

Статья поступила в редакцию 4.11.2021 г.

DOI: 10.24412/2687-0053-2021-4-11-19

Информация для цитирования:

Сахаров С.П., Молокова О.А., Фролова О.И. ВИДОВОЙ СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ ПРИ АССОЦИИРОВАННОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ // Медицина в Кузбассе. 2021. №4. С. 11-19.

Сахаров С.П., Молокова О.А., Фролова О.И.

Тюменский государственный медицинский университет, г. Тюмень, Россия

ВИДОВОЙ СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ ПРИ АССОЦИИРОВАННОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Предмет исследования. В последние годы отмечено увеличение частоты инфекционных заболеваний, вызванных ассоциациями бактерий. Изменение видового состава микроорганизмов в ассоциациях требует изучения механизмов взаимодействия патогенов, выявления роли ассоциированной микрофлоры в течении инфекционного процесса.

Цель исследования – изучить патоморфологию органов животных, инфицированных *P. aeruginosa* и *S. aureus* в культивируемой и некультивируемой формах; определить микробный пейзаж крови и внутренних органов; выявить биохимические особенности микроорганизмов.

Методы исследования. Эксперимент выполнен на 58 кроликах, разделенных на 3 группы. Животных заражали культивируемыми и некультивируемыми формами бактерий *P. aeruginosa* и *S. aureus*, выделенных от пациентов, лечившихся в ожоговом отделении Областной клинической больницы № 1 г. Тюмени. Проводили видовую идентификацию бактерий у погибших животных в крови, печени, легких и почках с изучением их биохимических свойств.

Основные результаты. Выявлено, что смерть животных на 8-9-е сутки развилась за счет ДАП легких и дисциркуляторно-деструктивных изменений в паренхиматозных органах. На 11-12-е сутки отмечен второй пик летальности, обусловленный прогрессирующим системным воспалением. Во II группе на 2-5-е сутки молниеносное течение заболевания привело к массовой гибели животных за счет включения *E. coli* в состав ассоциации. Второй пик летальности на 8-е сутки заболевания обусловлен системным воспалением и прогрессирующей полиорганной недостаточностью.

Выводы. При заражении животных ассоциацией *P. aeruginosa* и *S. aureus* в некультивируемом состоянии происходит их реверсия в некультивируемое состояние. Печень является резервуаром инфекционного начала при генерализованном инфекционном процессе. Транслоцировавшаяся *E. coli* приобрела атипичные свойства, усиливающие ее вирулентность. В культивируемой форме транслоцировавшаяся *E. coli* может существовать в виде монокультуры или в составе ассоциации с *P. aeruginosa* и *S. aureus*, способствуя более тяжелому течению инфекционного процесса за счет синергетического эффекта.

Ключевые слова: эксперимент; ассоциации микроорганизмов; транслокация; культивируемые и некультивируемые формы бактерий.

Sakharov S.P., Molokova O.A., Frolova O.I.

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russia

SPECIES COMPOSITION OF ANIMALS INTERNAL ORGANS MICROFLORA IN ASSOCIATED EXPERIMENTAL INFECTION

Objective. In recent years, an increase in the incidence of infectious diseases caused by bacterial associations has been noted. The change in the species composition of microorganisms in associations requires studying the mechanisms of interaction of pathogens, identifying the role of associated microflora during the infectious process.

The purpose of the research is to study the pathomorphology of the animals organs infected with *P. aeruginosa* and *S. aureus* in cultivated and non-cultivated forms; determine the microbial landscape of blood and internal organs; identify the biochemical characteristics of microorganisms.

Methods. The experiment was carried out on 58 rabbits, divided into 3 groups. The animals were infected with cultivated and non-cultivated forms of *P. aeruginosa* and *S. aureus* bacteria isolated from patients treated in the burn department of the Regional Clinical Hospital N 1 in Tyumen. Species identification of bacteria in dead animals in blood, liver, lungs and kidneys was carried out with a study of their biochemical properties.

Results. It was revealed that the death of animals on the 8-9th day developed due to DAP of the lungs and discirculatory – destructive changes in the parenchymal organs. On the 11-12th day, the second peak of mortality was noted, due to the progression of systemic inflammation. In group II, on the 2-5th day, the fulminant course of the disease led to massive death of animals due to the inclusion of *E. coli* in the association. The second peak of mortality on the 8th day of the disease is due to systemic inflammation and progressive multiple organ failure.

Conclusions. When animals are infected with the association of *P. aeruginosa* and *S. aureus* in an uncultivated state, they are reversed to an uncultivated state. The liver is a reservoir of infectious origin in a generalized infectious process. The translocated *E. coli* acquired atypical properties that enhance its virulence. In a cultivated form, translocated *E. coli* can exist as a monoculture or in association with *P. aeruginosa* and *S. aureus*, contributing to a more severe course of the infectious process due to a synergistic effect.

Key words: experiment; associations of microorganisms; translocation; cultivated and non-cultivated forms of bacteria.

Бактериальные инфекции являются основной причиной заболеваемости и смертности. В последние годы увеличивается частота инфекций, вызванных ассоциированной патогенной микрофлорой и связанных с госпитальным заражением пациентов [1-3]. В составе микробных ассоциаций усилилась роль патогенов в некультивируемом состоянии. При реанимации некультивируемых форм они не теряют свойства, присущие этим бактериям в культивируемом состоянии [4-9]. На сегодняшний день известно 67 видов патогенных бактерий, способных переходить в некультивируемое состояние [10]. Взаимоотношения микроорганизмов в ассоциациях определяются как взаимным влиянием друг на друга, так и состоянием макроорганизма [11]. В макроорганизме одновременно существует множество микросимбиозов, состоящих из ассоциаций нормальной и условно-патогенной микрофлоры, играющих важную роль в функционировании организма и защите от чужеродной патогенной микрофлоры [12]. При развитии инфекционного процесса возможно формирование новых ассоциаций, с включением в них наряду с патогенными микроорганизмами и эндогенной микрофлоры.

Цель исследования – изучить патоморфологию органов животных, инфицированных *P. aeruginosa* и *S. aureus* в культивируемой и некультивируемой формах; определить микробный пейзаж крови и внутренних органов; выявить биохимические особенности микроорганизмов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная работа проведена в соответствии с методическими указаниями по содержанию и использованию лабораторных животных (Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. – Washington DC, 1996) и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, а также Правилами, утвержденными Приказом Минздрава России № 199н от 01 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Получено разрешение Этического комитета ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ (Протокол № 83, от 02.03.2019 г.).

Кролики содержались по одному в металлических клетках стандартного размера, оборудованных поилками, кормушками, в условиях вивария при температуре 17-23°C и относительной влажности 30-70 %. Для выявления преморбидного фона до проведения опыта кролики находились 21 день в карантине. Инфицированных кроликов отбраковывали. Внешний вид животных, термометрию, взвешивание проводили ежедневно в период карантина и во время проведения эксперимента.

Кролики выбраны в качестве экспериментальной модели в связи с чувствительностью к бактериям *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Эксперимент выполнен на

58 кроликах породы «Советская шиншилла», разделенных на 3 группы:

I группа – 26 животных, инфицированных культивируемыми формами бактерий, средняя масса тела составила $2365,0 \pm 37,5$ граммов. В зависимости от сроков летальности выявлены два пика массовой гибели животных: первый пик летальности (IA подгруппа) – на 8-9-е сутки погибли 18 кроликов, что составило 69,2 %, второй пик летальности (IB подгруппа) – на 12-е сутки умерли 4 животных (18,2 %).

II группа – 26 животных, инфицированных некультивируемыми формами бактерий, средняя масса тела кроликов была $2377,0 \pm 18,0$ граммов. В зависимости от сроков летальности выявлены два пика массовой гибели животных: первый пик летальности (IIA подгруппа) – на 2-5-е сутки погибли 18 кроликов (75%), второй пик летальности (IIB подгруппа) – на 8-е сутки умерли 6 животных (25 %).

III группа – 6 здоровых интактных животных, у которых не проводили эксперименты (контрольная группа – основная), средняя масса тела составила $2565,0 \pm 27,5$ граммов.

Заражение кроликов проводили взвесью культивируемых и некультивируемых форм бактерий *P. aeruginosa* и *S. aureus*, выделенных от больных, находящихся на лечении в ожоговом отделении ГБУЗ ТО «Областной клинической больницы № 1» г. Тюмени, полученных по методике Л.Б. Козлова с соавт. (патент № 2470074 от 20.12.2012 г.) [13]. Взвесь бактерий в концентрации 10^5 - 10^6 микробных клеток в 1 мл физиологического раствора хлорида натрия вводили подкожно в бедро животному.

Идентифицированные бактерии, выделенные от больных людей или от погибших экспериментальных животных, накапливали на мясопептонном агаре (МПА). Культивировали бактерии при температуре 37°C в течение 24 часов. Для определения количества бактерий, накопленных на МПА, готовили серийные разведения из взвеси бактерий, а затем из каждого разведения проводили посев бактерий на чашки Петри с желточно-солевым агаром (для стафилококка) или 5 % кровяным агаром (для синегнойной палочки), и через 24 часа определяли концентрацию микробной взвеси в приготовленных разведениях (контрольное исследование концентрации бактерий в серийных разведениях).

Из культуры бактерий, накопленных на скошенном МПА, по стандарту мутности в 5 единиц, соответствующей 500000 мк в 1 мл, получали взвесь бактерий. Затем готовили серийные разведения до 10^9 . До разведения 10^6 степени наблюдался рост колоний на плотной питательной среде (культивируемые бактерии), а в разведениях 10^7 - 10^9 рост бактерий не наблюдался. В этих разведениях должны содержаться некультивируемые бактерии. Для перевода их в культивируемое состояние разведения 10^7 - 10^9 выдерживали при температуре +4°C в течение 48 часов (при низкой температуре некультивируемые бактерии переходили в культивируемое состояние). Затем из разведений 10^7 - 10^9 степени про-

водили посев микробной взвеси на элективную питательную среду и через 24 часа при 37°C происходило размножение некультивируемых бактерий, перешедших в культивируемое состояние. Для выделения некультивируемых бактерий использовали хладотермостат [14]. Исследования выполнены в ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (Договор № 12/16-м от 01.03.2016 г.).

Идентификацию бактерий, выделенных от погибших экспериментальных животных во внутренних органах (печени, легких, почках), проводили, используя классификацию микроорганизмов по Берджи [15].

Для выявления свойств выделенных культивируемых и некультивируемых форм бактерий использовали метод моделирования бактериальной инфекции [16] (патент РФ № 2530564 от 10.10.2014 г.), метод выделения некультивируемых бактерий [13] и метод определения микробной обсемененности органов погибших экспериментальных животных.

Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, при микроскопическом исследовании изучали выраженность воспалительных, дистрофических и некротических процессов во внутренних

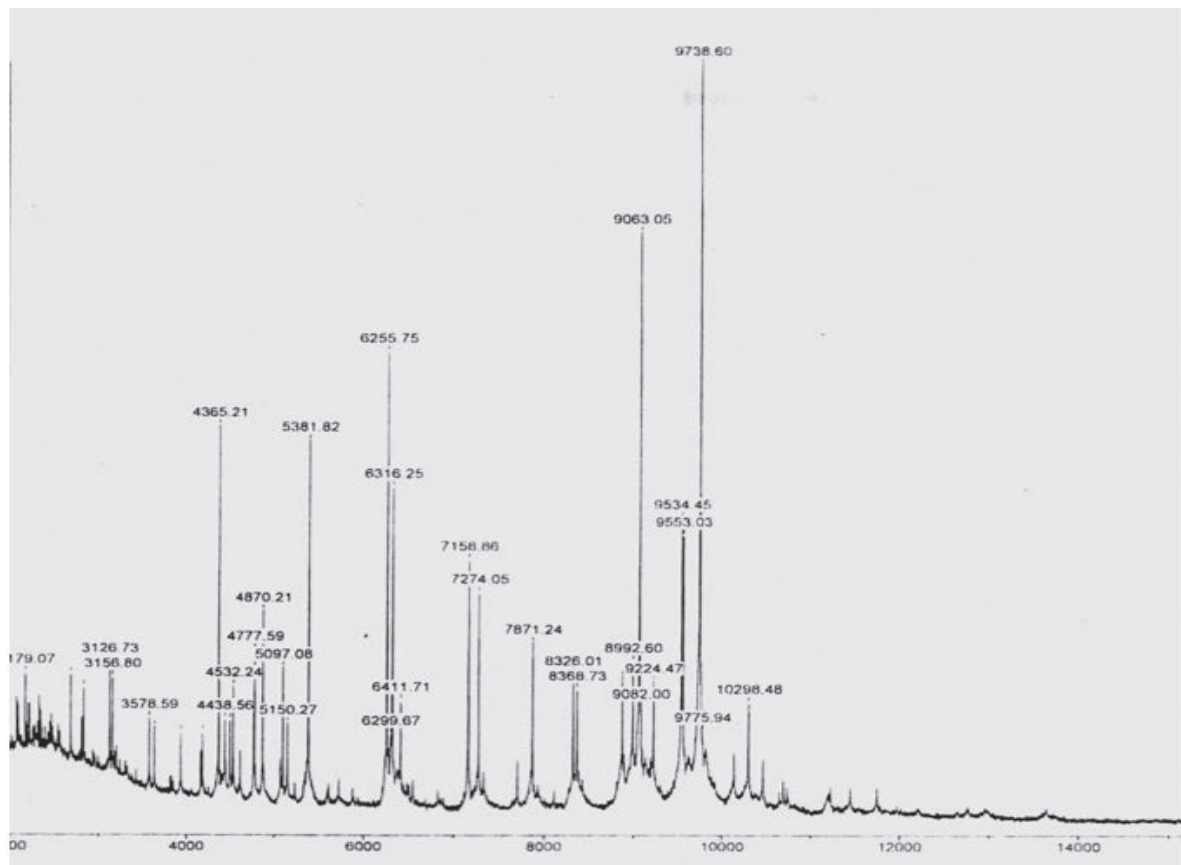
органах животных. Исследование выполнялось с применением светового микроскопа «Axio Lab.A1» (Carl Zeiss) и гистосканера «MIRAX MIDI» (Carl Zeiss). Микрофотосъемка была выполнена с использованием сканера PANNORAMIC от 3DHISTECH и программного приложения CaseViewer для просмотра цифровых слайдов. Статистическая обработка выполнена в программном пакете IBM SPSS 16.0 с вычислением средней арифметической ошибки $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В области введения инфекционного агента в бедро кролика воспалительные изменения не выявлены, что свидетельствует об отсутствии способности организма животных к локализации микробного начала.

При бактериологическом исследовании крови, с помощью определения масс-спектрометрией протеинограммы у кроликов на 11-12-е сутки (ИБ подгруппа) от начала эксперимента, наблюдали ассоциацию условно-патогенной микрофлоры кишечника: *E. coli*, *Aeromonas media* и *Aeromonas veronii* (рис. 1).

Рисунок 1
Протеинограмма *E. coli*, выделенной масс-спектрометрией из крови кроликов ИБ подгруппы
Figure 1
Proteinogram of *E. coli* isolated by mass spectrometry from the blood of rabbits of subgroup IB



У кроликов ИБ подгруппы, при бактериологическом исследовании крови на 8-е сутки болезни методом масс-спектрометрии идентифицировали ассоциацию *Pseudomonas chloraphis*, *Acinetobacter xylosoxidans* и *E. coli* (рис. 2).

При изучении микробного пейзажа легочной ткани, как видно из таблицы 1, у IA подгруппы в первый пик летальности на 8-9-е сутки высевается только *P. aeruginosa* в культивируемом состоянии. На 12-е сутки, во 2-й пик летальности, в IB подгруппе выявляется только *E. coli*. Во II экспериментальной группе, в обеих подгруппах в оба пика летальности высевается ассоциация *P. aeruginosa* и *S. aureus* в культивируемом состоянии, *E. coli* не выявляется.

Обращает внимание, что при изучении видового состава возбудителей в печени кроликов I группы произошли изменения, которые представлены в таблице 2. В IA подгруппе на 8-е сутки появилась новая микробная ассоциация, состоящая из трех ассо-

циантов: *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli*, находящихся в культивируемой форме. В IB подгруппе на 12-е сутки эксперимента в составе ассоциации *P. aeruginosa* не выявляется. Во II группе в оба пика летальности определяли в составе микробной ассоциации трех возбудителей, которые высевались в культивируемом состоянии.

Как показали наши исследования, представленные в таблице 3, у экспериментальных животных IA подгруппы в ткани почек сохраняется первоначально введенная ассоциация культивируемых форм бактерий *P. aeruginosa* и *S. aureus*. В IB подгруппе на 12-е сутки, как и в легких, выявляется только *E. coli*. Во IIА подгруппе в первый пик летальности (на 2-5-е сутки) выявлена новая микробная ассоциация, в состав которой вошла *E. coli* в культивируемом состоянии. На 8-е сутки во второй пик летальности в составе этой ассоциации произошли изменения, а именно *P. aeruginosa* не выделялась.

Рисунок 2
Протеинограмма E. coli, выделенной масс-спектрометрией из крови кроликов ИБ подгруппы
Figure 2
Proteinogram of E. coli isolated by mass spectrometry from the blood of rabbits of IIB subgroup

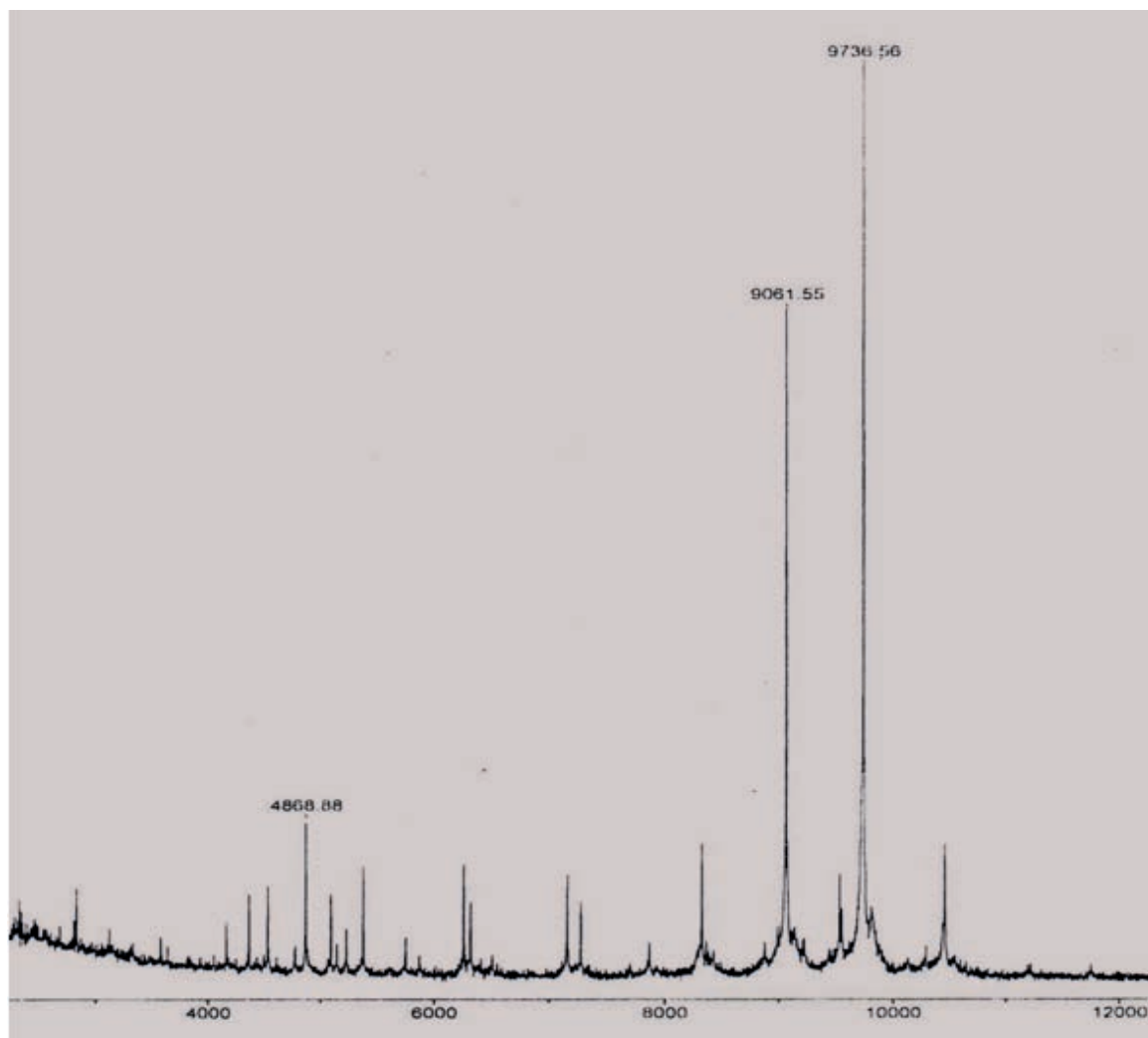


Таблица 1
 Результаты выделения микрофлоры в легочной ткани у погибших кроликов (КОЕ/мл), (M ± m)
 Table 1
 The results of the isolation of microflora in the lung tissue in dead rabbits (CFU/ml), (M ± m)

Подгруппы экспериментальных животных/количество погибших животных	Количество микроорганизмов в легочной ткани		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
IA (n = 18)	$3,0 \pm 0,9 \times 10^3 - 1,9 \pm 1,0 \times 10^4$	0	0
IB (n = 4)	0	$0,9 \pm 0,1 \times 10^2$	0
IIA (n = 18)	$3,6 \pm 1,1 \times 10^2$	0	$1,4 \pm 0,7 \times 10^3$
IIB (n = 6)	$3,6 \pm 1,1 \times 10^2$	0	$1,4 \pm 0,7 \times 10^3$

Примечание: в таблице даны средние показатели концентрации бактерий *P. aeruginosa*, *E. coli* и *S. aureus* по результатам четырех исследований, 0 – не выделено бактерий.

Note: the table shows the average concentration of *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus* bacteria based on the results of four studies, 0 – no bacteria were isolated.

Таблица 2
 Результаты выделения микрофлоры в ткани печени у погибших кроликов (КОЕ/мл), (M ± m)
 Table 2
 Results of isolation of microflora in liver tissue in dead rabbits (CFU/ml), (M ± m)

Подгруппы экспериментальных животных/количество погибших животных	Количество микроорганизмов в ткани печени		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
IA (n = 18)	$6,9 \pm 0,6 \times 10^4 - 7,6 \pm 1,7 \times 10^2$	$1,1 \pm 0,1 \times 10^3 - 1,0 \pm 0,3 \times 10^3$	$11,1 \pm 1,5 \times 10^4 - 4,4 \pm 1,5 \times 10^3$
IB (n = 4)	0	$1,8 \pm 0,1 \times 10^2$	$1,2 \pm 0,5 \times 10^2$
IIA (n = 18)	$9,7 \pm 4,8 \times 10^2 - 6,6 \pm 2,4 \times 10^3$	$0,8 \pm 0,3 \times 10^3 - 2,0 \pm 0,9 \times 10^3$	$4,0 \pm 1,7 \times 10^2 - 4,6 \pm 2,3 \times 10^2$
IIB (n = 6)	$6,6 \pm 2,4 \times 10^3$	$2,0 \pm 0,9 \times 10^3$	$4,6 \pm 2,3 \times 10^2$

Примечание: в таблице даны средние показатели концентрации бактерий *P. aeruginosa*, *E. coli* и *S. aureus* по результатам четырех исследований, 0 – не выделено бактерий.

Note: the table shows the average concentration of *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus* bacteria based on the results of four studies, 0 – no bacteria were isolated.

Таблица 3
 Результаты выделения микрофлоры в ткани почек у погибших кроликов (КОЕ/мл), (M ± m)
 Table 3
 Results of microflora isolation in kidney tissue in dead rabbits (CFU/ml), (M ± m)

Подгруппы экспериментальных животных/количество погибших животных	Количество микроорганизмов в ткани почек		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
IA (n = 18)	$4,6 \pm 0,4 \times 10^4 - 3,2 \pm 0,3 \times 10^3$	0	$3,7 \pm 0,6 \times 10^4 - 1,9 \pm 0,6 \times 10^4$
IB (n = 4)	0	$3,0 \pm 0,1 \times 10^2$	0
IIA (n = 18)	$2,7 \pm 1,0 \times 10^2 - 1,4 \pm 0,4 \times 10^2$	$0,8 \pm 0,2 \times 10^3 - 8,4 \pm 2,7 \times 10^2$	$6,3 \pm 2,2 \times 10^2 - 6,5 \pm 1,5 \times 10^2$
IIB (n = 6)	0	$1,3 \pm 0,6 \times 10^3$	$1,1 \pm 0,3 \times 10^3$

Примечание: в таблице даны средние показатели концентрации бактерий *P. aeruginosa*, *E. coli* и *S. aureus* по результатам четырех исследований, 0 – не выделено бактерий.

Note: the table shows the average concentration of *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus* bacteria based on the results of four studies, 0 – no bacteria were isolated.

При изучении биохимических свойств *S. aureus*, высеянных из внутренних органов экспериментальных животных, было выявлено их отличие по сравнению с используемыми для заражения. У животных II экспериментальной группы, которые были инфицированы ассоциацией некультивируемыми формами, стафилококки потеряли способность к расщеплению маннита в аэробных условиях. Другие

биохимические свойства (наличие пигмента, гемолиз эритроцитов, наличие коагулазы, лецитиназы) не изменились.

В отличие от типичной культуры, транслоцировавшаяся *E. coli* обладала большей биохимической активностью: ферментировала цитрат Симонса; приобрела способность расщеплять лактозу, инозит, арабинозу; обладала большей подвижностью; обладала

интенсивным газообразованием на среде Ресселя; потеряла способность расщеплять индол и ацетат.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что бактерии в организме человека способны формировать стойкие ассоциации с другими микроорганизмами в тканях, органах, на слизистых оболочках [11]. У экспериментальных животных выявлена транслокация в кровь из кишечника ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов *Pseudomonas chloraphis*, и *Acinetobacter xylosoxidans*; *Aeromonas media* и *Aeromonas veronii* и *E. coli*. Транслокация бактерий и эндотоксинов из просвета кишечника в системный кровоток способствует развитию смертельных осложнений по типу острого панкреатита, перитонита, сепсиса [17, 18]. Основной причиной бактериальной транслокации являются: повышение проницаемости монослоя клеток кишечного эпителия за счет снижения плотности межклеточных контактов, гибель клеток слизистой оболочки, полнокровие подслизистого слоя за счет повреждения бактериальными токсинами, провоспалительными цитокинами [19-21]. В наших исследованиях выявлено, что ведущая роль среди транслоцировавшихся в кровь энтеробактерий принадлежит *E. coli*. Существуют два пути попадания кишечной палочки во внутренние органы. Первый путь – из просвета кишечника через систему воротной вены с венозной кровью в печень [22]. Вторым путем – лимфогенным, когда первым органом на пути транслоцируемых продуктов из кишечника становятся легкие [23]. Кишечные бактерии или эндотоксины могут индуцировать или усиливать развитие системного воспалительного каскада [24].

У экспериментальных животных I группы на 8-9-е сутки происходит транслокация *E. coli* только в печень с формированием микробной ассоциации, состоящей из трех ассоциантов – *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli*. Включение *E. coli* в состав первоначальной ассоциации патогенных микроорганизмов и формирование новой микробной ассоциации, состоящей из патогенной и условно-патогенной микрофлоры, свидетельствует о нарушении микробиоты хозяина, вызывая нарушение ассоциативного симбиоза как многокомпонентной интегральной системы, включающей хозяина (макропартнера), доминантные (нормофлора) и ассоциативные (условно-патогенные и патогенные) микроорганизмы [11]. За счет синергетического влияния может повышаться вирулентность взаимодействующих микроорганизмов [18], этим можно объяснить усиление вирулентности *E. coli*, вошедшей в состав ассоциации высокопатогенных бактерий. В составе первоначальной микробной ассоциации на 8-9-е сутки в легких у кроликов *S. aureus* не выявляется, что обусловлено антагонистическим влиянием монокультуры *P. aeruginosa*. В почках сохраняется первоначальная ассоциация патогенных бактерий. Ведущее значение в развитии летального исхода у большинства кроликов этой группы обусловлено экссудативной

фазой ДАП легких и дисциркуляторно-деструктивными изменениями в паренхиматозных органах за счет синергетического эффекта *P. aeruginosa* и *E. coli*.

На 12-е сутки заболевания выявляется диссеминация *E. coli* в печень, почки и легкие. Особенностью микробного пейзажа изучаемых органов является отсутствие *P. aeruginosa* в бактериологических посевах печени. В печени животных выявляется ассоциация из двух микроорганизмов: *S. aureus* и *E. coli*. Обращает внимание, что в легких и почках *E. coli* присутствует в виде монокультуры и доминирует по отношению к другим микроорганизмам. Смерть животных этой экспериментальной группы вызвана развитием системного воспаления с прогрессированием ДАП легких и печеночно-почечной недостаточности за счет усиления вирулентности *E. coli*.

У экспериментальных животных II группы уже на 2-5-е сутки выявлена реверсия *P. aeruginosa* и *S. aureus* из некультивируемого состояния в культивируемую форму. Механизмы повреждающего действия бактерий в культивируемом и некультивируемом состоянии практически одинаковы [9]. Первоначальная микробная ассоциация патогенных микроорганизмов выявлялась только в легких. В этот же срок отмечена транслокация *E. coli* из верхних отделов кишечника в печень и почки с включением ее в состав микробной ассоциации с *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Возникновение новой микробной ассоциации, представленной сочетанием экзогенной и эндогенной микрофлоры, обусловило молниеносное течение заболевания и вызвало смерть большинства животных на 2-5-е сутки за счет токсического шока с развитием тяжелого ДАП легких, что соответствовало первому пику летальности.

На 8-е сутки заболевания, что соответствовало второму пику летальности, видовой состав возбудителей в виде первоначальной ассоциации остается в легких, *E. coli* не высевается. В печени присутствуют 3 ассоцианта, в почках отсутствует *P. aeruginosa*, в составе ассоциации выявляется *S. aureus* и *E. coli*. Смерть животных обусловлена развитием системного воспаления с прогрессированием ДАП легких и печеночно-почечной недостаточности за счет включения в состав ассоциации *E. coli* и усиления синергетического действия ассоциантов.

Особая роль, на наш взгляд, в развитии экспериментального инфекционного процесса, вызванного ассоциацией *P. aeruginosa* и *S. aureus* в культивируемом и некультивируемом состоянии, отводится печени, в которой формируется и персистирует сложная ассоциация микроорганизмов, представленная экзогенной и эндогенной микрофлорой. Этот феномен может свидетельствовать о том, что печень служит резервуаром инфекционного агента, обуславливающего аутоиммунный механизм развития патологического процесса.

Учитывая, что биохимические свойства *P. aeruginosa* и *S. aureus*, определяющие их вирулентность, в культивируемом и некультивируемом

состоянии мало отличаются, заслуживает внимания появление атипичных биохимических свойств у *E. coli*. Приобретение *E. coli* новых свойств является проявлением адаптации к меняющимся условиям среды обитания за счет фенотипической пластичности, как наиболее эффективной формы выживания микроорганизмов [3], что способствует усилению вирулентности и вызывает переход из условно-патогенного в патогенное состояние. Усиление вирулентности позволяет объяснить роль кишечной палочки в виде монокультуры, как причины развития выраженного системного воспаления на 12-е сутки эксперимента у животных IB группы. Наличие *E. coli* в составе ассоциации с *P. aeruginosa* и *S. aureus* у животных II экспериментальной группы способствует стремительному прогрессированию заболевания, обуславливая высокую летальность в ранние сроки эксперимента за счет синергетического усиления патогенности бактерий [11, 25].

ВЫВОДЫ

В организме экспериментальных животных, зараженных ассоциацией *P. aeruginosa* и *S. aureus* в некультивируемом состоянии, происходит их ревер-

сия в культивируемое состояние. Изменение состава микробных ассоциаций, проявляющееся отсутствием первоначального микробного агента при культивируемом бактериологическом исследовании внутренних органов экспериментальных животных, зараженных ассоциацией культивируемых или некультивируемых форм этих бактерий, может свидетельствовать об их переходе в некультивируемое состояние и требует применения дополнительного метода определения с помощью активации низкой температурой [16]. Печень является резервуаром инфекционного начала при генерализованном инфекционном процессе, обуславливая аутоиммунный механизм развития патологического процесса. Феномен транслокации *E. coli* из верхних отделов кишечника во внутренние органы сопровождается появлением у нее атипичных свойств, способствующих переходу из условно-патогенного состояния в патогенное. В культивируемой форме транслоцировавшаяся *E. coli* может существовать в виде монокультуры, проявляя антагонистические свойства по отношению к *P. aeruginosa* и *S. aureus* или образовывать с ними новую микробную ассоциацию, способствуя более тяжелому течению инфекционного процесса за счет синергетического эффекта.

Информация о финансировании и конфликте интересов

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES:

1. Shatalova EV, Belsky VV, Shekhovtsova OV. Dynamics of the structure of populations of pathogens of mixed infection of burn injury under conditions of immunodeficiency and after the use of immunomodulators (experimental study). *Kursk scientific and practical bulletin «Humans and their health»*. 2009; (3): 14-17. Russian (Шаталова Е.В., Бельский В.В., Шеховцова О.В. Динамика структуры популяций возбудителей смешанной инфекции ожоговой травмы в условиях иммунодефицита и после применения иммуномодуляторов (экспериментальное исследование) //Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2009. № 3. С. 14-17.)
2. Litvin VYu, Gintsburg AL, Pushkareva VI, Romanova YuM, Boev BV. Epidemiological aspects of the ecology of bacteria. М.: Farmus-print, 1998. 229 p. Russian (Литвин В.Ю., Гинцбург А.Л., Пушкарева В.И., Романова Ю.М., Боев Б.В. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. М.: Фармус-принт, 1998. 229 с.)
3. Andryukov BG, Somova LM, Matosova EV, Lyapun IN. Phenotypic plasticity as a strategy of bacterial resistance and an object of advanced antimicrobial technologies (review). *Modern Technologies in Medicine*. 2019; 11(2): 164-182. Russian (Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Матосова Е.В., Ляпун И.Н. Фенотипическая пластичность бактерий как стратегия резистентности и объект современных антимикробных технологий (обзор) //Современные технологии в медицине. 2019. Т. 11, № 2. С. 164-182.)
4. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*. 2010; 34(4): 415-425. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.
5. Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in public health*. 2014; 2: 103.
6. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*. 2014; 5: 258.
7. Bamford RA, Smith A, Metz J, Glover G, Titball RW, Pagliara S. Investigating the physiology of viable but non-culturable bacteria by microfluidics and time-lapse microscopy. *BMC biology*. 2017; 15(1): 1-12.
8. Dong K, Pan H, Yang D, Rao L, Zhao L, Wang Y, et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020; 19(1): 149-183.
9. Hamabata T, Senoh M, Iwaki M, Nishiyama A, Yamamoto A, Shibayama K. Induction and Resuscitation of Viable but Nonculturable *Corynebacterium diphtheria*. *Microorganisms*. 2021; 9(5): 927.
10. Zhao X, Zhong J, Wei C, Lin C-W, Ding T. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. *Front Microbiol*. 2017; 8: 580.

11. Bukharin OV. Symbiotic interactions of microorganisms during infection. *Zh. Microbiol.* 2013; (1): 93-97. Russian (Бухарин О.В. Симбиотические взаимоотношения микроорганизмов при инфекции // Журнал микробиологии. 2013. № 1. С. 93-97.)
12. Bukharin OV. Infectious symbiology. *Zh. Microbiol.* 2015; (4): 4-9. Russian (Бухарин О.В. Инфекционная симбиология // Микробиология. 2015. № 4. С. 4-9.)
13. Patent N 2470074 of the Russian Federation IPC C12Q 1/04 Method of isolating uncultivated staphylococcus bacteria / Kozlov LB, Dits EV, Efimov VV, Sannikov AG, Butkov II, Kozlov AL; applicant and patentee Kozlov LB, Sannikov AG – N 2011146052/10; declared 11/14/2011; publ. 20.12.2012, Bul. N 35. Russian (Патент № 2470074 Российской Федерации МПК C12Q 1/04 Способ выделения некультивируемых бактерий стафилококка / Козлов Л.Б., Диц Е.В., Ефимов В.В., Санников А.Г., Бутков И.И., Козлов А.Л.; заявитель и патентообладатель Козлов Л.Б., Санников А.Г. – № 2011146052/10; заявл. 14.11.2011; опублик. 20.12.2012, Бюл. № 35.)
14. Patent N 125888 of the Russian Federation IPC B01L 7/00 (2006.01) U1 Refrigeration thermostat for the isolation of uncultivated /Kozlov LB, Efimov VV, Dits EV, Sannikov AG, Butkov II, Kozlov AL; applicant and patentee of LLC Scientific and Production Innovative Enterprise «Tyumen Institute of Microbiological Technologies» (NPIP «ТИМТ»). – Application N 2012104891/05 dated 13.02.2012; publ. 03/20/2013, Bul. N 8. Russian (Патент № 125888 Рос. Федерации Хладотермостат для выделения некультивируемых бактерий /Козлов Л.Б., Ефимов В.В., Диц Е.В., Санников А.Г., Бутков И.И., Козлов А.Л.; заявитель и патентообладатель ООО Научно-производственное инновационное предприятие «Тюменский институт микробиологических технологий» (НПИП «ТИМТ»). – Заявка № 2012104891/05 от 13.02.2012; опублик. 20.03.2013, Бюл. № 8).
15. Howlt J, Krieg N, Snit P, Staley J, Williams S. Bergey's Keys to Bacteria. In 2 volumes, trans from English. M.: Mir, 1997. T. 1. 432 p. Russian (Хоулт Д.Ж., Криг Н., Снит П., Стейли Д.Ж., Уильямс С. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т., пер. с англ. /под ред. М.: Мир, 1997. Т. 1. 432 с).
16. Patent N 2530564 of the Russian Federation IPC G09B 23/28A method for modeling a bacterial infection against the background of a burn injury /Kozlov LB, Sakharov SP, Dits EV, Efimov VV, Vanbender EL, Sakharova SV. – N 2013121731/14; declared 05/13/2013; publ. 10.10.2014, Bul. N 28. Russian (Патент № 2530564 РФ. МПК G09B 23/28. Способ моделирования бактериальной инфекции на фоне ожоговой травмы /Козлов Л.Б., Сахаров С.П., Диц Е.В., Ефимов В.В., Ванбендер Е.Л., Сахарова С.В. – № 2013121731/14; заявлено 13.05.2013; опублик. 10.10.2014, Бюл. № 28).
17. Bondarenko VM, Ryabichenko EV. The role of translocation of intestinal bacterial autoflora and its toxic biomolecules in human pathology. *Experimental & Clinical Gastroenterology.* 2007; (5): 86-93. Russian (Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Роль транслокации кишечной бактериальной аутофлоры и ее токсических биомолекул в патологии человека // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2007. № 5. С. 86-93.)
18. Bondarenko VM. Mechanisms of translocation of bacterial autoflora in the development of endogenous infection. *Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the RAS (electronic journal).* 2013; (3): 1-21. Russian (Бондаренко В.М. Механизмы транслокации бактериальной аутофлоры в развитии эндогенной инфекции // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). 2013. № 3. С. 1-21.)
19. Zareie M, Riff J, Donato K. Novel effects of the prototype translocating *Escherichia coli*, strain C25 on intestinal epithelial structure and barrier function. *Cell Microbiol.* 2005; 7(12): 1782-1797.
20. Sakharov SP, Kozlov LB. Specific features of development of the infectious process caused by cultivable and non-cultivable bacteria in the presence of experimental burn injury. *General Reanimatology.* 2015; 11(5): 15-24. Russian (Сахаров С.П., Козлов Л.Б. Особенности развития инфекционного процесса, вызванного культивируемыми и некультивируемыми бактериями на фоне ожоговой травмы в эксперименте // Общая реаниматология, 2015. Т. 11, № 5. С. 15-24.)
21. Терещенко ЛП, Волошина НП. Мікробіота кишечника і аутоімунні захворювання (Огляд літератури). Український вісник психоневрології. 2020; 28(3): 63-69.
22. Wang L, Llorente C, Hartmann P, Yang AM, Chen P, Schnabl B. Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *J Immunol Methods.* 2015; 421: 44-53.
23. Deitch EA. Gut-origin sepsis: evolution of a concept. *Surgeon.* 2012; 10(6): 350-356.
24. Podoprigora GI, Kafarskaya LI, Bainov NA, Shkoporov AN. Bacterial Translocation from Intestine: Microbiological, Immunological and Pathophysiological Aspects. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2015; 70(6): 640-650. Russian (Подопригора Г.И., Кафарская Л.И., Байнов Н.А., Шкопоров А.Н. Бактериальная транслокация из кишечника: микробиологические, иммунологические и патофизиологические аспекты // ВЕСТНИК РАМН. 2015. Т. 70, № 6. С. 640-650.)
25. Krasnoperova YuYu. Characteristics of changes in the pathogenic potential of microorganisms-symbionts in protozoal-bacterial associations: doct. biol. sci. abstract dis. Orenburg, 2009. 40 p. Russian (Красноперова Ю.Ю. Характеристика изменений патогенного потенциала микроорганизмов-симбионтов в протозойно-бактериальных ассоциациях: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Оренбург, 2009. 40 с.)

Корреспонденцию адресовать: САХАРОВ Сергей Павлович, 625023, г. Тюмень, ул. Одесская, д. 54 ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России.

E-mail: sacharov09@mail.ru

Сведения об авторах:

САХАРОВ Сергей Павлович, канд. мед. наук, доцент, зав. кафедрой мобилизационной подготовки здравоохранения и медицины катастроф, ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России, г. Тюмень, Россия. E-mail: sacharov09@mail.ru

МОЛОКОВА Ольга Александровна, доктор мед. наук, доцент, профессор кафедры патологической анатомии и судебной медицины, ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России, г. Тюмень, Россия.

ФРОЛОВА Ольга Игоревна, доктор мед. наук, профессор, кафедра респираторной медицины с курсом рентгенологии Института непрерывного профессионального развития, ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России, г. Тюмень, Россия.

Information about authors:

SAKHAROV Sergey Pavlovich, candidate of medical sciences, docent, head of the department of mobilization preparation of health care and disaster medicine, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russia. E-mail: sacharov09@mail.ru

MOLOKOVA Olga Aleksandrovna, doctor of medical sciences, docent, professor of the department of pathological anatomy and forensic medicine, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russia.

FROLOVA Olga Igorevna, doctor of medical sciences, professor, department of respiratory medicine with a course of radiology of the Institute of continuous professional development, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russia.