *C. difficile*-associated infection.

Limitations of the study. As part of the study, all isolated strains of lactobacilli were identified and stored for the study of biological, genetic properties, and production of bacteriocins.

Conclusion. As a result of the studies, the use of highly active strains of lactobacilli was established to be a promising direction for the prevention and treatment of nosocomial diarrhea, which will reduce the spread of *C. difficile* among patients and in the environment of medical institutions.

Keywords: *antagonistic activity; lactobacilli; antibiotic-associated diarrhea; nosocomial diarrhea; C. difficile-associated infection; Lactobacillus paracasei; Clostridioides difficile*

Compliance with ethical standards: conducting research on animals is approved by the local Ethical Committee on Bioethics of the Federal Scientific Center “All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary named after K.I. Scriabin and Y.R. Kovalenko” of the Russian Academy of Sciences, the study was conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Experiments or Other Scientific Purposes (ETS N 123), Directive of the European Parliament and the Council of the European Union 2010/63/EC dated 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Protocol No. 2 of 16.07.2020).

For citation: Sukhina M.A., Yudin S.M., Zagaynova A.V. Prevention of nosocomial diarrhea using autostrains of lactobacilli isolated from wastewater and from the intestinal biotope of patients. *Zdravookhranenie Rossiiskoi Federatsii (Health Care of the Russian Federation, Russian journal)*. 2023; 67(4): 306–312. <https://doi.org/10.47470/0044-197X-2023-67-4-306-312> <https://elibrary.ru/revmre> (in Russian)

For correspondence: Marina A. Sukhina, MD, PhD, leading researcher at the microbiology and parasitology laboratory in the Centre for Strategic Planning, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: marinasukhina@rambler.ru

Information about the authors:

Sukhina M.A., <https://orcid.org/0000-0003-4795-0751>

Yudin S.M., <https://orcid.org/0000-0003-2199-8474>

Zagaynova A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4772-9686>

Contribution of the authors: Sukhina M.A. — research concept and design, data collection and processing, statistical processing, text writing, editing; Yudin S.M. — editing; Zagaynova A.V. — research concept and design, statistical processing. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of its final version.

Acknowledgment. The study was carried out as part of the research work of the state task «Study of the prevalence, pathogenicity factors and mechanisms of antibacterial resistance of *Clostridioides difficile*» State Registration N AAAA-A21-121012100073-8, «The effectiveness of the use of lactobacteria bacteriocins to combat multiresistant microorganisms associated with inflammatory diseases of the colon» State registration number AAAA-A18-118122900073-2; state task No. 388-00099-23-02 within the framework of the implementation of applied research work on the topic: “Creation of a method for the treatment of antibiotic-associated diarrhea using autotransplantation of microaerophilic and obligate anaerobic bacteria of the large intestine” (code: “Autotransplantation”) and state contract «Development of unified methods, including sampling, for the determination of microbiological and parasitological pollution of wastewater» (code «Wastewater») N. 145.001.21.6 dated 12.11.2021.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: August 28, 2022

Accepted: January 19, 2023

Published: August 30, 2023

Введение

Инфекции, ассоциированные с *Clostridioides difficile*, продолжают оставаться одной из серьёзных проблем общественного здравоохранения во всём мире [1, 2]. В стационарах Европы *C. difficile* является возбудителем 48% гастроинтестинальных инфекций, 20% из которых протекают тяжело, 10% осложняются колэктомией, смертность достигает 4%, а частота рецидивов — более 25% [3]. С 2019 г. вынужденное иррациональное применение антибактериальных препаратов у пациентов с новой коронавирусной инфекцией спровоцировало рост антибиотик-ассоциированных диарей, этиологическим агентом которых является грампозитивная спорообразующая облигатно анаэробная бактерия *C. difficile*. Данные по мониторингу за *C. difficile*-ассоциированной инфекцией (CDI) в России до настоящего времени не представлены [4]. Медицинские организации являются сегодня основными источником распространения токсигенной *C. difficile* в связи с применением антибактериальных препаратов, лёгкостью передачи возбудителя инфекции через объекты больной среды из-за их высокой устойчивости к стандартным средствам дезинфекции. Ситуация осложняется высоким уровнем носительства *C. difficile* среди населения. В этой связи особую важность приобретают санитарно-эпидемиологические мероприятия, снижающие заболеваемость *C. difficile*-ассоциированным колитом [5, 6].

Среди госпитализированных взрослых частота CDI, связанных с оказанием медицинской помощи, варьирует от 0,3 до 78 случаев на 1000 госпитализированных в зависимости от профиля отделения и меняется из года в год в одной и той же медицинской организации [7].

N. Al Saif и соавт. при изучении контаминации *C. difficile* больничных помещений обнаружили его в 20% смывов с поверхности полов, столов, стульев, тумбочек, ковров, штор, окон и в ванных комнатах. Почти все выделенные культуры (94,7%) были токсигенными [8]. Учитывая высокое медико-социальное значение заболевания, необходима разработка новых методов лечения CDI для быстрой иррадикации патогена. Перспективным направлением в профилактике и лечении CDI является разработка методик применения аутоштаммов *Lactobacillus* spp. с лабораторной оценкой их антагонистической активности.

Целью работы было изучение воздействия аутоштаммов лактобактерий (ЛБ) на штаммы *C. difficile*, изолированные из сточной воды и от пациентов, поступающих на стационарное лечение, а также пациентов с антибиотик-ассоциированных диарей и оценка эффективности применения ЛБ для лечения CDI на животной модели.

Материал и методы

В исследовании были использованы штаммы клинических культур ЛБ, выделенных из кишечного биотопа пациентов, и ЛБ, выделенные из сточных вод Курьяновской станции аэрации на этапе очистки до аэротенков. В качестве эталонного штамма-антагониста использовали *Lactobacillus plantarum* 38 («Лактобактерин сухой», «Микроген»). От пациентов с CDI изолировали 310 штаммов *C. difficile*. Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью времяпролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией/ионизацией MALDI-TOF MicroFlex с программным обеспечением «Maldi BioTyper v. 3.0» («Bruker Daltonics») методом экстракции рибосомальных белков. Для всех трудно идентифицируемых штаммов (при значении Score

< 2,0) проводили секвенирование последовательностей гена *16S* рРНК. Для секвенирования использовали два фрагмента ДНК: ампликон длиной ~ 440 п. н., соответствующий позициям 339–785 гена *16S* рРНК, и ампликон длиной ~ 1340 п. н., соответствующий позициям 42–1380 гена *16S* рРНК. Секвенирование осуществляли на приборе «MiSeq» («Illumina»). Для оценки антагонистической активности ЛБ применяли метод двухэтапного культивирования микроорганизма-антагониста и тестируемой культуры в условиях комбинированной системы [9]. Доклинические исследования проводили на 96 здоровых молодых половозрелых особях мышей линии C57BL одного возраста (8 нед) и массы (14–16 г, составляющей $\pm 20\%$ от средней массы) [10].

Для подтверждения действия ЛБ для лечения и профилактики CDI были проведены доклинические испытания эффективности штамма *L. paracasei* CTR079 *in vivo*, создана животная модель CDI на мышах линии C57BL. Для этого перед заражением мышей *C. difficile*, изолированными от пациентов с CDI, проводили запаивание мышей антибактериальным препаратом группы фторхинолонов II поколения ципрофлоксацином (2 мг/мл). Через 2 сут после последнего введения ципрофлоксацина проводили заражение животных токсигенной *C. difficile* в концентрации 10^9 КОЕ/мл бактериальных клеток. Введение токсигенной культуры продолжали в течение 5 сут ежедневно, каждый день фиксировали вес животных, исследовали фекалии на предмет инфицирования токсигенными *C. difficile*. Наблюдение за экспериментальными животными после введения дозы проводили индивидуально ежедневно в течение всего периода эксперимента.

Для подтверждения «чистоты» лабораторных животных устанавливали их микробиологический статус с учётом подтверждения неизменности микробиологического статуса животных контрольной группы по сравнению с ожидаемыми показателями в опытных группах, а также с учётом наличия в кале *C. difficile*.

Были сформированы две группы мышей для оценки безопасности и эффективности отобранного антагонистически активного штамма *Lactobacillus paracasei* CTR079, выделенного из кишечного биотопа пациента: мыши, которые не подверглись заражению *C. difficile*; мыши, которые подверглись заражению *C. difficile*. Каждая группа была разделена на 4 подгруппы по 12 особей:

- подгруппа 1 — 12 мышей запаивали стерильной водой (контроль 1);
- подгруппа 2 — 12 мышей запаивали взвесью *L. paracasei* CTR079;
- подгруппа 3 — 12 мышей запаивали раствором ванкомицина (контроль 2);
- подгруппа 4 — 12 мышей запаивали препаратом «Лактобактерин» («Микроген») (контроль 3).

По окончании эксперимента были проведены микробиологическое и молекулярно-генетическое исследования аутопсийного материала.

Экспериментальных животных содержали в условиях вивария в соответствии с требованиями, указанными в нормативной документации [11–14]. В помещении, где содержались лабораторные животные, поддерживались соответствующие параметры микроклимата [14]. Животных кормили комбикормом полнорационным экструдированным для лабораторных животных; поение осуществляли стерильной водопроводной водой из стандартных поилок. Суспензии с микроорганизмами вводили мышам разных групп многократно внутрижелудочно с использованием

одноразовых пластиковых стерильных зондов в объёме 0,1 мл/10 г массы тела. Фиксировали изменения массы тела мышей. Процедуры, проводимые животным, были безболезненными и не требовали обезболивания.

Для умерщвления животных применяли метод эвтаназии с ингаляцией CO₂, обладающим быстрым успокаивающим, болеутоляющим и анестезирующим эффектом [15, 16].

Для статистической оценки использовали программу Statistica. Проводили оценку соответствия ряду математических распределений с применением модуля Distribution fitting, в том числе нормальность распределения определяли по методу Колмогорова–Смирнова, размер выборки рассчитывали на основе статистической мощности методом χ^2 . Если распределение данных в двух зависимых выборках отличалось от «нормального», для их сравнения использовали тест Вилкоксона. Тест Стьюдента и его непараметрические аналоги применяли для сравнения двух выборок, дисперсионный анализ Фридмана (Friedman ANOVA) — для взаимосвязанных (зависимых) выборок (например, изменение показателей биохимии крови и состава микробиоты по ЛБ). Для экспериментальных данных, у которых из-за небольшого объёма выборки ($n \leq 8$) отсутствовала возможность сделать выводы относительно типа распределения, использовали непараметрический дисперсионный анализ Крускала–Уоллиса.

Результаты

Изучено антагонистическое влияние 100 штаммов, принадлежащих к видам *L. fermentum* (11), *L. paracase* (36), *L. oris* (1), *L. casei* (1), *L. agilis* (1), *L. plantarum* (6), *L. rhamnosus* (28), *L. zeae* (2), *L. brevis* (4), *L. gasseri* (2), *Lactococcus garvieae* (4), *L. salivarius* (2), *Lactococcus lactis* (2), изолированных из сточных вод и просветных фекалий пациентов, находящихся на лечении в стационаре, в отношении 310 штаммов *C. difficile*.

При исследовании антагонистической активности ЛБ по отношению к токсигенной *C. difficile* показано, что антагонистически неактивные ЛБ не способны подавлять рост *C. difficile*, в отличие от высокоактивных. Контрольный штамм LP-K в большей степени (71%) демонстрировал высокий уровень антагонистической активности. Штаммы *L. paracasei* CTR079, *L. rhamnosus* 215, *L. paracasei* 625, *L. rhamnosus* 32 проявляли максимально высокую антагонистическую активность в отношении токсигенных штаммов *C. difficile* ($Me = 34,2$ (21,5; 45); табл. 1).

Штамм *L. paracasei* CTR079 обладал наиболее высокой антагонистической активностью, подавлял рост 98% штаммов *C. difficile*. В ходе эксперимента была проведена оценка выживаемости мышей после введения антибактериального препарата ципрофлоксацина, токсигенной культуры *C. difficile* и потенциально пробиотических штаммов микроорганизмов в сравнении с контрольными группами животных. Во всех группах не было отмечено гибели животных (табл. 2), за исключением подгруппы 3 мышей с CDI ($n = 12$), которых лечили раствором ванкомицина (чаще всего используемого в клинической практике для лечения пациентов с CDI) — на 2-е сутки после введения антибиотика погибли 4 особи, а остальные 8 особей были крайне неактивными. Из аутопсийного материала павших особей изолировалась токсигенная *C. difficile*.

Перед началом эксперимента у всех мышей определяли массу тела, затем каждый день эксперимента перед

Таблица 1. Антагонистическая активность лактобактерий по зоне задержки роста в токсигенных штаммах *C. difficile*

Table 1. Antagonistic activity of lactobacilli in the zone of growth retardation in toxigenic *C. difficile* strains

Низкая (5–20 мм) Low (5–20 mm)	Средняя (21–29 мм) Medium (21–29 mm)	Высокая (более 30 мм) High (more than 30 mm)
<i>L. casei</i> 499	<i>L. brevis</i> 340/2	<i>L. paracasei</i> CTR079
<i>L. paracasei</i> 415	<i>L. paracasei</i> 391	<i>L. rhamnosus</i> 215
<i>L. paracasei</i> 789	<i>L. brevis</i> 820	<i>L. paracasei</i> 625
<i>L. fermentum</i> 516	<i>L. paracasei</i> 15	<i>L. rhamnosus</i> 32
<i>L. paracasei</i> 416/1	<i>L. agilis</i> 70	<i>L. brevis</i> 174
<i>L. paracasei</i> 887	<i>L. rhamnosus</i> 214	<i>L. brevis</i> 3
<i>L. zeae</i> 215	<i>L. paracase</i> 610	<i>L. garvieae</i> 363
<i>L. zeae</i> 877	<i>L. plantarum</i> 244/2	<i>L. garvieae</i> 668
<i>L. plantarum</i> K	<i>L. rhamnosus</i> 103	<i>L. paracasei</i> CTR083
<i>L. rhamnosus</i> 341	<i>L. plantarum</i> 825	<i>L. paracasei</i> 720
<i>L. paracasei</i> 801	<i>L. rhamnosus</i> 66	<i>L. paracasei</i> 245
<i>L. rhamnosus</i> 816	<i>L. fermentum</i> 349	<i>L. rhamnosus</i> 193
<i>L. paracasei</i> 186	<i>L. fermentum</i> 400	<i>L. paracasei</i> 824
<i>L. paracasei</i> 215	<i>L. paracasei</i> 243	<i>L. rhamnosus</i> 19
<i>L. paracasei</i> 861	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. rhamnosus</i> 400
	<i>rhamnosus</i> CTR00172	<i>L. rhamnosus</i> 775
	<i>L. paracasei</i> 1080	<i>L. paracasei</i> 416/1
	<i>L. rhamnosus</i> 239/1	<i>L. paracasei</i> 494
	<i>L. rhamnosus</i> 849	<i>L. oris</i> 73;
	<i>L. rhamnosus</i> 768	<i>L. paracasei</i>
	<i>L. paracasei</i> 340/1	CTR00179ZS
	<i>L. paracasei</i> 265	<i>L. paracasei</i> 641
	<i>L. paracasei</i> 823	<i>L. rhamnosus</i>
	<i>L. paracasei</i> 96	CTR00210
	<i>L. paracase</i> 542	<i>L. rhamnosus</i> 734
	<i>L. fermentum</i> 58	<i>L. fermentum</i> 366
	<i>L. rhamnosus</i> 509	<i>L. fermentum</i> 670
	<i>L. rhamnosus</i> 1204	<i>L. plantarum</i> 203
	<i>L. rhamnosus</i> 815	<i>L. plantarum</i> 1193
	<i>L. rhamnosus</i> 463	
	<i>L. garvieae</i> IBD01	
	<i>L. garvieae</i> 723	
	<i>L. plantarum</i> 400	
	<i>L. plantarum</i> 349	
	<i>L. salivarius</i> 489	
	<i>L. rhamnosus</i> 258	
	<i>L. rhamnosus</i> CTR083	
	<i>L. rhamnosus</i> 633	
	<i>L. paracasei</i>	
	CTR163ZA	
	<i>L. paracasei</i> 643	
	<i>L. paracase</i> 101	
	<i>L. paracase</i> 892	
	<i>L. gasseri</i> 341/2	
	<i>L. paracasei</i> 1168	
	<i>L. gasseri</i> 720	
	<i>L. paracasei</i> 1137	
	<i>L. rhamnosus</i> 241/2	
	<i>L. rhamnosus</i> 879	
	<i>L. paracasei</i> IBD02	
	<i>L. paracasei</i> 523	
	<i>L. rhamnosus</i> 860	
	<i>L. fermentum</i> 520	
	<i>L. fermentum</i> 535	
	<i>L. fermentum</i> 547	
	<i>L. rhamnosus</i> 214	
	<i>L. rhamnosus</i> 679	
	<i>L. fermentum</i> 547	
	<i>L. salivarius</i> 89	

Таблица 2. Оценка выживаемости мышей
Table 2. Mice Survival Assessment

Группа мышей Group of mice	Количество павших особей The number of fallen individuals		
	ципрофлокса- цин ciprofloxacin	<i>C. difficile</i>	основной эксперимент basic experiment
<i>Животные без CDI Animals without CDI</i>			
Подгруппа 1 Subgroup 1	0	0	0
Подгруппа 2 Subgroup 2	0	0	0
Подгруппа 3 Subgroup 3	0	0	0
подгруппа 4 Subgroup 4	0	0	0
<i>Животные с CDI Animals with CDI</i>			
Подгруппа 1 Subgroup 1	0	0	0
Подгруппа 2 Subgroup 2	0	0	0
Подгруппа 3 Subgroup 3	0	0	4
Подгруппа 4 Subgroup 4	0	0	0

очередным запаиванием проводили контроль массы тела животных. Изменения массы тела животных представлены в табл. 3.

При проведении патоморфологического исследования аутопсийного материала, полученного от мышей, органы-комплексы исследовали тотально. Наиболее выраженные изменения в кишечном эпителии наблюдались в тонкой кишке (рис. 1), в толстой кишке изменения слизистой были менее выражены.

В подгруппе 3 мышей с CDI в толстой и тонкой кишке типичная патоморфологическая картина характеризовалась на значительном протяжении выраженными аутолитическими изменениями с полным разрушением слизистой и мышечного слоя, в сохранённых участках слизистая тонкой кишки с выраженной десквамацией поверхностного эпителия, некробиотическими изменениями вершечек ворсин; в сохранённых участках слизистой

Таблица 3. Оценка массы тела животных, участвующих в эксперименте
Table 3. Estimation of the body weight of the animals participating in the experiment

Группа мышей Group of mice	Количество павших особей The number of fallen individuals		
	ципрофлокса- цин ciprofloxacin	<i>C. difficile</i>	основной эксперимент basic experiment
<i>Животные без CDI Animals without CDI</i>			
Подгруппа 1 Subgroup 1	19,7	22,3	24,2
Подгруппа 2 Subgroup 2	20,4	22,4	24,1
Подгруппа 3 Subgroup 3	19,7	21,8	24,0
подгруппа 4 Subgroup 4	19,7	22,1	24,0
<i>Животные с CDI Animals with CDI</i>			
Подгруппа 1 Subgroup 1	19,7	21,6	22,2
Подгруппа 2 Subgroup 2	20,4	21,8	22,4
Подгруппа 3 Subgroup 3	19,7	21,6	21,9
Подгруппа 4 Subgroup 4	19,7	21,0	21,6

толстой кишки определялись участки десквамации поверхностного эпителия и эпителия части крипт (рис. 2).

Патоморфологическая картина тонкой и толстой кишки мышей с CDI, которые пали на 2-е сутки введения ванкомицина, представлена на всём протяжении выраженными аутолитическими изменениями с полным разрушением слизистой и мышечного слоя. В подгруппах 1 и 3 группы с CDI наблюдались умеренные дистрофические и реактивные изменения поверхностного эпителия, в просвете кишки определялось большое количество содержимого, скопления десквамированного эпителия. В то же время в группе с CDI, запаиваемой взвесью *L. paracasei* CTR079, изменения слизистой кишки были минимальными. Структура слизистой тонкой и толстой кишки была сохранена на всём протяжении. Признаков воспаления на всём протяжении кишки не обнаружено.

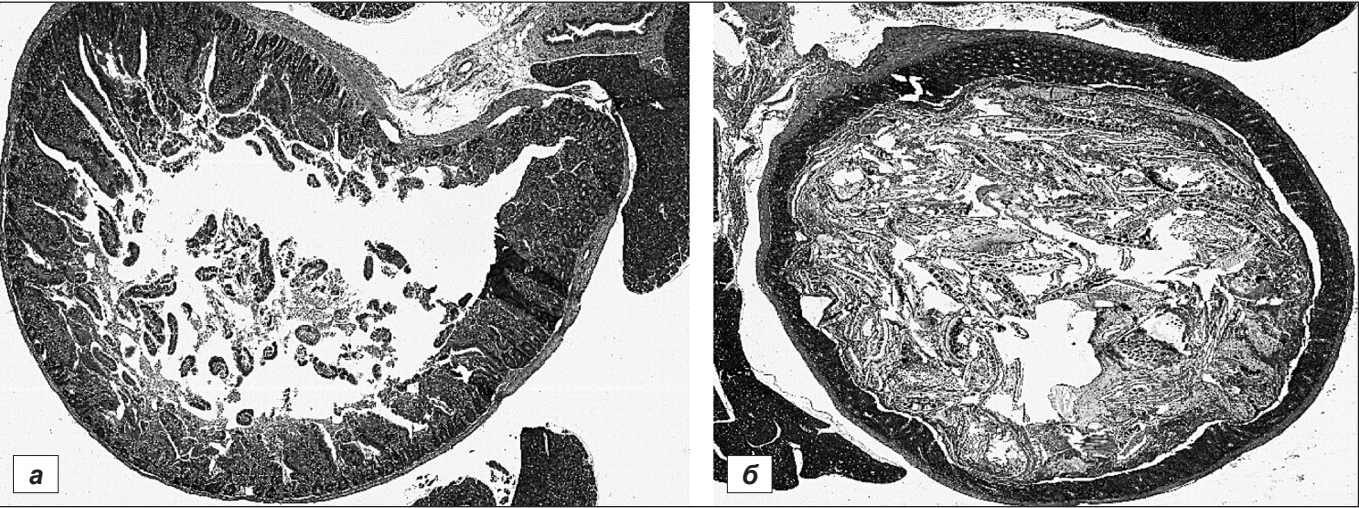


Рис. 1. Патоморфологическое исследование аутопсийного материала, полученного от мышей.
a — тонкая кишка; *б* — толстая кишка (мыши с CDI, получавшие стерильную воду).
Fig. 1. Pathomorphological study of autopsy material obtained from mice
a — small intestine; *б* — large intestine (subgroup 1 of animals with CDI).

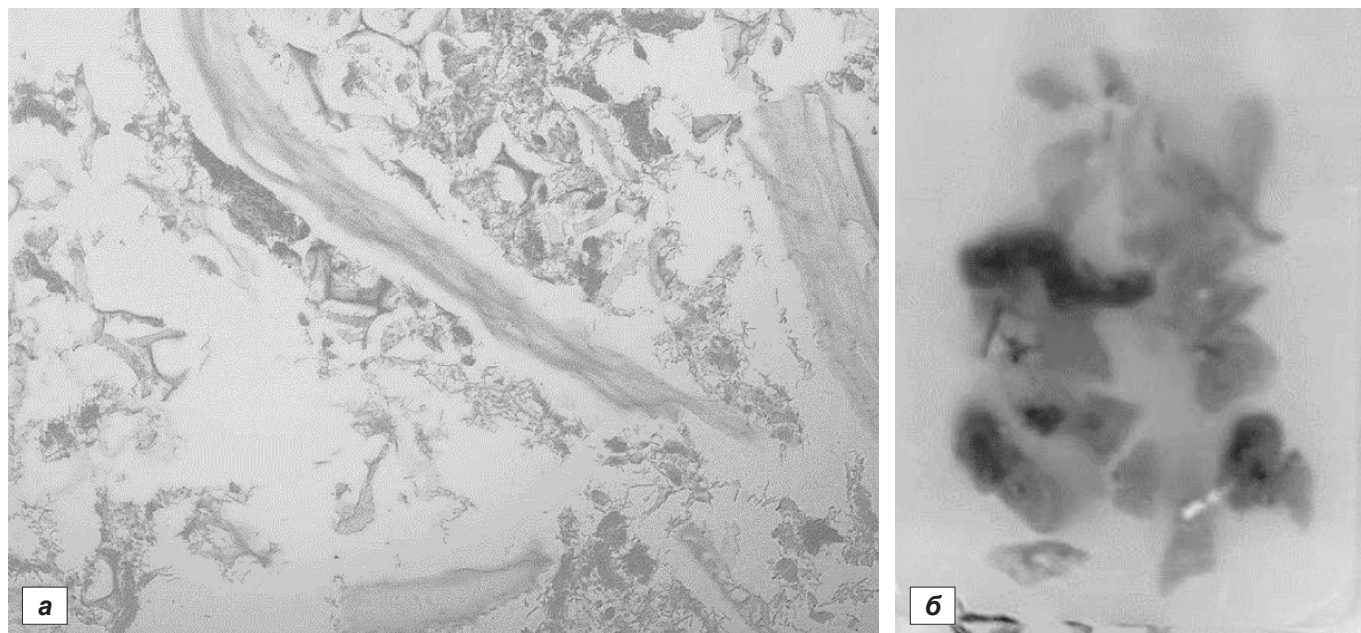


Рис. 2. Патоморфологическое исследование аутопсийного материала от мышей с CDI, получавших лечение ванкомицином:
а — микроскопия; б — парафиновый блок.

Fig. 2. Pathological examination of autopsy material obtained from CDI mice received treatment with vancomycin:
а — microscopy; б — paraffin block.

Результаты микробиологического исследования аутопсийного материала. Первичный микробный пейзаж кала во всех группах мышей был представлен видами *Enterococcus faecium* (1×10^5 КОЕ/г), *L. murinus* (1×10^8 КОЕ/г). Через 10 дней после начала эксперимента в группе мышей с CDI из кала изолировалась токсигенная *C. difficile* (1×10^5 КОЕ/г). При микробиологическом исследовании аутопсийного биоматериала не выделено токсигенной *C. difficile* у мышей с CDI, которые запаивались взвесью *L. paracasei* CTR079. В подгруппе 3 на 2-е сутки пали 4 (33,3%) мыши, в аутопсийном материале которых были изолированы токсинпродуцирующие *C. difficile*.

Обсуждение

Патогенез CDI включает нарушение нормальной микрофлоры толстой кишки и колонизацию её токсигенными штаммами *C. difficile*. В группе мышей с CDI наблюдался дефицит массы тела, в среднем на 2 г, диарея, а также признаки воспаления кишки в аутопсийном материале, в группе без CDI таких изменений не наблюдалось.

При проведении патоморфологического исследования аутопсийного материала, полученного от мышей с антибиотик-ассоциированной диареей и получавших взвесь *L. paracasei* CTR079, не обнаружено изменений слизистой кишки, структура слизистой сохранена на всём протяжении, и мы наблюдали лишь участки умеренных дистрофических и реактивных изменений поверхностного эпителия без признаков воспаления, что указывает на эффективность применения штамма *L. paracasei* CTR079 для иррадиации токсигенной *C. difficile*. Ещё одним неоспоримым доказательством эффективности действия штамма *L. paracasei* CTR079 является отсутствие токсинпродуцирующих *C. difficile* при микробиологическом исследовании аутопсийного биоматериала, полученного от мышей, которых запаивали взвесью *L. paracasei* CTR079, в отличие от других групп, не получающих взвесь пробиотического штамма *L. paracasei* CTR079.

Ограничение исследований. В рамках проведённого исследования были проведены исследования на 96 здоровых молодых половозрелых особях мышей линии C57BL одного возраста (8 нед) и массы (14–16 г), что представляет собой достаточную референтную выборку. Все выделенные штаммы тестированных микроорганизмов идентифицированы и сохранены для изучения биологических, генетических свойств и продукции бактериоцинов.

Заключение

На сегодняшний день создание новых антибактериальных препаратов не приводит к продолжительным успехам в борьбе с CDI. Учитывая широкую распространённость токсигенной *C. difficile*, долгосрочную и дорогостоящую разработку новых антибактериальных препаратов и дезинфицирующих средств, перспективным направлением является использование аутоштаммов *Lactobacillus* spp. для профилактики нозокомиальных диарей и снижения распространения клостридий в окружающей среде лечебных учреждений. По степени выраженности антагонистической активности и по её спектру штаммы с пробиотической активностью демонстрировали как видовые, так и штаммовые различия. По окончании эксперимента тотальное патоморфологическое исследование аутопсийного материала показало различные изменения в кишечном эпителии, которые позволяют судить о степени поражения слизистой кишки вследствие развития CDI. Микробиологическое исследование аутопсийного биоматериала подтверждает эффективность применения нового пробиотического штамма *L. paracasei* CTR079 для иррадиации токсигенной *C. difficile* у мышей.

Полученные нами данные доклинического исследования высокоантагонистически активного штамма *L. paracasei* CTR079 подтверждают эффективность и безопасность его применения на животной модели CDI.

Использование высокоактивных штаммов ЛБ даст возможность снизить распространённость инфекций, ассоциированных с клостридиями, особенно с *C. difficile*.

ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 1–3, 5, 7, 8 см. References)

4. Дмитриева Н.В., Клясова Г.А., Бакулина Н.В., Сухина М.А., Журавель С.В., Белоусова Е.А. и др. Распространённость *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи у госпитализированных больных (Результаты Российского проспективного многоцентрового исследования). *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(4): 268–74. <https://elibrary.ru/yqcyiu>
6. Ачкасов С.И., Сухина М.А., Сушков О.И., Фролов С.А., Кашников В.Н., Сафин А.Л. и др. Этиологическая структура антибиотико-ассоциированной диареи у пациентов с заболеваниями толстой кишки. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2018; (12): 33–9. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-160-12-33-39> <https://elibrary.ru/jofmbf>
9. Сухина М.А., Жуховицкий В.Г., Шелыгин Ю.А. Способ оценки антагонистической активности лактобактерий толстокишечного биотопа пациента относительно разнообразных бактерий двухэтапным культивированием микроорганизма-антагониста и тестируемой культуры в условиях комбинированной системы. Патент РФ № 2670585 C1; 2018.
10. Хабриев Р.У., ред. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина; 2005.
11. Каркищенко Н.Н. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях*. М.; 2010.
12. ГОСТ 33216–2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. М.: Стандартинформ; 2016.
13. ГОСТ 33215–2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. М.: Стандартинформ; 2016.
14. СП 2.2.1.3218–14. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). М.; 2014.
15. ГОСТ 33215–2014. Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными правила оборудования помещений и организации процедур. М.; 2014.
16. Рыбакова А.В., Макарова М.Н. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63/EU. *Международный вестник ветеринарии*. 2015; (2): 96–107. <https://elibrary.ru/ulgmxc>
- difficile infection: the views of European healthcare professionals at the front line. *J. Hosp. Infect.* 2015; 90(2): 117–25. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.03.001>
4. Dmitrieva N.V., Klyasova G.A., Bakulina N.V., Sukhina M.A., Zhuravel' S.V., Belousova E.A., et al. A prevalence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients (results of a Russian prospective multicenter study). *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19(4): 268–74. <https://elibrary.ru/yqcyiu> (in Russian)
5. Surawicz C.M., Brandt L.J., Binion D.G., Ananthakrishnan A.N., Curry S.R., Gilligan P.H., et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am. J. Gastroenterol.* 2013; 108(4): 478–98; quiz 499. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.4>
6. Achkasov S.I., Sukhina M.A., Sushkov O.I., Frolov S.A., Kashnikov V.N., Safin A.L., et al. Etiological structure of antibiotic-associated diarrhea in patients with large intestine diseases. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2018; (12): 33–9. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-160-12-33-39> <https://elibrary.ru/jofmbf> (in Russian)
7. Kaus G.M., Snyder L.F., Müh U., Flores M.J., Popham D.L., Ellermeier C.D. Lysozyme resistance in *Clostridioides difficile* is dependent on two peptidoglycan deacetylases. *J. Bacteriol.* 2020; 202(22): e00421–20. <https://doi.org/10.1128/JB.00421-20>
8. Al Saif N., Brazier J.S. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J. Med. Microbiol.* 1996; 45(2): 133–7. <https://doi.org/10.1099/00222615-45-2-133>
9. Sukhina M.A., Zhukhovitskiy V.G., Shelygin Yu.A. A method for assessing the antagonistic activity of lactobacilli in the colonic biotope of a patient relative to various bacteria by two-stage cultivation of an antagonist microorganism and a test culture under conditions of a combined system. Патент РФ № 2670585 C1; 2018. (in Russian)
10. Khabriev R.U., ed. *Guidelines for the Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]*. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
11. Karkishchenko N.N. *Guide to Laboratory Animals and Alternative Models in Biomedical Technologies [Rukovodstvo po laboratornym zhitovnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh tekhnologiyakh]*. Moscow; 2010. (in Russian)
12. GOST 33216–2014. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for the maintenance and care of laboratory rodents and rabbits. Moscow: Standartinform; 2016. (in Russian)
13. GOST 33215–2014. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules of equipment of premises and organization of procedures. Moscow: Standartinform; 2016. (in Russian)
14. SP 2.2.1.3218–14. Sanitary and epidemiological requirements for the device, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivariums). Moscow; 2014. (in Russian)
15. GOST 33215–2014. Interstate standard. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals rules for the equipment of premises and organization of procedures. Moscow; 2014. (in Russian)
16. Rybakova A.V., Makarova M.N. Methods of euthanasia of laboratory animals, in accordance with European Directive 2010/63. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii*. 2015; (2): 96–107. <https://elibrary.ru/ulgmxc> (in Russian)

REFERENCES