



RS Global Journals

Scholarly Publisher
RS Global Sp. z O.O.
ISNI: 0000 0004 8495 2390

Dolna 17, Warsaw, Poland 00-773
Tel: +48 226 0 227 03
Email: editorial_office@rsglobal.pl

JOURNAL	World Science
p-ISSN	2413-1032
e-ISSN	2414-6404
PUBLISHER	RS Global Sp. z O.O., Poland
ARTICLE TITLE	РОЗРОБКА СЕЛЕКТИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ТОКСИН ПРОДУКУЮЧИХ ШТАМІВ C. DIFFICILE
AUTHOR(S)	Кхедер Саїд Салех
ARTICLE INFO	Kheder Said Saleh. (2020) Development of the Selective Nutrient Medium for Isolation of Toxin Producing Strains of C. Difficile. World Science. 8(60). doi: 10.31435/rsglobal_ws/31102020/7216
DOI	https://orcid.org/0000-0002-0765-3157
RECEIVED	23 August 2020
ACCEPTED	10 October 2020
PUBLISHED	16 October 2020
LICENSE	 <p>This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.</p>

© The author(s) 2020. This publication is an open access article.

РОЗРОБКА СЕЛЕКТИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ТОКСИН ПРОДУКУЮЧИХ ШТАМІВ *C. DIFFICILE*

Kheder Said Saleh,

Молодший науковий співробітник, Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»,
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0765-3157>

DOI: https://doi.org/10.31435/rsglobal_ws/31102020/7216

ARTICLE INFO

Received: 23 August 2020

Accepted: 10 October 2020

Published: 16 October 2020

KEYWORDS

C. difficile,
toxin-producing activity,
nutrient media.

ABSTRACT

Enterocolitis disorders caused by *Clostridioides difficile* infection still remain a serious health problem in the world. In many countries CDI is officially considered a nosocomial infection that causes considerable economic losses, including diagnostic and treatment costs. According to the existing data, *C. difficile* is the main agent causing antibiotic – associated diarrhea and the main etiologic factor of the pseudomembranous colitis (PMC) that often develops in case of complete destruction of the intestinal flora due to the use of antibiotics or chemotherapeutic agents. There is no official registration of CDI in Ukraine, therefore the official incidence and lethality rates are absent.

At this time, the problems of development and improvement of selective nutrient mediums and quick, affordable bacteriological methods of *C. difficile* isolation are especially relevant.

The comparative study of the efficacy of the known commercial nutrient mediums for isolation of toxin-producing strains of *C. difficile* was carried out and composition of a new, original selective nutrient medium was proposed. Unlike existing analogs, the proposed nutrient medium is suitable for the simultaneous isolation of the agent from the clinical material and detection of toxin-producing properties due to its high growth properties, optimal transparency and density.

Citation: Kheder Said Saleh. (2020) Development of the Selective Nutrient Medium for Isolation of Toxin Producing Strains of *C. Difficile*. *World Science*. 8(60). doi: 10.31435/rsglobal_ws/31102020/7216

Copyright: © 2020 Kheder Said Saleh. This is an open-access article distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License (CC BY)**. The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Вступ. Ентероколіти, обумовлені *Clostridioides difficile*-інфекція (CDI) і досі залишаються серйозною проблемою охорони здоров'я в усьому світі. У багатьох країнах CDI офіційно визнано, як нозокоміальну, економічні втрати від якої досить суттєві, враховуючи витрати на діагностику та лікування. За даними Центру контролю та профілактики захворювань (CDC), тільки у Сполучених Штатах у 2017 році CDI спостерігалась у 223 900 випадків, 12 800 – це були випадки з летальним кінцем, витрати на охорону здоров'я, пов'язані з цим, склали 1 млрд. долл. США [1].

У Європі на початку 2000-х захворюваність на CDI була у 10 разів нижчою, ніж зараз. Починаючи з 2007 року, коли був зареєстрований перший випадок CDI, спричинений епідемічним штамом 027, європейські країни та США, враховуючи підвищену небезпеку нового, на той час, епідемічного штаму, ввели обов'язкову реєстрацію важких захворювань, обумовлених CDI, розробили та впровадили низку протиепідемічних заходів [2, 3].

Нині захворюваність на CDI у Європейських країнах складає 10,0 – 30,0% серед всіх антибіотикоасоційованих діарей, та поки що, має тенденцію до збільшення частоти і тяжкості захворювання [4-6].

У країнах Азії, зокрема у Китаї, останні дослідження показують таку саму захворюваність на CDI, як і в європейських країнах. Нові дослідження, проведені показали захворюваність CDI на рівні 31,1 % [7].

В Україні офіційна реєстрація CDI відсутня, тому відсутні і офіційні показники захворюваності, а також смертності.

Clostridioides difficile (*C. difficile*) – грам позитивна рухлива спороутворююча паличка, облигатний анаероб, представник факультативної мікрофлори кишківника. За таксономічною класифікацією належить до сімейства *Peptostreptococcaceae*, роду *Clostridioides*. До 2016 року *C. difficile* розглядали, як представника роду *Clostridium*, але після проведення секвенування 16S р РНК та рибосомального білка, *C. difficile* та *C. mangenotii* було віднесено до окремого роду *Clostridioides* [8, 9]. Представники цього виду можуть продукувати екзотоксини і бути патогенними для людей і тварин.

C. difficile – є основним збудником антибіотикоасоційованих діарей та головним етіологічним фактором розвитку псевдомембранозного коліту (ПМК), що часто виникає у випадку знищення флори кишечника через використання антибіотиків або хіміотерапевтичних препаратів [10, 11].

Головну роль у патогенезі CDI відіграє такий фактор патогенності, як здатність збудника до продукції двох екзотоксинів: токсину А (TcdA) і токсину В (TcdB) [12]. Токсин А та токсин В мають сильну цитотоксичну та запальну дію. Ці токсини є ферментами глікозилтрансферазами, що каталізують інактивацію білків Rho, які відповідають за організацію актинового цитоскелету та функцію епітеліального бар'єру [13, 14]. Глікозилювання білків Rho призводить до дезагрегації актинового цитоскелету, збільшенню проникності мембран, втраті бар'єрної функції, склеюванню клітин та їх загибелі [15]. Внаслідок руйнування епітеліальних клітин виникає порушення водно-електролітного обміну в цілому, що сприяє секреції рідини у кишковий простір. Токсини *C. difficile* здатні індукувати апоптоз та некроз епітеліальних клітин, беруть участь у тканезахисних запальних процесах, стимулюють масивні клітинні реакції у вигляді нейтрофільної інфільтрації з підвищенням активності та вивільненням цитокінів (IL-8, IL-6, IL-1 β , лейкотрієнів B4, інтерферону γ) [16, 17]. Існує також бінарний токсин, але його роль до кінця не вивчена [18].

За даними деяких дослідників, самим надійним, з можливістю широкого використання в практичній медицині, залишається культуральний (бактеріологічний) метод діагностики CDI. Але, бактеріологічне виділення штамів *C. difficile* з випорожнень хворих пов'язано з рядом труднощів, в тому числі з невеликою кількістю збудника в кишківнику через наявність рідких частих випорожнень. Крім того, без визначення токсигенних властивостей виділених збудників, бактеріологічний метод не може бути використаний, як самостійний, для проведення діагностики.

Таким чином, питання розробки та удосконалення селективних середовищ та швидких, доступних методів виявлення токсинів *C. difficile* залишається актуальним.

Матеріали і Методи.

Матеріалом для досліджень були зразки біотичного матеріалу (фекалії) відібрані від хворих з проявами CDI.

Відбір матеріалу здійснювали у стерильну пластикову ємність в об'ємі 5-10 мл. Дослідженню підлягали зразки рідких фекалій. При неможливості доставки зразків до лабораторії протягом 2 годин, фекалії відбирали у транспортну пробірку-тампон з середовищем Еймса в об'ємі не менш ніж 5 мл.

З метою виділення *C. difficile* досліджуваний матеріал у кількості 0,1 мл з розведень 10^3 - 10^6 висівали на селективний фруктозний агар – *Clostridium Difficile* Agar (CDA) (HiMedia, Індія) з селективною добавкою FD 010 (HiMedia, Індія), агар Шедлера з 5,0 % овечої крові (bio Mérieux, Франція) та на кров'яний сахарний агар (з 2,0 % глюкози та 10,0 -15,0 % крові). Чашки з посівами поміщали в анаеростат з GEN box анаер. Інкубація 37°C 5 діб.

Паралельно проводили висів на попередньо розплавлене та охолоджене до 45°C середовище Вільсона-Блера (по дві пробірки з кожного розведення). По одній пробірці кожного розведення прогрівали на водяній бані при 80°C на 20 хв. Інкубація 37°C 48 год.

Попередню ідентифікацію ізолюваних культур, що вирости на щільних середовищах, робили за характерною морфологією колоній, наявністю специфічного запаху крезолу

«навозу», результатами мікроскопії мазків, пофарбованих за Грамом (наявність крупних $3-6 \times 1,3-1,6$ нм грампозитивних паличок з овальними субтермінальними спорами) [19].

На середовищі Вільсона-Блера про наявність клостридій свідчили чорні колонії у товщі агару (наявність сульфитредуктази).

Для ідентифікації мікроорганізмів використовували API системи виробництва bio Mérieux, Франція (Rapid ID 32A – identification system for anaerobes).

Результати дослідження.

При розробці нового селективного середовища для виділення токсинпродукуючих штамів *C. difficile* з клінічного матеріалу, за основу було взято склад комерційного середовища Clostridium Difficile Agar (CDA) (HiMedia, Індія) з селективною добавкою FD 010 (HiMedia, Індія), поширеного в Україні. До основного складу входили наступні компоненти: протеаза пептон, гідрофосфат динатрію, калію дигідрофосфат, сульфат магнію, хлористий натрій, фруктоза, агар, антибіотики циклосерин та цефокситин. Для того, щоб середовище було незабарвленим та прозорим (придатним для проведення реакції імунопреципітації) до складу не було включено еритроцитарну добавку (7,0 % еритроцитів барана). З метою покращення ростових якостей та вивчення впливу різних компонентів рідких живильних середовищ на інтенсивність росту штамів *C. difficile* попередньо нами проводились дослідження, які показали, що додавання до живильних середовищ таких речовин, як розчин глюкози, дріжджовий екстракт та вікасол в концентраціях 1,0 %, 2,0 % та 1,0 % відповідно, сприяє інтенсивності росту *C. difficile* та статистично достовірному збільшенню кількості мікробних клітин порівняно з контрольним середовищем. Тому, глюкоза, дріжджовий екстракт та вікасол в концентраціях 1,0 %, 2,0 % та 1,0 % відповідно, також були включені нами до основного складу середовища, яке розробляється.

На першому етапі розробки середовища проведено порівняльне вивчення ростових якостей запропонованого середовища та середовища Clostridium Difficile Agar (CDA) (HiMedia, Індія). Для цього готували мікробні суспензії добових культур клінічного та музейного штамів *C. difficile* (1,0 за McF, $6,5 \times 10^7$ КУО/мл), робили ряд серійних десятикратних розведень і висівали по 0,1 мл на чашки з досліджуваними агарам. Культивування проводили 48 годин в анаеробних умовах, після чого підраховували кількість колоній. Результати представлені в таблиці 1.

Таблиця 1. Порівняння ростових якостей запропонованого та комерційного середовища, для виділення *C. difficile*.

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

Примітка: *C. difficile* 281 (музейний штам), *C. difficile* №1 (клінічний ізолят).

Отримані результати засвідчили, що запропоноване нами середовище має кращі ростові якості порівняно з комерційним середовищем. Ріст колоній клінічного та музейного штамів

C. difficile відбувається з розведення культури 10^3 (КУО/мл), тоді як на комерційному середовищі – при посівній дозі не менше, ніж 10^4 (КУО/мл). Таким чином, запропонований склад середовища підвищує чутливість методу і дозволяє виявляти збудника при значно меншій його кількості в клінічному матеріалі ($p \leq 0,05$).

Для перевірки селективних якостей взятого за основу комерційного середовища готували мікробні суспензії добових культур референс-штамів *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 25923, *Shigella flexneri* ДІСК 170 та контрольних лабораторних штамів: *Proteus mirabilis* 461, *Clostridium perfringens* 12, *Peptostreptococcus* spp., *Clostridioides difficile* 281 (1,0 за McF, $6,5 \cdot 10^7$ КУО/мл), робили серію десятикратних розведень і висівали по 0,1 мл на чашки. Результати вираховували через 48 годин культивування в анаеробних умовах.

Отримані результати свідчать про недостатній селективний ефект комерційного середовища. Комбінація антибіотиків циклосерина та цефокситина не затримує ріст анаеробних коків (пептострептококів).

На другому етапі з метою підвищення селективної якості середовищ для виділення *C. difficile*, проведено вивчення антимікробної дії по відношенню до пептострептококів та штамів *C. difficile* антибіотика амоксициліна, беталактамного препарату широкого спектру дії з групи пеніцилінів, який характеризується високою активністю по відношенню до анаеробних коків і низькою – до штамів *C. difficile*. Вивчення антимікробної дії проводили загальноприйнятим методом серійних розведень у напіврідкому тіогліколевому середовищі. Результати наведені у таблиці 2.

Таблиця 2. Активність амоксициліна до штамів *Peptostreptococcus* spp. та *C. difficile*

Мінімальні інгібуючі концентрації амоксициліна			
Штами <i>Peptostreptococcus</i> spp	МІК (г/л)	Штами <i>C. difficile</i>	МІК (г/л)
№ 1(музейний)	0,008	№ 258 (музейний)	0,032
№ 1(клінічний)	0,016	№ 1(клінічний)	0,128
№ 2(клінічний)	0,004	№ 2(клінічний)	0,064
№ 3(клінічний)	0,008	№ 3(клінічний)	0,064

Отримані результати дозволили визначити найменший рівень концентрації антибіотика амоксициліна (0,016 мг/л), який затримує ріст всіх перевірених штамів анаеробних коків і не пригнічує ріст штамів *C. difficile*. Введення амоксициліна в кількості 0,016 мг/л до складу запропонованого нами середовища дозволило підвищити його селективну дію порівняно з аналогом (табл. 3).

Таблиця 3. Порівняння складу та селективних якостей запропонованого середовища та середовища *Clostridium Difficile* Agar (HiMedia, Індія)

Найменування та одиниці виміру	Запропоноване середовище	Індія; HiMedia; <i>Clostridium difficile</i> Agar Base
Типова формула	г/л	г/л
1	2	3
Протеаза пептон	40,0	40,0
Гідрофосфат динарія	5,0	5,0
Калія дигідрофосфат	1,0	1,0
Сульфат магнія	0,1	0,1
Хлористий натрій	2,0	2,0
Фруктоза	6,0	6,0
Агар	15,0	15,0
pH	7,4 ± 0,2 при 25°C	7,4 ± 0,2 при 25°C
Глюкоза	1,0	
Вікасол	1,0	
Дріжджовий екстракт	2,0	

Продовження таблиці 3.

1	2	3
Циклосерин	0,5	0,5
Цефокситин	0,016	0,016
Амоксицилін	0,016	
Колір середовища	блід-жовтий, прозоре	шоколадний коричневий
Контроль якості:		
- Позитивний контроль: <i>Clostridioides difficile</i>	Хороший ріст, сіро-білого кольору колонії	Хороший ріст, сіро-білого кольору колонії
- Негативні контролю: <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Немає росту	Немає росту
<i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i>	Немає росту	Ріст від поодиноких колоній до помірного

Як свідчать результати таблиці 3 селективна дія середовища, що розробляється була вищою і відповідала необхідним вимогам.

З метою виявлення токсин продукуючих штамів *C. difficile* вивчалась можливість використання запропонованого середовища для постановки реакції преципітації зі специфічним антитоксином *C. difficile*. Перевіркою відомих твердих середовищ для вирощування *C. difficile* було встановлено, що проведенню реакції імунопреципітації можуть заважати надмірна щільність середовища (кількість агару більше 1,5 %) та наявність в складі середовищ кров'яних еритроцитарних добавок, які забарвлюють середовище, або барвників (нейтральний червоний та ін.). Склад запропонованого середовища відрізнявся від відомих аналогів відсутністю барвників та вмістом агару не більше, ніж 1,5 %. При дотриманні цих умов, середовище було придатним для проведення реакції преципітації зі специфічним антитоксином *C. difficile* (табл. 4).

Таблиця 4. Порівняльна характеристика розробленого середовища та середовища Clostridium Difficile Selective Agar (Canada)

Найменування та одиниці виміру	Запропонована корисна модель	Canada, USA; BD BBL™; Clostridium difficile Selective Agar
1	2	3
	г/л	г/л
Протеаза пептон	40,0	
Гідрофосфат динатрія	5,0	
Калія дигідрофосфат	1,0	
Сульфат магнія	0,1	
Хлористий натрій	2,0	2,0
Фруктоза	6,0	
Агар	15,0	20,0
pH	7,4 ± 0,2 при 25°C	7,2 ± 0,2
Глюкоза	1,0	
Вікасол	1,0	
Дріжджовий екстракт	2,0	
Пептичний гідролізат тваринної тканини		32,0
Манніт		6,0

Продовження таблиці 4.

1	2	3
Монокалія фосфат		1,0
Дінатрія фосфат		5,0
Фактори росту		3,3
Нейтральний червоний		0,03
Циклосерин	0,5	0,25
Цефокситин	0,016	0,016
Амоксицилін	0,016	
Контроль якості		
- Позитивний контроль: <i>Clostridioides difficile</i>	Хороший ріст, сіро-білого кольору колонії	Ріст від помірного до рясного; від блідо-жовтого до яскраво-жовтого
- Негативні контролю: <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Немає росту	Немає росту
<i>Peptococcus Peptostreptococcus</i>	Немає росту	Ріст від поодиноких колоній до помірного
Реакція імунопреципітації з антитоксином		
Позитивний контроль: токсигенний штам <i>Clostridioides difficile</i>	Специфічні лінії преципітації	Неможливість виявлення специфічних ліній преципітації
Негативний контроль нетоксигенний штам <i>Clostridioides difficile</i>	Відсутність специфічних ліній преципітації	Відсутність специфічних ліній преципітації

Висновки. Проведені дослідження дозволили шляхом удосконалення комерційних середовищ для виділення штамів *C. difficile*, розробити склад нового середовища. На відміну від існуючих аналогів, запропоноване середовище за рахунок оптимальної прозорості та щільності, придатне для детекції токсигенних властивостей штамів в реакції специфічної імунопреципітації з антитоксином. Запропонований склад середовища для виділення штамів *C. difficile* з клінічного матеріалу також має високу селективну дію.

Дана розробка може бути застосована у клінічній лабораторній практиці для виділення чистих культур штамів *C. difficile* з клінічного матеріалу та встановлення токсинопродукуючих властивостей, що покращить якість лабораторної діагностики CDI.

REFERENCES

1. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. (2019). Retrieved from www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html
2. Demihovskaya E. Dvulikiy C. difficile: vzbuditel ezhegodnoy infektsii i ili endogennyiy opportunist kishhechnoy mikrofloryi pri antibiotikoterapii. «Bolezni i antibiotiki». № 1(03). 2010. Retrieved from <http://www.mif-ua.com/archive/article/14568>
3. Clostridium difficile. Robert Koch-Institut: Erstveröffentlichung im Epidemiologischen Bulletin Juni 2009. Retrieved from <https://www.rki.de/>
4. Cai J, Zhao C, Du Y, Zhang Y, Zhao M, Zhao Q. Comparative efficacy and tolerability of probiotics for antibiotic-associated diarrhea: Systematic review with network meta-analysis. United European Gastroenterol J. 2018 Mar;6(2):169-180. Retrieved from <https://doi.org/10.1177/2050640617736987>
5. Schäffler H, Breitrück A. Clostridium difficile - From Colonization to Infection. Front Microbiol. 2018 Apr 10; 9:646. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00646>
6. Lessa FC, Mu Y, Bامberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, et al. Burden of Clostridium difficile infection in the United States. N Engl J Med. 2015;372(9):825-34. DOI: 10.1056/nejmoa1408913

7. Dai, W., Yang, T., Yan, L. et al. Characteristics of *Clostridium difficile* isolates and the burden of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection in a tertiary teaching hospital in Chongqing, Southwest China. *BMC Infect Dis* 20, 277 (2020). Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05014-6>
8. Oren, Aharon; Garrity, George M. (2017). "List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67 (9): 3140–3143. DOI:10.1099/ijsem.0.002278. PMC 5817221. PMID 28891789.
9. Lawson, Paul A.; Citron, Diane M.; Tyrrell, Kerin L.; Finegold, Sydney M. (August 2016). "Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938". *Anaerobe*. 40: 95–99. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.008. ISSN 1095-8274. PMID 27370902.
10. Lobzin Y.V., Kvetnaya A.S., Zhelezova L.I. PEDIATRIC RESEARCH AND CLINICAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES, ST. PETERSBURG, RUSSIA. *Marine Medicine*. 2017;3(1):14-24. (In Russ.) Retrieved from <https://doi.org/10.22328/2413-5747-2017-3-1-14-24>
11. Solovey NV, Karpov IA, Glaz OC (2013). *C. difficile* as the primary causative agent of antibiotic-associated diarrhea: current state of the problem [C. difficile kak osnovnoj vzbuditel' antibiotik-assotsirovannykh diarej: sovremennoe sostoyanie problemy]. *Klinicheskaya infektologiya i parazitologiya*. Prilozhenie, 102-125.
12. Waligora, A. J., Hennequin, C., Mullany, P., Bourlioux, P., Collignon, A., & Karjalainen, T. (2001). Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infection and immunity*, 69(4), 2144–2153. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2144-2153.2001>
13. Thomas Jank, Torsten Giesemann, Klaus Aktories, Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function, *Glycobiology*, Volume 17, Issue 4, April 2007, Pages 15R–22R. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm004>
14. Schirmer J, Aktories K. Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jul 6;1673(1-2):66-74. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.03.014>. PMID: 15238250
15. Voth, D. E., & Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clinical microbiology reviews*, 18(2), 247–263. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.247-263.2005>
16. Fiorentini, C., Fabbri, A., Falzano, L., Fattorossi, A., Matarrese, P., Rivabene, R., & Donelli, G. (1998). *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infection and immunity*, 66(6), 2660–2665. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/IAI.66.6.2660-2665.1998>
17. Carter GP, Chakravorty A, Pham Nguyen TA, Mileto S, Schreiber F, Li L, Howarth P, Clare S, Cunningham B, Sambol SP, Cheknis A, Figueroa I, Johnson S, Gerding D, Rood JI, Dougan G, Lawley TD, Lyras D. Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during *Clostridium difficile* Infections. *mBio*. 2015 Jun 2; 6(3): e00551. Doi: 10.1128/mBio.00551-15. PMID: 26037121; PMCID: PMC4453007.
18. Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR. 2004 Sep;68(3):373-402, table of contents. DOI: 10.1128/mmbr.68.3.373-402.2004.
19. Volyanskij Yu. L., Chernyavskij V. I., Biryukova S. V., Maryushchenko A. M. i dr. Patogennye klostridii. Mikrobiologicheskaya diagnostika klostridial'nyh infekcij. Metodicheskie rekomendacii dlya vrachej i internov po special'nosti «Bakteriologiya». Har'kov. 2013. 60 S