

# *Clostridioides difficile* – возбудитель антибиотик-ассоциированной диареи и псевдомембранозного колита

Б.В.Ерусланов, Э.А.Светоч, И.П.Мицевич, Н.К.Фурсова

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Обзор посвящен особенностям биологии возбудителя *Clostridioides difficile*-инфекции, позволяющим ему персистировать в организме человека, длительно сохраняться во внешней среде и вызывать тяжелые поражения толстого кишечника у больных пациентов. Представлены данные о морфологии, структуре и функциях S-слоя и других макромолекулах клеточной стенки микроба. Рассматриваются процессы спорообразования и прорастания спор, их строение, а также процесс образования биопленки. Описаны токсины TcdA, TcdB и CDT: их структура, генетический контроль и молекулярные механизмы поражающего действия. Дана характеристика генома и мобильных генетических элементов (МГЭ) *C. difficile*, описано их участие в изменчивости, адаптации и эволюции патогена. Представлены данные об антибиотикорезистентности *C. difficile* и роли МГЭ в ее распространении среди *C. difficile*. Подробно описан патогенез инфекции. Уникальные свойства патогена свидетельствуют о его весьма высоком патогенном потенциале и больших трудностях борьбы с ним.

**Ключевые слова:** *Clostridioides difficile*, псевдомембранозный колит, патогенез, токсины, мобильные генетические элементы

**Для цитирования:** Ерусланов Б.В., Светоч Э.А., Мицевич И.П., Фурсова Н.К. *Clostridioides difficile* – возбудитель антибиотик-ассоциированной диареи и псевдомембранозного колита. Бактериология. 2022; 7(2): 50–63. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-50-63

## *Clostridioides difficile* is the causative agent of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis

B.V.Eruslanov, E.A.Svetoch, I.P.Mitsevich, N.K.Fursova

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The review is devoted to the peculiar properties of the agent for *Clostridioides difficile*-infection, allowing persisting in the human body for a long time as well as in the extremal environments and causing the severe lesions of the colon in the patients. Data on morphology, structure and functions of the S-layer and other macromolecules of the microbe cell wall are presented. The processes of spore formation and germination, their structure as well as the process of biofilm formation are considered. The toxins TcdA, TcdB and CDT are described: structure, genetic control and molecular mechanisms of action. The genome and mobile genetic elements (MGE) of *C. difficile*, their participation in the variability, adaptation, and evolution of the pathogen are characterized. Data on the antibiotic resistance of *C. difficile* and role of MGE in *C. difficile* dissemination are presented. The pathogenesis of the infection is described in detail. The unique properties indicate high pathogenic potential and the great difficulties to combat *C. difficile*.

**Key words:** *Clostridioides difficile*, pseudomembranous colitis, pathogenesis, toxins, mobile genetic elements

**For citation:** Eruslanov B.V., Svetoch E.A., Mitsevich I.P., Fursova N.K. *Clostridioides difficile* is the causative agent of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. Bacteriology. 2022; 7(2): 50–63. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-50-63

### Для корреспонденции:

Фурсова Надежда Константиновна, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
Телефон: (4967) 36-0079  
E-mail: fursova@ obolensk.org

Статья поступила 11.05.2022 г., принята к печати 30.06.2022 г.

### For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0079  
E-mail: fursova@ obolensk.org

The article was received 11.05.2022, accepted for publication 30.06.2022

**C***lostridioides difficile* – возбудитель тяжелой нозокомиальной (госпитальной) инфекции, *C. difficile*-инфекции (КДИ), которая сопровождается водянистой диареей и нередко опасным для жизни человека поражением толстого кишечника – псевдомембранозным колитом. *C. difficile* – грамположительный анаэробный спорообразующий токсин-продуцирующий микроб, сравнительно широко распространенный во внешней среде. Основным местом обитания и резервуаром патогена является кишечный тракт человека и животных (свиней, птицы, представителей семейства кошачьих). Особо опасным источником *C. difficile* являются клинически больные (с диареей) пациенты и больные новорожденные животные (чаще всего поросята, телята). Споры возбудителя могут долго сохраняться во внешней среде – в почве, водных источниках, в помещениях, на предметах и инструментарии лечебных учреждений, а также на животноводческих фермах.

Человек инфицируется *C. difficile* фекально-оральным путем. Кишечный тракт примерно 5% взрослых и 15–70% младенцев колонизирован *C. difficile*. Наибольший уровень колонизации кишечного тракта патогеном отмечается у лиц пожилого возраста, длительно находящихся на лечении [1]. Болезнь особенно тяжело протекает у пожилых и иммунокомпрометированных людей. Инфекция у госпитализированных пациентов, как правило, ассоциируется с текущей или предшествующей госпитализации интенсивной антибиотикотерапией больного.

Культура *C. difficile* впервые была выделена Hall и O'Toole из стула здорового новорожденного ребенка в 1935 г. [2]. Первоначально (после открытия) микроб считали представителем нормальной микрофлоры кишечника человека, однако уже в 1970-е гг., в период интенсивного использования антибиотиков в клинической практике, *C. difficile* был признан одним из этиологических агентов заболеваний толстого кишечника человека [3]. В 1974 г. Tedesco et al. сообщили, что у 21% госпитализированных пациентов, получавших клиндамицин, развилась водянистая диарея и у половины из них при эндоскопическом обследовании на слизистой толстой кишке были обнаружены псевдомембраны, из которых удалось выделить культуру *C. difficile* [4]. В последующие годы число случаев КДИ в мире увеличивалось, и в настоящее время болезнь является одной из значимых нозокомиальных инфекций во многих странах, особенно часто ее регистрируют в США и Канаде [5, 6].

### Систематика и номенклатура

Вид *C. difficile*, ранее известный как *Clostridium difficile*, принадлежит к роду *Clostridioides*, семейству *Peptostreptococcaceae*, порядку *Clostridiales*, классу *Clostridia*, типу *Firmicutes*, домену *Bacteria*. Свое новое официальное название вид получил только в 2016 г. [7, 8]. Новое таксономическое название возбудителя отражает его генетическое и биологическое отличие от видов рода *Clostridium*. Показано, что нуклеотидные последовательности 16S рНК типичного вида рода *Clostridium* – *C. butyricum*, а также видов *C. perfringens* и *C. tetani* – значительно отличаются от нуклеотидных последовательностей 16S рНК вида *C. difficile*. Тем не менее следует заметить, что старое название возбудителя КДИ – *Clostridium difficile* – и сейчас широко используется в научной литературе [9].

### Культуральные и морфологические свойства

Вегетативные клетки *C. difficile*, выращенные на питательной среде и окрашенные по Граму, имеют форму палочек с закругленными концами различной длины (3,0–16,9 мкм) и ширины (0,5–1,9 мкм). Морфология и величина микроба зависят от штамма, питательной среды и других условий выращивания. Образующиеся в клетках споры располагаются субтерминально. Экзоспоры *C. difficile* имеют короткую палочковидную (овоидную) форму. Морфология вегетативных клеток и их экзоспор при сканирующей электронной микроскопии представлена на рис. 1.

У подвижных форм *C. difficile* на поверхности клеточной стенки видны перитрихально расположенные жгутики. *C. difficile* – гетеротрофы, они хорошо растут на богатых питательных средах, оптимальная температура для их роста 37°C. Молодые культуры *C. difficile* окрашиваются грамположительно, старые могут окрашиваться грамотрицательно. Характерным для *C. difficile* является большое морфологическое разнообразие образуемых ими на плотных питательных средах колоний (плеоморфизм). Варьирует не только форма колоний, но и их величина: от крупных (4–6 мм) до мелких (карликовых), возникающих из прорастающих спор [11]. Форма колоний изменяется по мере увеличения времени выращивания культуры, спустя 72 ч роста у культуры начинается споруляция. Тем не менее, несмотря на имеющий место у *C. difficile* плеоморфизм, большинство штаммов патогена на средах с кровью и на селективно-элективном агаре ССФА (циклосерин-цефокситин-фруктозный агар) образуют характерные неправильной формы плоские или слегка приподнятые, имеющие вид матового стекла колонии величиной 3–5 мм, которые спустя 48–72 ч роста, из-за приподнятого беловато-сероватого центра, приобретают вид «жареного яйца» (рис. 2).

На кровяных агаровых средах колонии имеют синевато-зеленый оттенок. Под ультрафиолетовым светом они флуоресцируют зеленовато-желтым светом. Рост *C. difficile* на селективных средах сопровождается образованием едкого запаха, похожего на конский навоз. Появление характерного запаха объясняется способностью *C. difficile* образовывать изовалериановую и изокапроевую кислоты, а также п-крезол. Вследствие такой способности *C. difficile* может противостоять действию 0,5%-го п-крезола, что отличает этот микроб от других клостридий, рост которых ингибируется указанной концентрацией п-крезола [12].

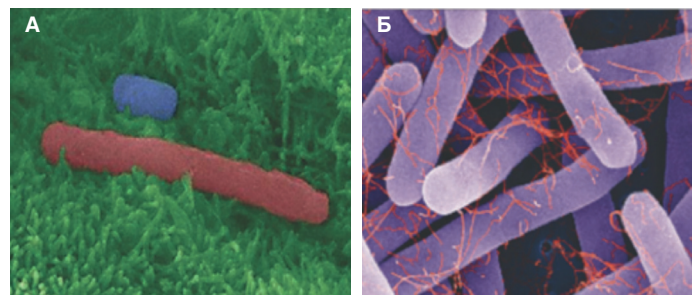


Рис. 1. Сканирующая электронная микрофотография: А – споры (синий цвет) и вегетативные клетки (красный цвет) *C. difficile*, адсорбированные на микроворсинках эпителиальных клеток кишечника человека (зеленый цвет); Б – вегетативные клетки (синий цвет) и жгутики (красный цвет) *C. difficile* [10].

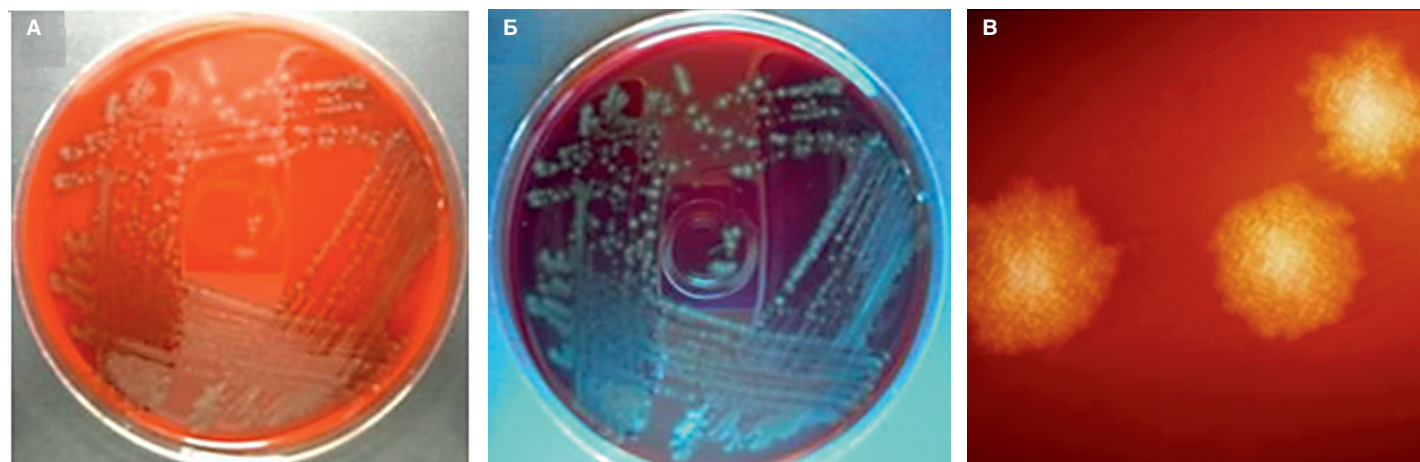


Рис. 2. Культура *C. difficile* на плотной питательной среде CCFA: А – под белым светом; Б – в ультрафиолетовом свете; В – отдельные колонии с характерными лопастными краями (<https://www.nist.gov/image/phil3647cdc-dr-holdemajpg>).

### Структурная организация вегетативных клеток

Морфология и химический состав вегетативных клеток *C. difficile* имеют свои особенности, которые во многом определяют биологические и патогенетические свойства возбудителя. Отличительным признаком клеток *C. difficile* является наличие у них S-слоя, представляющего собой белковую паракристаллическую структуру, которая окружает (покрывает) всю клеточную поверхность микроба. S-слой играет важную роль в адгезии патогена к слизистой толстой кишки человека, в биопленкообразовании, а также в защите *C. difficile* от литических бактериофагов и иммунной системы хозяина [13].

Основной химической структурой S-слоя *C. difficile* является комплекс SLP белков (synaptotagmin-like proteins). Этот комплекс состоит из двух групп протеинов – высокомолекулярных (high molecular weight/HMW) с массой 40kDa и низкомолекулярной (low molecular weight/LMW) с массой 35 kDa. Белки LMW *C. difficile* – это хорошие иммунодоминантные антигены, которые легко распознаются клетками иммунной системы человека и являются сильным индуктором гуморального иммунного ответа. Этим, по-видимому, объясняется факт частого обнаружения в сыворотке крови переболевших КДИ антител к белкам LMW. Исследователи отмечают высокие штаммовые различия в структуре аминокислотных последовательностей белков LMW, что существенно ограничивает иммунологическую перекрестную реактивность между штаммами *C. difficile*. Благодаря антигенной гетерологичности LMW-белков они являются основой для серотипирования *C. difficile*; в настоящее время вид включает 21 серогруппу [14]. Вариабельность антигенной структуры LMW-белков придает виду эволюционные преимущества, увеличивая его возможность противостоять иммунной системе человека и животных.

Высокомолекулярные белки HMW S-слоя отличаются от LMW-белков высокой консервативностью: их аминокислотные последовательности у различных штаммов *C. difficile* на 70–71% идентичны между собой, то есть являются иммунологически перекрестно реактивными. Иммунологическая реактивность LMW- и HMW-белков S-слоя позволяет рассматривать их и сам S-слой в качестве кандидатных антигенных субстанций при конструировании вакцины против КДИ [15].

Бактерии большинства изолятов *C. difficile* имеют пили и жгутики – структуры белковой природы. Пили представлены короткими нитями, расположенными на всей поверхности клетки. Они принимают участие в адгезии патогена и в образовании им биопленки [16]. Жгутики *C. difficile* расположены на клетке перитрихально и выполняют ряд функций, позволяющих рассматривать жгутики в качестве важного фактора вирулентности возбудителя КДИ. Жгутики способствуют адгезии патогена и колонизации им толстого кишечника. Показано, например, что препараты неочищенных жгутиков, выделенных из клеток *C. difficile* определенной серогруппы, в 10 раз сильнее прилипали к слизистой слепой кишки мыши, чем нефлагеллированные штаммы *C. difficile*, относящиеся к той же серогруппе [17]. Жгутики обеспечивают движение *C. difficile* к источникам питания и одновременно способствуют распространению патогена в кишечном тракте. Они ассоциированы с агрегацией клеток микроба и образованием им биопленок, а также с распознаванием патогена иммунной системой человека через рецептор TLR5 [18]. Кроме того, недавно была установлена прямая связь между регуляцией синтеза жгутиков и выработкой клетками *C. difficile* токсинов [19]. Жгутики *C. difficile* кодируются тремя оперонами: F1, F2 и F3. Gupta et al., исследуя функцию генов данных оперонов, подтвердили важную роль жгутиков в подвижности *C. difficile*, в агрегации их клеток, образовании биопленок, адгезии и распознавании их иммунной системой человека через рецептор TLR5 [20].

Важными структурами клеточной стенки *C. difficile* являются пептидогликановый слой и полисахариды. Пептидогликан – основной компонент клеточной стенки, определяющий многие свойства патогена. В частности, он обуславливает высокую устойчивость *C. difficile* к лизоциму, одному из гуморальных факторов врожденного иммунитета. Эта устойчивость объясняется высоким содержанием в пептидогликане N-деацетилированных остатков Glc NAc в цепи гликана [21]. Изменения в структуре пептидогликана могут стать причиной устойчивости *C. difficile* к β-лактамам антибиотикам. Пептидогликан – основная мишень для иммунной системы человека и животных: он активирует макрофаги, инициирует активацию комплемента через альтернативный путь, стимулирует образование фактора некроза опухоли (TNF-α) и синтез антител.

На поверхности клеточной стенки *C. difficile* можно обнаружить два типа полисахарида – PS-I и PS-II. Полисахарид PS-I встречается крайне редко, в то время как PS-II выявляется у многих штаммов. Недавно полисахарид PS-II был химически синтезирован и предлагается исследователями в качестве потенциального протективного антигена при разработке вакцины против КДИ [22].

### Споруляция

Попадая в неблагоприятные условия (недостаток питательных веществ, аэробные условия), вегетативная клетка *C. difficile* способна образовывать споры, которые, благодаря высокой устойчивости к химическим и физическим факторам, могут длительное время (несколько месяцев) сохраняться во внешней среде, представляя потенциальную опасность для людей и животных. На рис. 3 представлена фотография спор *C. difficile* и схема строения споры, состоящей из экзоспориума, наружной мембраны, кортекса, зародышевой клеточной стенки и внутренней мембраны; в центре споры располагается ядро, сформированное ДНК (на схеме отсутствует).

Процесс формирования споры в вегетативной клетке начинается с деления ее с помощью перегородки на две ассиметричные половины – большую (материнскую) и меньшую (дочернюю), каждая из которых содержит копию хромосомы. В меньшей половине клетки начинается формирование вышеуказанных слоев споры. На стадии образования споры большая, материнская, половина поглощает меньшую. Здесь, в цитоплазме материнской клетки, происходит окончательное созревание споры. После ее созревания материнская клетка лизируется, спора освобождается и вместе с фекальными массами попадает во внешнюю среду, где она может находиться в состоянии покоя до тех пор, пока не появятся благоприятные условия для ее прорастания [23]. В процессе споруляции *C. difficile*, на ее ранней стадии, важную, если не главную, роль играет ген, подобный гену *SpoOA*, контролирующему у *Bacillus subtilis* формирование спор. Показано, что штамм *C. difficile* с мутантным геном, аналогичным *SpoOA*, способен вызывать заболевание у мышей, но не способен формировать споры, долго персистировать в организме мышей и заражать других животных [24].

В наружном слое оболочки споры идентифицировано три белка *C. difficile*: CofCB, CofD и CofE. Белки CofCB и CofD функционируют как марганцевые каталазы, а CofE – как бифункциональный белок с активностью пероксиредоксина и хитиназы, который, как полагают, играет роль в сборке оболочки споры посредством белка-мономера. Однако точная функция этих белков пока не выяснена [25].

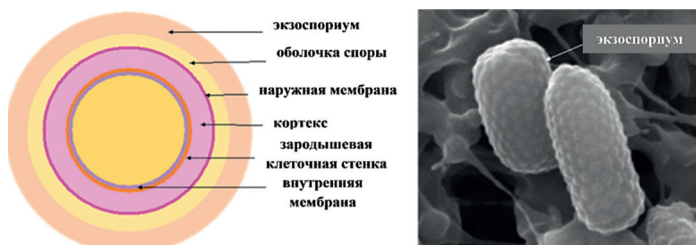


Рис. 3. Строение споры *C. difficile*: А – схема; Б – электронно-микроскопическое изображение [10].

При попадании в организм человека или животного споры *C. difficile*, благодаря высокой устойчивости к соляной кислоте и ферментам желудка, неповрежденными попадают в тонкий кишечник, где и происходит процесс их прорастания. Прорастание спор начинается с их регидратации, высвобождения катионов ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ) и дипиколината кальция, что приводит к гидролизу слоя пептидогликана споры. С увеличением воды в споре происходит расширение ядра споры и увеличивается ее ферментативная активность. Ферменты прорастания у *C. difficile* изучены недостаточно, однако они хорошо охарактеризованы у *C. perfringens*. Такими ферментами являются белки SleB и CwlJ, известные как кортексические ферменты спор (SCLE). Белок CwlJ расщепляет слои пептидогликана, механизм гидролитической активности SleB остается неизвестным. Имеются и другие ферменты, участвующие в прорастании спор *C. perfringens* – белки SlrC, SleM. Sebaitria et al. идентифицировали в геноме штамма *C. difficile* CD630 гены, гомологичные генам *cwlJ* и *sleB* *B. subtilis* 3563 и генам *sleC* *C. perfringens* CD0551 [26].

Важную роль в прорастании спор *C. difficile in vivo* играют индукторы – химические вещества различной природы. Показано, что индукторами прорастания спор могут выступать желчные кислоты, желатин, таурохолат и гликолят. Например, нормальная физиологическая концентрация таурохолата натрия в двенадцатиперстной кишке (6,9 ммоль) является благоприятной для прорастания спор *C. difficile*. Стимулирует прорастание спор *C. difficile* глицин, поверхностно-активные вещества, лизоцим, пептидогликан, дипиколиновая кислота, аспарагин, глюкоза, фруктоза и калий. В активации процесса прорастания спор большое участие принимают описанные у *C. difficile* три сенсорных рецептора – GerA, GerB и GerK, расположенные на внутренней мембране споры. Если прорастание споры началось, то процесс превращения ее в вегетативную клетку остановить невозможно. Помимо индукторов прорастания спор в кишечном тракте присутствуют и ингибиторы прорастания. Одним из таких ингибиторов является препарат хемодезоксихолата, который предотвращает прорастание спор в присутствии таурохолата и холата. Другим ингибитором прорастания спор *in vivo* является холестирамин – производное желчных солей, отвечающий за удаление избытка солей желчных кислот из нижних отделов пищеварительного тракта [27]. Холестирамин, благодаря его ингибиторным свойствам, применяют для лечения КДИ. Однако лечебная эффективность холестирамина продолжает обсуждаться, поскольку его прием больными существенно увеличивает у них синтез желчных кислот (в 42–46 раз). Кроме того, холестирамин связывается с ванкомицином, снижая его антимикробную активность [28].

### Факторы вирулентности

Штаммы *C. difficile*, возбудители КДИ, как правило, являются носителями значительного числа факторов вирулентности, к которым относятся белки S-слоя, клеточные поверхностные белки, многочисленные ферменты и токсины (таблица).

Тем не менее среди перечисленных факторов основную роль в патогенезе КДИ играют токсины, которые повреждают эпителиальные клетки толстой кишки и вызывают их ги-

Таблица. Факторы вирулентности <i>C. difficile</i>				
Фактор вирулентности	Механизм действия	Результат действия фактора вирулентности	Ссылка	
Токсин TcdA (энтеротоксин). Токсин TcdB (цитотоксин)	Глюкозилирование и инактивация системы Rho в энтероцитах толстой кишки. Повреждение межклеточных контактов энтероцитов, которое приводит к повышенной эпителиальной проницаемости. Повышенный синтез провоспалительных цитокинов интерлейкина-8 и интерферона-γ	Полимеризация актина, разрушение межклеточных соединений, гибель энтероцитов толстого кишечника. Токсичность TcdB в 100–1000 раз сильнее токсина TcdA	[29–31]	
Бинарный токсин CDT	Два отдельных олигопептида – компоненты А (CDT-A) и В (CDT-B). CDT-B способствует проникновению CDT-A в цитоплазму энтероцита. CDT-A – АДФ-рибозилтрансфераза – переносит радикал АДФ-рибозы на молекулы актина эпителиальной клетки	Полная деградация актинового скелета энтероцитов, завершающаяся их гибелью. Повышенная патогенность <i>C. difficile in vivo</i> и <i>in vitro</i>	[32]	
Биопленка	Место накопления <i>C. difficile</i> совместно с многовидовым сообществом бактерий. Накопление токсинов и биомассы <i>C. difficile</i> , регулируемых системой сенсинг-кворум. Накопление спор <i>C. difficile</i>	Длительная персистенция в организме. Снижение чувствительности <i>C. difficile</i> к антибиотикам	[33–35]	
SlpA (белок А S-слоя)	Фибронектин-связывающий белок А. Молекулярные механизмы адгезии, которые не установлены	Повышенная адгезия патогена к слизистой оболочке кишечника	[33]	
Cwp84 (белок клеточной стенки <i>C. difficile</i> с мол. массой 84 kDa)	Деградация нескольких внеклеточных белков матрикса (фибронектина, ламинина и витронектина). Образование более прочной биопленки у штаммов <i>C. difficile</i> , связанной с Cwp84	Повышение адгезии и колонизации <i>C. difficile</i> энтероцитов толстой кишки. Увеличение вирулентности и адгезии патогена к энтероцитам, рецидив КДИ	[33]	
Пили и жгутики	Подвижность <i>C. difficile</i> , агрегация клеток, образование биопленок, адгезия и распознавание их иммунной системой человека через рецептор TLR5	Адгезия и колонизация патогеном кишечника хозяина и в образовании им биопленок	[16–21]	
Споры	Участие регулятора споруляции Spo0A в спорообразовании и формировании биопленки	Персистенция <i>C. difficile</i> в организме хозяина и во внешней среде, устойчивость к антимикробным препаратам, развитие рецидива КДИ	[23–27]	

бель. У *C. difficile* описано три основных токсина: токсин А (TcdA – энтеротоксин), токсин В (TcdB – цитотоксин) и бинарный токсин CDT. Если первые два токсина (А и В) детектируют у большинства клинических штаммов (одновременно оба или только один из двух), то бинарный токсин CDT встречается, по данным разных авторов, у 5–30% вирулентных штаммов *C. difficile* [11]. Токсины А и В принадлежат к большому семейству кластридиальных токсинов (FCT), активность которых направлена на гуанин-трифосфатазу, ответственную за регуляцию актин-зависимых функций цитоскелета клеток [36]. Токсины TcdA и TcdB – одноцепочечные белки с высокой молекулярной массой (250–308 kDa), в которых различают четыре функциональных домена, описываемых как «ABCD-модель» токсина. На N-концевом участке токсина локализован ферментативно-активный домен А («А» – enzymatic activity), отвечающий за гликозилирование белков энтероцитов. За доменом А следует домен С («С» – cutting) – протеаза, обеспечивающая автокаталитическое отщепление от молекулы токсина домена А. Домен D («D» – delivery) находится между доменами С и В и обеспечивает транслокацию молекулы токсина через мембрану эндосомы в цитоплазму энтероцита. После домена С следует домен В («В» – binding), С-концевая часть которого отвечает за связывание токсина с рецепторами клеток-мишеней человека, а также за образование пор в их мембране. Рецептор-связывающий домен состоит из 20–40 коротких, содержащих от 20 до 50 аминокислот, олигопептидов, которые обеспечивают связывание токсина с липополисахаридами энтероцитов. Эти короткие повторяющиеся олигопептиды известны как CROPS-олигопептиды («CROPS» – the combined repetitive oligopeptides), структура которых специфична для отдельных изолятов *C. difficile* (рис. 4).

Рецепторами токсина TcdA являются поверхностный белок сахароза-изомальтоза и поверхностный гликопротеин из семейства тепловых шоковых белков gp96 клеток-мишеней [30]. Для токсина TcdB рецепторами служат несколько белков энтероцитов: хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), NECTIN3 (мембранный белок, участвующий в образовании межклеточных адгезивных контактов) и белки из семейства G-белковых рецепторов [29].

После взаимодействия с рецептором токсины проникают в клетку путем так называемого клатрин-зависимого эндоцитоза. Низкое pH содержимого эндосомы приводит к структурной реорганизации токсинов и встраиванию гидрофобных участков TcdA и TcdB в мембрану эндосомы с последующей транслокацией доменов А и С в цитоплазму. В цитоплазме домен А отщепляется от молекулы токсина и взаи-

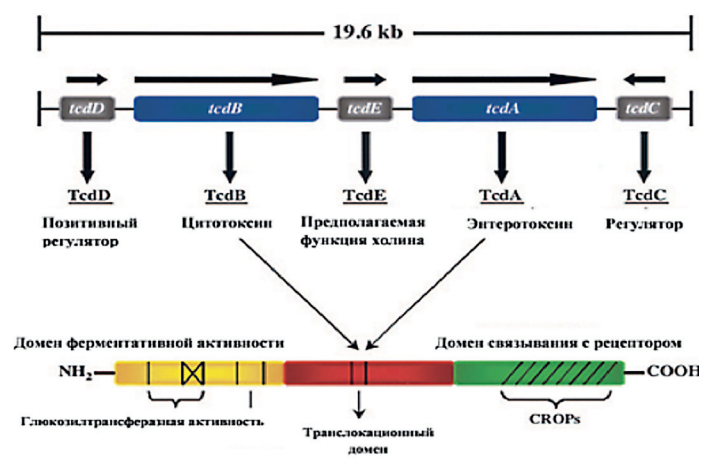


Рис. 4. Структура токсинов *C. difficile* [37].

модействует с белками-мишенями цитоплазмы, инактивируя их активность. В основе повреждающего действия токсинов TcdA и TcdB лежит способность их, за счет гликозилирования, инактивировать так называемые Rho-белки клеток человека. Rho-белки представляют собой группу низкомолекулярных ГТФ-связывающих белков, играющих важную роль в качестве регуляторов биологических процессов, обеспечивающих функционирование актинового цитоскелета; кроме того, они участвуют в пролиферации, формообразовании и поляризации энтероцитов, в регулировании барьерных функций эпителиальных клеток толстого кишечника, фагоцитозе и продукции супероксид-анионов [30]. Инактивация А- и В-токсинами Rho-белков объясняет широкий спектр повреждений эпителиальных клеток кишечника, отмечаемый у пациентов при КДИ.

Существует два механизма участия гликозилирующих А- и В-токсинов *C. difficile* в патогенезе инфекций. Первый механизм связан с повреждением межклеточных контактов энтероцитов, которое приводит к повышенной эпителиальной проницаемости, что клинически проявляется диареей. При этом процессы восстановления проницаемости эпителия и клеточная пролиферация энтероцитов ингибируются, поскольку гликозилированные Rho-белки, упомянутые выше, не выполняют свои функции, что приводит к гибели эпителиальных клеток путем апоптоза. Второй механизм участия токсинов А и В – это прямая активация инфламмосомы нейтрофилов (белковый комплекс в нейтрофилах, который запускает воспалительную реакцию при контакте клетки с бактериями и играет важную роль в системе врожденного иммунитета) гликозилированными Rho-белками, что приводит к повышенному синтезу провоспалительных цитокинов интерлейкина-8 и интерферона- $\gamma$  и, как следствие, к воспалению и поражению слизистой оболочки толстой кишки [31].

Молекулярные механизмы токсического действия TcdA и TcdB практически не отличаются. Однако в опытах на культурах клеток токсичность TcdB оказывается в 100–1000 раз сильнее токсина TcdA. Поэтому TcdA предложено было назвать энтеротоксином, а TcdB – цитотоксином [29]. В опытах с изогенными штаммами *C. difficile* было показано, что штамм, продуцирующий только токсин TcdB, способен также, как и дикий штамм, продуцирующий оба токсина, вызывать заболевание и гибель хомяков. Изогенный штамм, продуцирующий только токсин TcdA, тоже вызывал у зараженных хомяков колит, однако летальность среди них была существенно ниже, чем у хомяков, зараженных штаммом, продуцирующим токсин TcdB. В этих опытах было продемонстрировано также синергидное действие токсинов А и В. Следовательно, оба токсина являются важными факторами патогенеза КДИ, однако токсин TcdB, по всей вероятности, связан с более тяжелым течением инфекции [38].

Бинарный токсин *C. difficile* CDT, как указывалось выше, продуцируется клиническими штаммами реже, чем токсины TcdA и TcdB: по разным данным, его продуцируют 5–30% штаммов. Считается, что синтез бинарного токсина CDT указывает на высокую вирулентность штамма. Особенность данного токсина заключается в том, что он продуцируется не в виде одной белковой цепи, как TcdA или TcdB, а в виде двух отдельных олигопептидов – компонентов А (CDT-A) и В

(CDT-B), посттрансляционно объединяющихся в одну молекулу. Компонент CDT-B с молекулярной массой 100 kDa взаимодействует с рецептором энтероцитов толстой кишки – липолиз-стимулируемым липопротеиновым рецептором (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor/LSR) – и способствует проникновению CDT-A в цитоплазму энтероцита путем рецептор-зависимого эндоцитоза. CDT-A с молекулярной массой 50 kDa является АДФ-рибозилтрансферазой, которая способна расщеплять молекулу внутриклеточного НАД на никотинамид и аденозиндифосфорибозу (АДФ-рибозу) и переносить радикал АДФ-рибозы на молекулы актина эпителиальной клетки толстого кишечника. В результате АДФ-рибозирования мономерного актина наступает полная деградация актинового скелета энтероцитов, завершающаяся их гибелью (рис. 5) [32].

Синтез TcdA и TcdB кодируется, соответственно, генами *tcdA* и *tcdB*, локализованными на хромосоме *C. difficile* в составе локуса патогенности PaLoc размером 19,6 т.п.н. Помимо генов *tcdA* и *tcdB* на этом локусе расположены гены *tcdR*, *tcdE* и *tcdC*, участвующие в регуляции синтеза обоих токсинов. Клинические штаммы *C. difficile*, как правило, в составе локуса PaLoc несут оба гена токсигенности – *tcdA* и *tcdB*, такие штаммы принято обозначать как А<sup>+</sup>В<sup>+</sup>. В случае, если в штамме детектируется один из генов *tcdA* или *tcdB*, штаммы обозначают как А<sup>+</sup>В<sup>-</sup> или А<sup>-</sup>В<sup>+</sup> соответственно. У непатогенных *C. difficile* локус PaLoc отсутствует и гены токсинов не детектируются, такие штаммы обозначают как А<sup>-</sup>В<sup>-</sup>. В работе Brouwer et al. показано, что локус PaLoc может передаваться, по крайней мере *in vitro*, от токсигенных к нетоксигенным штаммам *C. difficile*, то есть локус патогенности PaLoc ведет себя как мобильный генетический элемент [40]. Поэтому нельзя исключить его участие в формировании токсигенных штаммов *C. difficile* и в их эпидемическом распространении [41–43].

Изучение генов *tcdA* и *tcdB* у разных штаммов *C. difficile* позволило установить различия в их нуклеотидных последовательностях, которые могут быть вызваны либо точечными мутациями, либо делециями или инсерциями. Структурные различия генов *tcdA* и *tcdB*, детектируемые в разных штам-

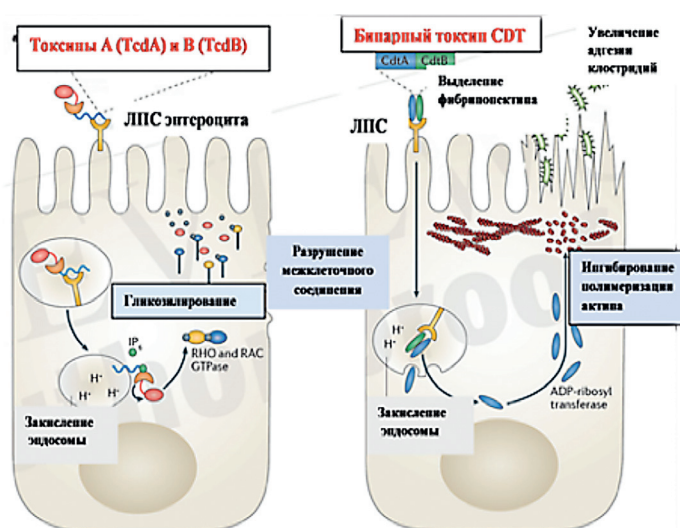


Рис. 5. Механизм действия токсинов А, В и бинарного CDT *C. difficile* [39].

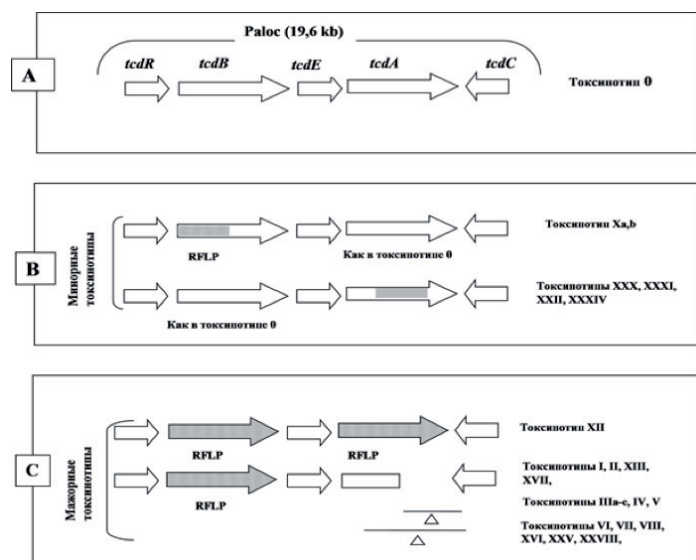


Рис. 6. Геномная организация локуса PaLoc *C. difficile*: А – PaLoc 0-токсинотипа; В – минорные токсинотипы; С – основные токсинотипы [46].

мах, послужили основой для разработки схемы токсинотипирования штаммов *C. difficile*. Для этой цели используют метод RFLP – определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов нуклеотидных последовательностей генов *tcdA* и *tcdB*, наработанных в полимеразной цепной реакции. Исходя из разнообразия полиморфизма длин рестрикционных фрагментов *tcdA* и *tcdB*, штаммам присваивают номер токсинотипа (от 0 до 34). За нулевой токсинотип (0-токсинотип) принимают токсинообразующий (A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>) эталонный штамм *C. difficile* VPI10463, гены которого *tcdA* и *tcdB* не содержат мутаций. Штаммы *C. difficile*, аналогичные по токсинотипу с эталонным штаммом VPI10463, определяются как «невариантные» штаммы 0-токсинотипа. Все остальные штаммы *C. difficile* с измененными генами *tcdA* и *tcdB* обозначаются как варианты. Вариантные номера токсинотипов обозначаются римскими цифрами; на сегодня известны 34 токсинотипа *C. difficile* (I–XXXIV) (рис. 6) [44, 45].

### Гипервирулентные штаммы

Благодаря систематическому изучению принадлежности клинических штаммов *C. difficile*, выделяемых во многих странах, к определенным токсинотипам и риботипам исследователям удалось выявить среди них особую группу так называемых гипервирулентных штаммов патогена [47]. Было установлено, что штаммы этой группы, как правило, принадлежат к III токсинотипу и относятся к небольшому числу риботипов, таких как 027, 034, 075, 080 и 078. Гипервирулентные штаммы, в отличие от «обычных» негипервирулентных, имеют ряд характерных свойств: все они, помимо токсинов А и В, продуцируют бинарный CDT-токсин; имеют более короткий временной период начала споруляции, благодаря чему количество спор гипервирулентных штаммов всегда превалирует над количеством спор негипервирулентных; гипервирулентные штаммы в большем количестве и с более высокой скоростью вырабатывают токсины [48]. Повышенная инфекционность гипервирулентных штаммов *C. difficile* была продемонстрирована в опытах

на животных. Orozco-Aguilar et al. показали, что негипервирулентный штамм *C. difficile*, которым была заражена большая часть экспериментальных мышей, постепенно был вытеснен и заменен гипервирулентным штаммом, носителем которого в группе были лишь единичные особи [49].

Одним из наиболее «успешных» и широко распространенных по всему миру гипервирулентных штаммов *C. difficile* стали штаммы риботипа 027. Впервые штаммы этого риботипа были выделены в Канаде в 2007 г. В последующие 15 лет риботип 027 распространился по всему миру; для США штаммы этого риботипа стали эндемичными [50, 51]. Штаммы риботипа 027 образуют все три типа токсинов: TcdA, TcdB и бинарный токсин CDT, причем токсины TcdA и TcdB они продуцируют в большем количестве, нежели «обычные» негипервирулентные штаммы *C. difficile*. Повышенная продукция токсинов штаммами риботипа 027, как показали исследования, связана с мутацией в гене-регуляторе *tcdC* [52]. Штаммы риботипа 027 обычно ассоциируются с тяжелыми случаями КДИ, высокой частотой рецидивов болезни и повышенным уровнем смертности [53]. Другим примером гипервирулентных штаммов являются штаммы риботипа 078, часто встречающиеся в странах Европы. Штаммы этого риботипа демонстрируют такую же гиперпродукцию токсинов, как и штаммы риботипа 027 [54].

### Адгезия и биопленкообразование

Помимо токсинов, играющих ведущую роль в патогенезе КДИ, большое внимание уделяется исследователями вопросам адгезии и формированию патогеном поверхностно-ассоциированных микробных сообществ – биопленок. Изучение этих процессов весьма актуально, в том числе и для выяснения причин рецидивов болезни, нередко случающихся у переболевших КДИ. В последние годы важная роль в адгезии и колонизации *C. difficile* установлена для таких клеточных компонентов, как фибронектин-связывающий белок А, высоко- и низкомолекулярные белки S-слоя (SLP-белки), а также белки клеточной стенки Swp86 и Swp84, хотя молекулярные механизмы адгезии и колонизации *C. difficile* пока окончательно не установлены [33]. *C. difficile*, как и многие другие возбудители хронических рецидивирующих инфекций, таких как кариес, пародонтит, инфекции мочевыводящих путей и легких, болезнь Крона и др., способны образовывать на слизистой кишечника биопленки, состоящие из клеток патогена, погруженных во внеклеточные полимерные субстанции (матрикс), состоящие в основном из белков, ДНК и полисахаридов. Об участии этих клеточных компонентов в образовании биопленок свидетельствуют эксперименты, в которых было продемонстрировано, что обработка культуры *C. difficile* протеиназой К и ДНКазой I приводит к ингибированию образования и деградации уже сформированных биопленок. С помощью окрашивания биопленок антителами против поверхностного полисахарида PS-II *C. difficile* доказано его присутствие в матриксе биопленки [34].

Активное участие в формировании биопленок принимает цистеиновая протеаза Swp84, отвечающая за образование S-слоя у клеток *C. difficile*. Показано, что изогенный штамм *C. difficile* с дефектным геном *swp84* имеет такую же скорость роста в бульоне, как и дикий (родительский) штамм,

однако этот мутант не способен формировать биопленки [35]. Полученные результаты указывают на прямое участие S-слоя и входящих в него Сwr-белков в формировании биопленки. Предполагается также, что на поздней стадии формирования биопленок принимают участие жгутики *C. difficile* [55]. Важная роль в образовании биопленки клетками *C. difficile* принадлежит также одному из основных модуляторов кворум-сенсинга – аутоиндуктору AI-2. Показано, что мутант по гену *luxS*, кодирующему синтез AI-2, не способен образовывать биопленок, что позволяет предположить, что система кворум-сенсинга, опосредованная геном *luxS*, важна для образования биопленок [56].

Процесс споруляции у *C. difficile* также тесно связан с биопленкообразованием. Показано, что мутанты по гену, аналогу гена *SpoOA*, гену-регулятору споруляции, не способны образовывать биопленок; у таких мутантов были существенно снижены адгезивные свойства, из чего следует, что фактор *SpoOA*, скорее всего, принимает участие на ранней стадии формирования биопленок. Здесь же следует заметить, что фактор *SpoOA* связан также и с продукцией токсинов клетками *C. difficile*, хотя эта связь до сих пор в полной мере не ясна. Предполагается, что регулон *SpoOA* способен действовать как генетический переключатель, запуская, в зависимости от стрессовой ситуации, в которой находится патоген, либо процесс споруляции, либо пленкообразования, или образование токсинов. Например, при недостатке питательных веществ фактор *SpoOA* индуцирует образование спор, которые могут стать основной частью зрелой биопленки [34]. На рис. 7 представлена гипотетическая модель развития биопленки у *C. difficile*.

Формирование патогенами биопленок обеспечивает им защиту и выживание в неблагоприятных условиях среды обитания, например защиту от антибиотиков, кислородного стресса, ксенобиотиков и других вредных факторов. Важно отметить, что биопленки обеспечивают защиту клеток патогена от губительного действия иммунной системы макроорганизма [34]. Устойчивость к антибиотикам бактерий, находящихся в биопленках, например *Staphylococcus aureus*, может возрастать от 10 до 100 раз по сравнению с планктонными формами того же микроба. В то же время нужно иметь в виду, что субингибирующие концентрации антибиотиков стимулируют образование биопленок, как это было показано для *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* [58]. Клетки

*C. difficile*, защищенные матриксом биопленки, также были более устойчивы к высоким концентрациям ванкомицина (20 мг/л), нежели планктонные формы патогена. Субингибирующие и ингибирующие концентрации ванкомицина (0,25 и 0,5 мг/л) стимулировали формирование биопленок [59]. Таким образом, два генетически детерминированных видовых признака *C. difficile*, споруляция и биопленкообразование, обеспечивают патогену повышенную выживаемость и длительное персистирование в организме человека. Оба эти признака с большой вероятностью имеют отношение к случаям рецидивов инфекции у людей, первично переболевших КДИ.

### Геном *C. difficile*

Биоинформатический анализ полногеномных сиквенсов штаммов *C. difficile* свидетельствует о пластичности и мозаичности их геномов. Величина генома патогена составляет  $4,3 \times 10^6$  п.н., содержание ГЦ оснований составляет 26–28%. Геном *C. difficile* существенно больше (на 42%), чем геномы близкородственных клостридиальных видов, *C. bifermetas* и *C. sricklandiig*, и больше, чем у многих видов бактерий группы *Firmicutes* [60].

У *C. difficile* значительную долю генома (11%) занимают мобильные генетические элементы (МГЭ), среди которых идентифицированы плазмиды, профаги, геномные острова, транспозоны (Tn), инсерционные последовательности (IS), интерферирующие элементы *sigK*, интегроны, а также CRISPR-Cas-элементы [61].

Большинство свойств *C. difficile* ассоциированы с хромосомными генами, которые определяют химический состав, структуру и организацию клетки, ее метаболизм, пролиферацию и адаптацию патогена к месту обитания; они контролируют процессы споруляции, прорастания спор, адгезию патогена, образование им биопленки и другие внутриклеточные события, которые и обеспечивают популяции выживание и персистирование в микробиоме кишечника человека и животных, во внешней среде. Мобильные генетические элементы также играют важную роль в жизни *C. difficile*, во многом определяя изменчивость и эволюцию патогена, его устойчивость к стрессовым факторам. МГЭ *C. difficile* нередко являются носителями генов устойчивости к антимикробным препаратам, существенно затрудняющим лечение КДИ.

Изменения в геноме *C. difficile* могут происходить либо за счет перемещения (транспозиции) МГЭ, например IS- или Tn-элементов, из одного места хромосомы в другое, либо путем передачи МГЭ, например плазмид, из одной клетки *C. difficile* в другую. Следствием таких структурных изменений в геноме может стать появление новых свойств либо, напротив, утрата каких-либо признаков клеткой. В случае, если новые признаки окажутся полезными для клетки, они могут наследоваться в последующих поколениях.

### Плазмиды *C. difficile*

Плазмидные ДНК сравнительно часто встречаются в клетках *C. difficile*. По разным данным, в 13–36% изолятов детектируют хотя бы одну плазмиду; некоторые штаммы могут иметь сразу несколько (4–6) плазмид [61–64]. У 5% изолятов *C. difficile*, выделяемых от человека и животных, обнаруживают криптические плазмиды [60]. Плазмиды

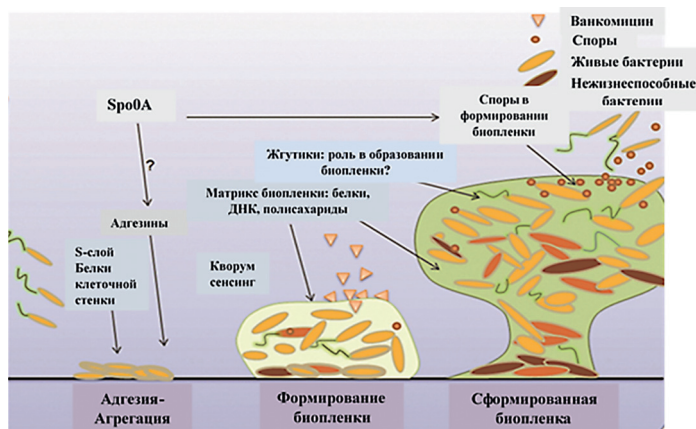


Рис. 7. Модель развития биопленки *C. difficile* [57].



*C. difficile* весьма гетерогенны, различаются между собой величиной, структурой, генетическими маркерами, способностью к передаче, принадлежностью к семейству, к группе несовместимости и другими свойствами [61]. Молекулярная масса плазмид *C. difficile*, как правило, не превышает 50 kb, большие плазмиды (100 Kb и более) встречаются редко. Подавляющее большинство плазмид *C. difficile* неконъюгативные, однако часть неконъюгативных плазмид, за счет мобилизации другими плазмидами, способна передаваться, другая часть – не мобилизуется и не передается. Конъюгативные плазмиды у *C. difficile* детектируют редко. Различаются плазмиды по степени распространения: наиболее часто у *C. difficile* встречаются плазмиды семейств CD-3, CD-6 и CD-630. Особенностью плазмид *C. difficile* является их высокая специфичность: они редко встречаются у бактерий других клостридиальных видов [65].

Плазмиды *C. difficile*, как и плазмиды других видов микроорганизмов, нередко являются носителями детерминант устойчивости к антимикробным препаратам. У *C. difficile* обнаружена плаزمида pCD-METRO, кодирующая устойчивость микроба к метронидазолу, препарату, используемому при лечении КДИ [60]. Описана плазмиды с геном *cfrC* метилтрансферазы 23SpPHK, придающая устойчивость патогену к монолидиду, активному в отношении многих грамположительных бактерий, включая *Clostridium* spp., и к фениколу, активному против грамотрицательных бактерий [66]. Детектированы также плазмиды, ассоциированные с толерантностью и устойчивостью *C. difficile* одновременно к метронидазолу и ванкомицину [61].

Как известно, гены, детерминирующие синтез главных токсинов *C. difficile*, TcdA, TcdB и бинарного токсина CDT, обычно локализованы на хромосоме в составе острова патогенности PaLoc. Однако в 2018 г. при анализе нуклеотидных последовательностей геномов *C. difficile* была обнаружена большая (145 kb) плазмиды pHSJD-312 с генами монотоксина TcdB и бинарного токсина CDT; на плазмиде также были локализованы гены системы четвертого типа секреции (T4SS). Важно заметить, что плазмидно-кодируемый белок токсина TcdB по аминокислотному составу во многом идентичен токсину TcdB эпидемического штамма *C. difficile* риботипа 027, но имеет различия в своем гликозилтрансферазном домене. Плазмиды pHSJD-312 на сегодняшний день является единственной конъюгативной плазмидой, обнаруженной у *C. difficile*, которую можно считать плазмидой вирулентности возбудителя псевдомембранозного колита. Благодаря своей конъюгативности плазмиды pHSJD-312, по всей вероятности, способна участвовать в формировании новых токсигенных штаммов *C. difficile*. В заключение следует отметить, что ареал распространения и природные резервуары плазмид *C. difficile* неизвестны [67].

### Транспозоны *C. difficile*

У *C. difficile* различают два типа транспозонов: конъюгативные (CTns) и мобилизуемые (MTns). CTns, называемые также интегративными конъюгативными элементами (ICE), являются генетическими локусами, способными переносить себя из клетки-донора в клетку-реципиент с помощью механизма, подобного конъюгации. В отличие от плазмид, Tn-элементы обычно не содержат кодонов начала репликации,

поэтому для выживания они должны быть интегрированы в репликон хозяйской клетки. Мобилизуемые транспозоны MTns также могут передаваться по механизму, подобному конъюгации, но поскольку эти элементы не имеют генов, кодирующих этот процесс, они используют для этого гены конъюгативных транспозонов CTns или конъюгативных плазмид, присутствующих в этой же клетке. Биоинформатический анализ геномов *C. difficile* показал, что в их геномах присутствует множество предполагаемых CTns- и MTns-элементов, часть из которых способны к конъюгативному переносу. Tn-элементы, помимо генов, обеспечивающих их интеграцию в геном, эксцизию или конъюгацию, могут содержать также гены, способствующие выживанию *C. difficile* в экстремальных условиях среды обитания [68]. Несмотря на значительное количество Tn-элементов, обнаруживаемых в штаммах *C. difficile*, подробно исследованы лишь некоторые из них. Наиболее изученным является конъюгативный транспозон Tn5397, способный передаваться между штаммами *C. difficile*, а также между клетками *C. difficile*, *Bacillus subtilis* и *Enterococcus faecalis*. Транспозон Tn5397 имеет размер 21 kb, может встраиваться только в строго определенные локусы хромосомы *C. difficile*. Этот транспозон является носителем генов устойчивости к тетрациклину [69].

В клетках *C. difficile* детектирован также транспозон Tn916, весьма схожий по своим свойствам с транспозоном Tn5397, он так же несет гены резистентности к тетрациклину, однако, в отличие от Tn5397, может встраиваться во множество сайтов хромосомы *C. difficile*. По этой причине Tn916 используют в качестве инструмента в генетических исследованиях *C. difficile* для получения мутантов и клонирования генов патогена [70].

В штамме *C. difficile* W1 идентифицированы транспозоны Tn4453a и Tn4453b, которые придают штамму устойчивость к хлорамфениколу [71]. Эти транспозоны генетически близки к мобилизуемому транспозону Tn4451 *C. perfringens*. Описан транспозон Tn5398, который придает штаммам *C. difficile* устойчивость одновременно к макролидам, линкомицину и стрептограмину. Этот транспозон способен передаваться между штаммами *C. difficile*, а также от *C. difficile* к представителям гетерологичных видов – *B. subtilis* и *S. aureus* [72].

Клетки *C. difficile* содержат также мобильный генетический элемент *skin Cd*, идентифицированный как профагоподобная последовательность, интегрированная в ген *sigK*. Вырезание этого элемента из гена *sigK* спорулирующей материнской клетки приводит к выработке сигма-фактора K, необходимого для каскада споруляции [73].

### Бактериофаги *C. difficile*

Штаммы *C. difficile* в своих геномах могут содержать гены умеренных (лизогенных) бактериофагов. Показано, что профаги фCD119, фCD27 и фCD38-2 способны повышать или понижать выработку клетками *C. difficile* токсинов путем прямого связывания с регуляторным геном *tcdR* в локусе PaLoc [74]. V.Kreis et al. продемонстрировали передачу с помощью трансдуцирующего бактериофага FC2 гена устойчивости к тетрациклину, находящегося в составе конъюгативного транспозона, из одного штамма *C. difficile* в другой. Это был первый эксперимент, продемонстрировавший возмож-

ность распространения генов антибиотикорезистентности среди *C. difficile* с помощью бактериофага [75]. Нельзя исключить возможность переноса фагами и других генов, в том числе генов токсинообразования.

### Геномные острова *C. difficile*

Особый интерес представляют данные, свидетельствующие о возможном переносе между штаммами *C. difficile* геномного острова PaLoc, на котором локализованы гены токсинов TcdA и TcdB. PaLoc, по мнению исследователей, обладает свойствами мобильного генетического элемента, поскольку постоянно располагается на одном и том же месте хромосомы токсигенных штаммов *C. difficile*, а в нетоксигенных штаммах место локализации PaLoc занимает некодирующая последовательность (115 п.н.). Показано, что PaLoc переносится, как правило, совместно с конъюгативными транспозонами CTns: в трансконъюгатах, содержащих PaLoc, почти всегда присутствует неселектируемый CTn, что указывает на связь переноса PaLoc и CTn [76]. Важно отметить, что вновь приобретенные с помощью переноса PaLoc гены токсинов экспрессировались в ранее нетоксигенном штамме *C. difficile* CD37 [40]. Полученные результаты свидетельствуют о возможности превращения нетоксигенного штамма *C. difficile* в токсигенный. Этот факт необходимо учитывать при реализации предложений клиницистов по использованию нетоксигенных штаммов *C. difficile* в терапии КДИ. В этой связи весьма необходимы исследования по изучению молекулярных механизмов, обуславливающих передачу острова PaLoc среди *C. difficile*.

Приведенные выше краткие сведения о мобильных генетических элементах свидетельствуют об их влиянии на пластичность генома и на биологические свойства *C. difficile*. Внутригеномные перестройки, вызываемые МГЭ, их влияние на обмен генетической информацией между клетками *C. difficile*, по всей вероятности, являются одним из факторов изменчивости и эволюции возбудителя КДИ, а также адаптации его к условиям пребывания.

### Устойчивость к антимикробным препаратам

Распространение КДИ среди людей и животных тесно связано с широким использованием антибиотиков и других химиопрепаратов в клинической практике медицины и ветеринарии. Поэтому не удивительно, что выделяемые от больных пациентов и животных штаммы *C. difficile* часто оказываются устойчивыми к антимикробным препаратам (АМП). Особенно острой проблема антибиотикорезистентности *C. difficile* стала после появления устойчивых к АМП гипервирулентных штаммов эпидемических риботипов, таких как риботип 027, возникновение и распространение которого ассоциируют с чрезмерным использованием в медицине препаратов группы фторхинолонов [77]. Результаты исследований антибиотикорезистентности *C. difficile* показывают, что наиболее часто клинические штаммы устойчивы к ципрофлоксацину, эритромицину и цефалоспорином 2-го поколения (цефуросиму, цефаклору и др.). Менее устойчивы *C. difficile* к цефалоспорином 3-го поколения (цефотаксиму, цефтриаксону, цефтазидиму и др.) и фторхинолонам 4-го поколения (моксифлоксацину) [78]. Доля устойчивых штаммов *C. difficile* к тетрациклину варьирует в разных странах от

2 до 42% [79]. Brajerovaa et al. проанализировали устойчивость *C. difficile* различных риботипов к метронидазолу, моксифлоксацину и рифампину. Они установили, что спектр резистентности *C. difficile* зависел не только от принадлежности штамма к риботипу, но и от региона его выделения: риботипы, циркулирующие, например, в Европе, имели спектр устойчивости к антимикробным препаратам другой, нежели риботипы *C. difficile*, изолированные в регионе Дальнего Востока [80].

У клинических штаммов *C. difficile* детектирован ряд генов, предположительно β-лактамаз, обуславливающих устойчивость их к β-лактамам антибиотикам [81]. Описаны также гены, кодирующие рибосомальные метилазы, обеспечивающие устойчивость *C. difficile* к макролидам, в частности к эритромицину; авторы работы отмечали широкое распространение этой группы генов среди *C. difficile* [81-83]. На хромосоме *C. difficile* выявлена область мутации QRDR, которая ассоциируется с устойчивостью штаммов к фторхинолонам [82]. Heidari et al. сообщили, что устойчивость *C. difficile* к тетрациклину может быть обусловлена не только геном *tetM*, но и геном *tetW*, встречающимся в штаммах человека и животных [83]. Freeman et al. показали, что устойчивость к хлорамфениколу у *C. difficile* связана с присутствием у них гена *cstD*, который кодирует хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, этот ген может быть локализован на транспозоне [84].

### Патогенез заболевания

КДИ начинается после попадания возбудителя из внешней среды в желудок человека или животного. Большинство вегетативных клеток, как показывают экспериментальные данные, в кислой среде желудка погибают [85]. Однако споры *C. difficile*, благодаря устойчивости к кислой среде, проходят через него и адгезируются в тонком кишечнике. Здесь, в благоприятных для них условиях и при сниженной конкуренции со стороны нормальной кишечной микробиоты, споры *C. difficile* при воздействии желчных кислот, в частности таурохолевой кислоты, быстро прорастают и, в виде вегетативных клеток, мигрируют в толстую кишку, наиболее частое место локализации инфекционного процесса (рис. 8А).

Попав в толстый кишечник, *C. difficile* экспрессирует ряд факторов вирулентности: жгутики и фимбрии, способствующие движению и прикреплению бактерий к слизистой кишечника; протеолитические и гидролитические ферменты, нарушающие слизистый барьер кишечника; белки клеточной стенки Cwp66, способствующие адгезии *C. difficile* к энтероцитам; антифагоцитарная капсула (S-слой), препятствующая опсонизации и поглощению патогена полиморфноядерными лейкоцитами. Как только *C. difficile* локализуется на слизистой толстой кишки, бактерии начинают продуцировать токсины CdtA, CdtB и, в ряде случаев, бинарный CDT-токсин. Показано, что токсин CdtA (энтеротоксин) вызывает воспаление слизистой толстой кишки и индуцирует секрецию жидкости в кишечнике. Именно с токсическим действием CdtA связывают развитие водянистой диареи у больных КДИ. Токсин CdtB (цитотоксин) является основной причиной гибели эпителиальных клеток кишечника. В то же время повышенная продукция этого токсина может привести к пора-

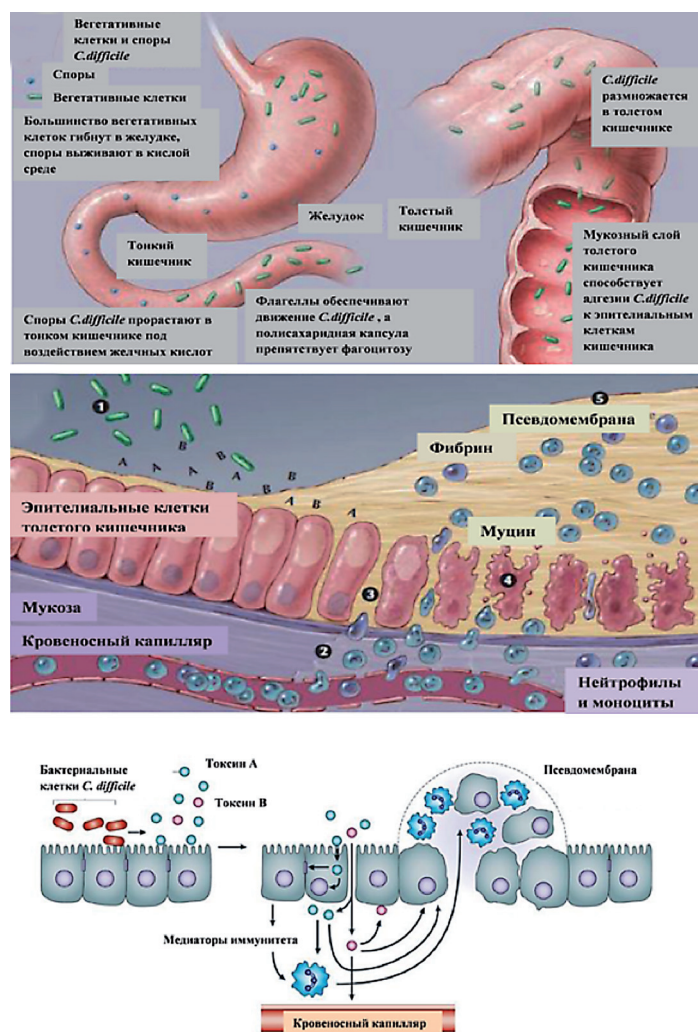


Рис. 8. Колонизация *C. difficile* толстого кишечника и патогенез заболевания: А – прорастание спор и адгезия; Б, Г – токсинообразование и ответ иммунной системы. Адаптировано из [88].

жению других (кроме кишечника) органов и систем, например сердечно-сосудистой. Основная мишень бинарного токсина CDT – актиновые волокна эукариотических клеток, включая энтероциты и фагоцитирующие клетки. Вследствие деградации актинового скелета клеток они либо погибают, либо теряют свои функции (например, макрофаги под действием CDT теряют свою фагоцитирующую способность). Другой механизм патогенетического действия CDT связан с его прямым влиянием на процессы иммунного ответа эукариотических клеток: CDT приводит к стимуляции воспалительной реакции, опосредованной Toll-like рецептором 2, вследствие снижения количества эозинофилов, обуславливающих контроль за процессами воспаления [86].

Патофизиологические и патоморфологические нарушения, вызванные токсинами *C. difficile*, усугубляются влиянием их на активность иммунной системы макроорганизма. В частности, токсины CdtA и CdtB индуцируют выработку резидентными макрофагами и моноцитами цитокинов: фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкинов IL-1 и IL-6. Будучи провоспалительными цитокинами, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 вызывают интенсивную миграцию нейтрофилов к месту локализации патогена. Миграции нейтрофилов к месту воспа-

ления способствует и IL-8, вырабатываемый макрофагами под действием токсинов *C. difficile*. Нейтрофильная инфильтрация слизистой является отличительной особенностью энтероколита, вызываемого *C. difficile* (рис. 8Б, 8Г).

Инфильтрация слизистой нейтрофилами способствует повышенной ее проницаемости и нарушению целостности межклеточных соединений, что приводит к разрушению цитоскелетных структур (актина) в энтероцитах. В тяжелых случаях течения болезни на внешней поверхности слизистой толстой кишки возникают псевдомембраны, состоящие из гнойного фибринозного экссудата и иммунных клеток [87].

### Заключение

Биологические особенности *C. difficile*, возбудителя антибиотик-ассоциированной диареи и псевдомембранозного колита, такие как наличие S-слоя, способность к образованию спор и формированию биопленок, позволяют патогену длительно персистировать в организме человека и сохраняться в неблагоприятных условиях внешней среды. Эти свойства представляют потенциальную опасность для иммунокомпрометированных лиц и лиц, находящихся на стационарном лечении и подвергающихся (или подвергавшихся ранее) интенсивной антибиотикотерапии.

Основными факторами вирулентности *C. difficile* являются TcdA, TcdB и бинарный CDT-токсин, вызывающие поражение толстого кишечника и развитие тяжелых форм диареи и псевдомембранозного колита. Особую опасность для человека представляет группа гипервирулентных эпидемически успешных штаммов *C. difficile* риботипов 027, 078, 075 и др., синтезирующих повышенные количества всех трех токсинов и вызывающих особо тяжелые формы КДИ.

В геноме *C. difficile* может присутствовать большое количество мобильных генетических элементов (плазмиды, бактериофаги, транспозоны и др.), способствующих обмену генетической информацией между *C. difficile* и быстрой адаптации патогена к условиям его обитания.

Среди штаммов *C. difficile*, возбудителей КДИ, часто детектируют устойчивые к антибиотикам варианты патогена, в том числе устойчивых к  $\beta$ -лактамам, фторхинолонам, макролидам, тетрациклинам, хлорфениколу и рифампицину. Встречаются штаммы, резистентные к ванкомицину и метронидазолу – препаратам, часто используемым для эффективного лечения КДИ. Распространение антибиотикорезистентности среди *C. difficile* нацеливает исследователей на поиски новых, альтернативных антибиотикам путей лечения КДИ.

Уникальные биологические особенности возбудителя КДИ, описанные в обзоре, свидетельствуют о весьма высоком патогенном его потенциале и о больших трудностях в организации противоэпидемических мероприятий против этой инфекции и ее лечения.

### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

### Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of Rosпотребнадзор.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

### Литература / References

1. Czepiel J, Drózd M, Pituch H, Kuijper EJ, Perucki W, Mielimonka A, et al. *Clostridium difficile* infection: review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019 Jul;38(7):1211-1221. DOI: 10.1007/s10096-019-03539-6
2. Hall I, O'Toole E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, Bacillus difficilis. Am J Dis Child. 1935;49:390.
3. Johnson S, Lavergne V, Skinner AM, Gonzales-Luna AJ, Garey KW, Kelly CP, Wilcox MH. Clinical practice guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 focused update guidelines on management of *Clostridioides difficile* infection in adults. Clin Infect Dis. 2021;73:1029-1044.
4. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH. Clindamycin-associated colitis. A prospective study. Ann Intern Med. 1974;81(4):429-433.
5. Pereira JA, McGeer A, Tomovici A, Selmani A, Chit A. Incidence and economic burden of *Clostridioides difficile* infection in Ontario: a retrospective population-based study. CMAJ Open. 2020 Jan 30;8(1):E16-E25. DOI: 10.9778/cmajo.20190018
6. Kurti Z, Lovasz BD, Mandel MD, Csima Z, Golovics PA, Csako BD, et al. Burden of *Clostridium difficile* infection between 2010 and 2020: Trends and outcomes from an academic center in Eastern Europe. World J Gastroenterol. 2020;21(21):6728-6735. DOI: 10.3748/wjg.v21.i21.6728
7. Алёшкин ВА, Селькова ЕП, Миронов АЮ, Гренкова ТА, Шельгин ЮА, Сухина МА, Ачкасов СИ, Сафин АЛ. Лабораторная диагностика *Clostridium difficile*-ассоциированных диарей. Федеральные клинические рекомендации. М., 2017, 24 с. / Aleshkin VA, Selkova EP, Mironov AYU, Grenkova TA, Shelygin YuA, Sukhina MA, Achkasov SI, Safin AL. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Federal clinical guidelines. Moscow, 2017, 24 p. (In Russian).
8. Николаева ИВ, Халлиулина СВ, Муртазина ГХ, Анохин ВА. Инфекция, вызванная *Clostridioides (Clostridium) difficile*. Обзор актуальных клинических рекомендаций. Практическая медицина. 2020;18(6):106-112. / Nikolaeva IV, Khaliullina SV, Murtazina GK, Anokhin VA. *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection. Review of current clinical guidelines. Practical Medicine. 2020;18(6):106-112. DOI: 10.32000/2072-1757-2020-6-106-112 (In Russian).
9. Kao D, Wong K, Franz R, Cochrane K, Sherriff K, Chui L, et al. The effect of a microbial ecosystem therapeutic (MET-2) on recurrent *Clostridioides difficile* infection: a phase 1, open-label, single-group trial. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2021 Apr;6(4):282-291. DOI: 10.1016/S2468-1253(21)00007-8
10. Vedantam G, Clark A, Chu M, McQuade R, Mallozzi M, Viswanathan VK. *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. Gut Microbes. 2012 Mar-Apr;3(2):121-34. DOI: 10.4161/gmic.19399
11. Davies AH, Roberts AK, Shone CC, Acharya KR. Super toxins from a super bug: Structure and function of *Clostridium difficile* toxins. Biochem J. 2021;436(3):517-526.
12. Segal JP, Mullish BH, Quraishi MN, Iqbal T, Marchesi JR, Sokol H. Mechanisms underpinning the efficacy of faecal microbiota transplantation in treating gastrointestinal disease. Therap Adv Gastroenterol. 2020 Sep 3;13:1756284820946904. DOI: 10.1177/1756284820946904
13. Tam J, Icho S, Utama E, Orrell KE, Gómez-Biagi RF, Theriot CM, et al. Intestinal bile acids directly modulate the structure and function of *C. difficile* TcdB toxin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(12):6792-6800.
14. Barbut F, Gariazzo B, Bonne L, Lalande V, Burghoffer B, Luiuz R, Petit JC. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated infections and molecular characterization strains: results of a retrospective study, 2000-2004. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007 Feb;28(2):131-9. DOI: 10.1086/511794
15. Nobuaki M, Takashi T. Characteristics and Immunological Roles of Surface Layer Proteins in *Clostridium difficile*. Ann Lab Med. 2018 May;38(3):189-195. DOI: 10.3343/alm.2018.38.3.189
16. Krautkramer KA, Fan J, Backhed F. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. Nat Rev Microbiol. 2021 Feb;19(2):77-94. DOI: 10.1038/s41579-020-0438-4
17. Tenover FC, Tickler IA, Persing DH. Antimicrobial-resistant strains of *Clostridium difficile* from North America. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Jun;56(6):2929-32. DOI: 10.1128/AAC.00220-12
18. Guery B, Galperine T, Barbut F. *Clostridioides difficile*: diagnosis and treatments. BMJ. 2019 Aug 20;366:l4609. DOI: 10.1136/bmj.l4609
19. Zhu D, Wang S, Sun X. FliW and CsrA Govern Flagellin (FliC) Synthesis and Play Pleiotropic Roles in Virulence and Physiology of *Clostridioides difficile* R20291. Front Microbiol. 2021;12:1-14.
20. Gupta A, Saha S, Khanna S. Therapies to modulate gut microbiota: Past, present and future. World J Gastroenterol. 2020 Feb 28;26(8):777-788. DOI: 10.3748/wjg.v26.i8.777. PMID: 32148376
21. Kaus GM, Snyder LF, Müh U, Flores MJ, Popham DL, Ellermeier CD. Lysozyme Resistance in *Clostridioides difficile* Is Dependent on Two Peptidoglycan Deacetylases. J Bacteriol. 2020 Oct 22;202(22):e00421-20. DOI: 10.1128/JB.00421-20
22. Cox AD, Michael FSt, Aubry A, Strong PCR, Hayes AC, Logan SM. Comparison of polysaccharide glycoconjugates as candidate vaccines to combat *Clostridioides (Clostridium) difficile*. Glycoconjugate J. 2021;38:493-508.
23. Castro-Córdova P, Mora-Uribe P, Reyes-Ramírez R, Cofré-Araneda G, Orozco-Aguilar J, Brito-Silva C, et al. Entry of spores into intestinal epithelial cells contributes to recurrence of *Clostridioides difficile* infection. Nat Commun. 2021 Feb 18;12(1):1140. DOI: 10.1038/s41467-021-21355-5. Erratum in: Nat Commun. 2022 Apr 29;13(1):2465.
24. Martins D, DiCandia MA, Mendes AL, Wetzel D, McBride SM, Henriques AO, Serrano M. CD25890, a conserved protein that modulates sporulation initiation in *Clostridioides difficile*. Sci Rep. 2021;11:7887-7892.
25. Pizarro-Guajardo M, Calderón-Romero P, Romero-Rodríguez A, Paredes-Sabja D. Characterization of Exosporium Layer Variability of *Clostridioides difficile* Spores in the Epidemically Relevant Strain R20291. Front Microbiol. 2020 Jul 2;11:1345. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01345
26. Kochan TJ, Foley MH, Shoshiev MS, Somers MJ, Carlson PE, Hanna PC. Updates to *Clostridium difficile* Spore Germination. J Bacteriol. 2018 Jul 25;200(16):e00218-18. DOI: 10.1128/JB.00218-18. PMID: 29760211
27. Chilton CH, Pickering, Freeman J. Microbiological factors affecting *Clostridium difficile* recurrence. Clin Microbiol Infect. 2018;24:476-482.
28. Wexler AG, Guiberson ER, Beavers WN, Shupe JA, Washington MK, Lacy DB, et al. *Clostridioides difficile* infection induces a rapid influx of bile acids into the gut during colonization of the host. Cell Rep. 2021 Sep 7;36(10):109683. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109683
29. Henkel D, Tatge H, Schöttelndreier D, Tao L, Dong M, Gerhard R. Receptor Binding Domains of TcdB from *Clostridioides difficile* for Chondroitin Sulfate Proteoglycan-4 and Frizzled Proteins Are Functionally Independent and Additive. Toxins. 2020;12:736-752.
30. Schöttelndreier D, Langejürgen A, Lindner R, Genth H. Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 (LRP1) Is Involved in the Uptake of *Clostridioides difficile* Toxin A and Serves as an Internalizing Receptor. Front Cell Infect Microbiol. 2020 Oct 19;10:565465. DOI: 10.3389/fcimb.2020.565465
31. Ruhe F, Olling A, Abromeit R, Rataj D, Grieschat M, Zeug A, et al. Overexpression of the Endosomal Anion/Proton Exchanger CIC-5 Increases Cell Susceptibility

- toward *Clostridium difficile* Toxins TcdA and TcdB. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:1-15.
32. Bacci S, Molbak K, Kjeldsen MK, Olsen KE. Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jun;17(6):976-82. DOI: 10.3201/eid1706.101483
  33. Normington C, Moura IB, Bryant JA, Ewin DJ, Clark EV, Kettle MJ, et al. Biofilms harbour *Clostridioides difficile*, serving as a reservoir for recurrent infection. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2021 Feb 5;7(1):16. DOI: 10.1038/s41522-021-00184-w
  34. Dawson LF, Peltier J, Hall CL, Harrison MA, Derakhshan M, Shaw HA, et al. Extracellular DNA, Cell Surface Proteins and C-Di-GMP Promote Biofilm Formation in *Clostridioides Difficile*. *Sci Rep.* 2021;11:3244.
  35. Taggart MG, Snelling WJ, Naughton PJ, La Ragione RM, Dooley JSG, Ternan NG. Biofilm regulation in *Clostridioides difficile*: Novel systems linked to hypervirulence. *PLoS Pathog.* 2021 Sep 9;17(9):e1009817. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009817
  36. Orrell KE, Melnyk RA. Large Clostridial Toxins: Mechanisms and Roles in Disease. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2021 Aug 18;85(3):e0006421. DOI: 10.1128/MMBR.00064-21
  37. Di Bella S, Ascenzi P, Siarakas S, Petrosillo N, di Masi A. *Clostridium difficile* Toxins A and B: Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects. *Toxins (Basel).* 2016 May 3;8(5):134. DOI: 10.3390/toxins8050134
  38. Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiol Rev.* 2017 Nov 1;41(6):723-750. DOI: 10.1093/femsre/fux048
  39. Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol.* 2016 Oct;14(10):609-20. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.108
  40. Brouwer MSM, Roberts AP, Hussain H, Williams RJ, Allan E, Mullany P. Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nat Commun.* 2013;4:2601. DOI: 10.1038/ncomms3601.
  41. Saund K, Pirani A, Lacy DB, Hanna PC, Snitkin E. View ORCID ProfileEvan SnitkinStrain variation in *Clostridioides difficile* toxin activity associated with genomic variation at both PaLoc and non-PaLoc loci. *bioRxiv.* 2021;23:11-19.
  42. Ahn SW, Lee SH, Kim UJ, Jang HC, Choi HJ, Choy HE, et al. Genomic characterization of nine *Clostridioides difficile* strains isolated from Korean patients with *Clostridioides difficile* infection. *Gut Pathog.* 2021 Sep 16;13(1):55. DOI: 10.1186/s13099-021-00451-3
  43. Kodori M, Ghalavand Z, Yadegar A, Eslami G, Azimirad M, Krutova M, et al. Molecular characterization of pathogenicity locus (PaLoc) and *tcdC* genetic diversity among *tcdA+B+* *Clostridioides difficile* clinical isolates in Tehran, Iran. *Anaerobe.* 2020 Dec;66:102294. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2020.102294
  44. Skinner AM, Phillips ST, Merrigan MM, O'Leary KJ, Sambol SP, Siddiqui F, et al. The Relative Role of Toxins A and B in the Virulence of *Clostridioides difficile*. *J Clin Med.* 2020 Dec 30;10(1):96. DOI: 10.3390/jcm10010096
  45. Aliramezani A, Talebi M, Baghani A, Hajabdolbaghi M, Salehi M, Abdollahi A, et al. Pathogenicity locus determinants and toxinotyping of *Clostridioides difficile* isolates recovered from Iranian patients. *New Microbe New Infect.* 2018;25:52-57.
  46. Cairns MD, Preston MD, Hall CL, Gerding DN, Hawkey PM, Kato H, et al. Comparative Genome Analysis and Global Phylogeny of the Toxin Variant *Clostridium difficile* PCR Ribotype 017 Reveals the Evolution of Two Independent Sublineages. *J Clin Microbiol.* 2017 Mar;55(3):865-876. DOI: 10.1128/JCM.01296-16. Epub 2016 Dec 28. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2017 Jun;55(6):1971.
  47. Shaw HA, Preston MD, Vendrik KEW, Cairns MD, Browne HP, Stabler RA, et al. The recent emergence of a highly related virulent *Clostridium difficile* clade with unique characteristics. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Apr;26(4):492-498. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.09.004
  48. Fatima R, Aziz M. The hypervirulent strain of *Clostridium difficile*: NAP1/B1/027: a brief overview. *Cureus.* 2019 Jan 29;11(1):e3977. DOI: 10.7759/cureus.3977
  49. Orozco-Aguilar J, Alfaro-Alarcón A, Acuña-Amador L, Chaves-Olarte E, Rodríguez C, Quesada-Gómez C. *In vivo* animal models confirm an increased virulence potential and pathogenicity of the NAP1/RT027/ST01 genotype within the *Clostridium difficile* MLST Clade 2. *Gut Pathog.* 2020;12:45-55.
  50. Endres BT, Begum K, Sun H, Walk ST, Memariani A, Lancaster C, et al. Epidemic *Clostridioides difficile* Ribotype 027 Lineages: Comparisons of Texas Versus Worldwide Strains. *Open Forum Infect Dis.* 2019 Feb 9;6(2):ofz013. DOI: 10.1093/ofid/ofz013
  51. Imwattana K, Knight DR, Kullin B, Collins DA, Putsathit P, Kiratisin P, Riley TV. *Clostridium difficile* ribotype 017 – characterization, evolution and epidemiology of the dominant strain in Asia. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):796-807. DOI: 10.1080/22221751.2019.1621670
  52. Edwards AN, Krall EG, McBride SM. Strain-Dependent RstA Regulation of *Clostridioides difficile* Toxin Production and Sporulation. *J Bacteriol.* 2020;202:19-36.
  53. Kuenzli AB, Burri S, Casanova C, Sommerstein R, Buetti N, Seth-Smith HMB, et al. Successful management of a *Clostridioides difficile* ribotype 027 outbreak with a lean intervention bundle. *J Hosp Infect.* 2020 Oct;106(2):240-245. DOI: 10.1016/j.jhin.2020.07.034
  54. Connor MC, McGrath JW, McMullan G, Marks N, Guelbenzu M, Fairley DJ. Emergence of a non-sporulating secondary phenotype in *Clostridium (Clostridioides) difficile* ribotype 078 isolated from humans and animals. *Sci Rep.* 2019 Sep 23;9(1):13722. DOI: 10.1038/s41598-019-50285-y
  55. Frost LR, Cheng JKJ, Unnikrishnan M. *Clostridioides difficile* biofilms: A mechanism of persistence in the gut? *PLoS Pathog.* 2021 Mar 11;17(3):e1009348. doi: 10.1371/journal.ppat.1009348
  56. Slater RT, Frost LR, Jossi SE, Millard AD, Unnikrishnan M. *Clostridioides difficile* LuxS mediates inter-bacterial interactions within biofilms. *Sci Rep.* 2019 Jul 9;9(1):9903. DOI: 10.1038/s41598-019-46143-6
  57. Dapa T, Unnikrishnan M. Biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Gut Microbes.* 2013;4(5):397-402.
  58. Rahmoun LA, Azrad M, Peretz A. Antibiotic Resistance and Biofilm Production Capacity in *Clostridioides difficile*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Aug 4;11:683464. DOI: 10.3389/fcimb.2021.683464
  59. Khurana S, Kahl A, Dupont AW. Recent Advances in the Treatment of *Clostridioides Difficile* Infection: The Ever-Changing Guidelines. *Fac Rev.* 2020 Nov 18;9:13. DOI: 10.12703/b/9-13
  60. Boekhoud IM, Hornung BVH, Sevilla E, Harmanus C, Bos-Sanders IMJG, Terveer EM, et al. Plasmid-mediated metronidazole resistance in *Clostridioides difficile*. *Nat Commun.* 2020 Jan 30;11(1):598. DOI: 10.1038/s41467-020-14382-1
  61. Pu M, Cho JM, Cunningham SA, Behera GK, Becker S, Amjad T, et al. Plasmid acquisition alters vancomycin susceptibility in *Clostridioides difficile*. *Gastroenterology.* 2021 Feb;160(3):941-945.e8. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.10.046
  62. Bushman FD, Conrad M, Ren Y, Zhao C, Gu C, Petucci C, et al. Multi-omic analysis of the interaction between *Clostridioides difficile* infection and pediatric inflammatory bowel disease. *Cell Host Microbe.* 2020 Sep 9;28(3):422-433.e7. DOI: 10.1016/j.chom.2020.07.020
  63. Boekhoud IM, Sidorov I, Nooij S, Harmanus C, Bos-Sanders IMJG, Viprey V, et al; COMBACTE-CDI Consortium. Haem is crucial for medium-dependent metronidazole resistance in clinical isolates of *Clostridioides difficile*. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Jun 18;76(7):1731-1740. DOI: 10.1093/jac/dkab097
  64. Knight DR, Imwattana K, Kullin B, Guerrero-Araya E, Paredes-Sabja D, Didelot X, et al. Major genetic discontinuity and novel toxigenic species in *Clostridioides difficile* taxonomy. *Elife.* 2021 Jun 11;10:e64325. DOI: 10.7554/eLife.64325
  65. Ramirez-Vargas G, Rodriguez C. Putative conjugative plasmids with *tcdB* and *cdtAB* genes in *Clostridioides difficile*. *Emerg Infect Dis.* 2020 Sep;26(9):2287-2290. DOI: 10.3201/eid2609.191447
  66. Smits WK, Lyras D, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Apr 7;2:16020. DOI: 10.1038/nrdp.2016.20
  67. Ramirez-Vargas G, López-Ureña D, Badilla A, Orozco-Aguilar J, Murillo T, Rojas P, et al. *Clostridium difficile* strains escape diagnostic tests, differ in pathogenicity potential and carry toxins on extrachromosomal elements. *Sci Rep.* 2018 Sep 17;8(1):13951. DOI: 10.1038/s41598-018-32390-6

68. Kartalidis P, Skoulakis A, Tsilipounidaki K, Florou Z, Petinaki E, Fthenakis GC. *Clostridioides difficile* as a Dynamic Vehicle for the Dissemination of Antimicrobial-Resistance Determinants: Review and *In Silico* Analysis. *Microorganisms*. 2021;9(7):1383-1396.
69. Jasni AS, Mullany P and Roberts AP. Demonstration of Conjugative Transposon (Tn5397)-Mediated Horizontal Gene Transfer between *Clostridium difficile* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4924-4926.
70. Mullany P, Allan E, Roberts AP. Mobile genetic elements in *Clostridium difficile* and their role in genome function. *Res Microbiol*. 2015 May;166(4):361-7. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.12.005
71. Lyras D, Storie C, Huggins AS, Crellin PK, Bannam TL, Rood JI. Chloramphenicol Resistance in *Clostridium difficile* Is Encoded on Tn4453 Transposons That Are Closely Related to Tn4451 from *Clostridium perfringens*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(7):1563-1570.
72. Farrow KA, Lyras D, Rood JI. Genomic analysis of the erythromycin resistance element Tn5398 from *Clostridium difficile*. *Microbiology (Reading)*. 2001 Oct;147(Pt 10):2717-2728. DOI: 10.1099/00221287-147-10-2717
73. Wu Y, Liu C, Li WG, Xu JL, Zhang WZ, Dai YF, Lu JX. Independent Microevolution Mediated by Mobile Genetic Elements of Individual *Clostridium difficile* Isolates from Clade 4 Revealed by Whole-Genome Sequencing. *mSystems*. 2019;4(2):e00252-18.
74. Whittle MJ, Bilverstone TW, van Esveld RJ, Lücke AC, Lister MM, Kuehne SA, Minton NP. A Novel Bacteriophage with Broad Host Range against *Clostridioides difficile* Ribotype 078 Supports SlpA as the Likely Phage Receptor. *Microbiol Spectr*. 2022 Feb 23;10(1):e0229521. DOI: 10.1128/spectrum.02295-21
75. Kreis V, Soutourina O. *Clostridioides difficile* – phage relationship the RNA way. *Curr Opin Microbiol*. 2022 Apr;66:1-10. DOI: 10.1016/j.mib.2021.11.012
76. Van Eijk E, Anvar SY, Browne HP, Leung WY, Frank J, Schmitz AM, et al. Complete genome sequence of the *Clostridium difficile* laboratory strain 630 $\Delta$ erm reveals differences from strain 630, including translocation of the mobile element CTn5. *BMC Genomics*. 2015 Jan 31;16(1):31. DOI: 10.1186/s12864-015-1252-7
77. Yun JH, Park GE, Ki HK. Correlation between antibiotic consumption and the incidence of healthcare facility-onset *Clostridioides difficile* infection: a retrospective chart review and analysis. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2021 Aug 6;10(1):117. DOI: 10.1186/s13756-021-00986-9
78. Putsathit P, Maneerattanaporn M, Piewngam P Knight DR, Kiratisin P, Riley TV. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated in Thailand. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017 Jun 8;6:58. DOI: 10.1186/s13756-017-0214-z
79. Peng Z, Jin D, Sun X. Update on Antimicrobial Resistance in *Clostridium difficile*: Resistance Mechanisms and Antimicrobial Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol*. 2017 Jul;55(7):1998-2008. DOI: 10.1128/JCM.02250-16
80. Brajerovaa M, Zikovaab J, Krutova M. *Clostridioides difficile* epidemiology in the Middle and the Far East. *Anaerobe*. 2022 Apr;74:102542. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2022.102542
81. Sandhu BK, Edwards AN and McBride SM. Regulation and Anaerobic Function of the *Clostridioides difficile*  $\beta$ -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;64(1):1496-1515.
82. Mac Aogáin M, Kilkenny S, Walsh C, Lindsay S, Moloney G, Morris T, Jones S, Rogers TR. Identification of a novel mutation at the primary dimer interface of GyrA conferring fluoroquinolone resistance in *Clostridium difficile*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2015 Dec;3(4):295-299. DOI: 10.1016/j.jgar.2015.09.007
83. Heidari H, Ebrahim-Saraie HS and Bazargani A. Toxin profiles and antimicrobial resistance patterns among toxigenic clinical isolates of *Clostridioides (Clostridium) difficile*. *Iran J Basic Med Sci*. 2019;22(7):813-819.
84. Spigaglia P, Mastrantonio P, Barbanti F. Antibiotic Resistances of *Clostridium difficile*. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1050:137-159. DOI: 10.1007/978-3-319-72799-8\_9
85. Smits WK, Roseboom AM, Corver J. Plasmids of *Clostridioides difficile*. *Curr Opin Microbiol*. 2022 Feb;65:87-94. DOI: 10.1016/j.mib.2021.10.016
86. Donlan A, Petri WA Jr. The Inflammasome and Type-2 Immunity in *Clostridium difficile* Infection. *Clin Colon Rectal Surg*. 2020 Mar;33(2):67-72. DOI: 10.1055/s-0040-1701231
87. Farooq PD, Urrunaga NH, Tang DM, von Rosenvinge EC. Pseudomembranous colitis. *Dis Mon*. 2015 May;61(5):181-206. DOI: 10.1016/j.disamonth.2015.01.006
88. Poutanen SM, Simor AE. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ*. 2004 Jul 6;171(1):51-8. DOI: 10.1503/cmaj.1031189

---

#### Информация об авторах:

Ерусланов Борис Васильевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мицевич Ирина Петровна, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

---

#### Information about co-authors:

Boris V. Eruslanov, MD, PhD, DSc, Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Edward A. Svetoch, PhD, DSc (Veterinary Sciences), Professor, Chief Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Irina P. Mitsevich, Senior Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor