

УДК 616.381-002.3-078-092.9

Фадеева Т.В.<sup>1</sup>, Шурыгина И.А.<sup>1</sup>, Дремина Н.Н.<sup>1</sup>,  
Ветохина А.В.<sup>2</sup>, Чепурных Е.Е.<sup>1</sup>, Шурыгин М.Г.<sup>1</sup>**БАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСЛОКАЦИЯ  
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ**<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Иркутский научный центр хирургии и травматологии»

664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1, Россия

<sup>2</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Иркутская орден  
«Знак почёта» областная клиническая больница»

664079, г. Иркутск, мкр. Юбилейный, 100

**Цель исследования.** Оценить значимость бактериальной транслокации при перитоните в эксперименте.

**Материалы и методы.** Моделирование перитонита проводили с использованием крыс породы Вистар (самцы) (20 животных) двукратным введением в брюшную полость смеси *E. coli* БЛРС и *B. fragilis* (зарегистрирован в Genbank, PRJNA485001), выделенных нами от больных острым аппендицитом, по 0,6 млрд микробных тел/мл в верхний и нижний этаж брюшной полости. Выведение из эксперимента осуществляли на 12 часов, 1, 3 и 7 суток. Проводили гистологическое исследование образцов тонкого кишечника и бактериологические исследования экссудата из брюшной полости (на 3-и, 7-е сутки). Бактериологический метод включал аэробную и анаэробную технику культивирования, выделение, количественное определение, идентификацию аэробных и анаэробных микроорганизмов и определение их чувствительности к антимикробным препаратам с использованием высокоселективных сред, диагностических экспресс-тестов и полуавтоматического микробиологического анализатора «АТВ Expression» (bioMérieux, Франция).

**Результаты.** Установлено, что у всех животных развивался перитонит с прогрессирующим гнойно-деструктивными изменениями в стенке кишки. На 3-и сутки инфицированность экссудата выявлена в 100% наблюдений – *E. coli* БЛРС выделены во всех случаях в концентрациях  $10^5$ – $10^6$  КОЕ/мл, *B. fragilis* – в 20% в концентрации  $10^5$  КОЕ/мл. На 7-е сутки – только *E. coli* БЛРС в концентрациях  $10^3$ – $10^4$  КОЕ/мл. Кроме того, в экссудате выявлены штаммы нормальной микрофлоры просвета кишечника: на 3-и сутки в 60% обнаружен *Enterococcus faecalis* ( $10^4$ – $10^5$  КОЕ/мл), *Lactobacillus ssp.* ( $10^4$  КОЕ/мл). На 7-е сутки в 20% обнаружен *Actinomyces ssp.*

**Заключение.** Нами воспроизведена модель перитонита с применением наиболее ревалентных госпитальных штаммов. Главной причиной бактериальной транслокации при экспериментальном перитоните мы считаем нарушение проницаемости эпителиального кишечного барьера, что подтверждено микробиологическими и морфологическими данными.

**Ключевые слова:** бактериальная транслокация, перитонит, экспериментальные животные, *B. fragilis*, *E. coli*.

Fadееva T.V.<sup>1</sup>, Shurygina I.A.<sup>1</sup>, Dremina N.N.<sup>1</sup>, Vetokhina A.V.<sup>2</sup>, Chepurnykh E.E.<sup>1</sup>, Shurygin M.G.<sup>1</sup>**BACTERIAL TRANSLOCATION IN EXPERIMENTAL PERITONITIS**<sup>1</sup> Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, ul. Bortsov Revolyutsii 1,  
Irkutsk 664003, Russian Federation<sup>2</sup> Irkutsk Regional Clinical Hospital, Yubileyniy 100, Irkutsk 664079, Russian Federation

**The aim of the research.** To evaluate the significance of bacterial translocation in peritonitis in the experiment.

**Materials and methods.** Simulation of peritonitis was performed using Wistar rats (males) (20 animals) by double injection into the abdominal cavity of a mixture of *E. coli* ESBL (extended-spectrum beta-lactamase) and *B. fragilis* (registered in Genbank, PRJNA485001), we isolated from patients with acute appendicitis. The injections were made into upper and lower floors of the abdominal cavity – 0.6 billion microbial bodies/ml in each. The animals were sacrificed in 12 hours, 1, 3 and 7 days. On the 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> days we conducted histological examination of samples of the small intestine and bacteriological examination of exudate from the abdominal cavity. The bacteriological method included aerobic and anaerobic cultivation

techniques, isolation, quantification, identification of aerobic and anaerobic microorganisms and determination of their sensitivity to antimicrobial drugs using high-selective media, rapid diagnostic tests and the semi-automatic microbiological analyzer ATB Expression (bioMérieux, France).

**Results.** It has been established that all animals developed peritonitis with the progression of purulent-destructive changes in the intestinal wall. On the 3<sup>rd</sup> day, exudate infection was detected in 100% of cases – *E. coli* ESBL were isolated in all cases at concentrations of  $10^5$ – $10^6$  CFU/ml, *B. fragilis* – in 20% at concentration of  $10^5$  CFU/ml. On the 7<sup>th</sup> day, only *E. coli* ESBL was found in concentrations of  $10^3$ – $10^4$  CFU/ml. In addition, the exudate revealed strains of the normal microflora of the intestinal lumen: on the 3<sup>rd</sup> day, in 60% of cases we found *Enterococcus faecalis* ( $10^4$ – $10^5$  CFU/ml), *Lactobacillus* spp. ( $10^4$  CFU/ml). On the 7<sup>th</sup> day *Actinomyces* spp. was detected in 20%.

**Conclusion.** We reproduced the model of peritonitis with the use of the most critical hospital strains. We believe that the main cause of bacterial translocation in experimental peritonitis is a violation of the permeability of the epithelial intestinal barrier, as confirmed by microbiological and morphological data.

**Keywords:** bacterial translocation, peritonitis, experimental animals, *B. fragilis*, *E. coli*

Одной из наиболее сложных и актуальных проблем современной абдоминальной хирургии является перитонит. Летальность при этой тяжёлой хирургической патологии не имеет тенденции к её снижению и составляет от 6 до 60% [1, 2, 3], что определяет в значительной степени интерес к данной проблеме.

В свете современных представлений значение бактериального фактора в этиологии перитонита не вызывает сомнений. При этом вид возбудителя, его вирулентность во многом определяют особенности патогенеза, клиническую картину и исход заболевания [4, 5].

Обоснованно считается, что при висцеральных гнойных процессах основным источником инфекции является аутоинфекция из пищеварительного тракта [6, 7].

Показано, что в условиях нарушения нормальной периодической деятельности кишечника у больных распространённым гнойным перитонитом происходит эскалация микрофлоры из дистальных его отделов, что приводит к расширению её видового и количественного состава в тонкой кишке, являющейся во многих случаях источником перитонита. Нарушение барьерной функции слизистой кишечной стенки, способствующее трансэпителиальной миграции бактерий, может быть первичным или вторичным механизмом инициации и распространения системного воспалительного ответа, который обуславливает продолжение септического синдрома и развитие полиорганной недостаточности [8, 9].

В связи с этим продолжение исследований по этой проблеме по-прежнему является актуальным и диктует проведение адекватных экспериментальных исследований по изучению микробиологических механизмов формирования и развития бактериальной транслокации при хирургических инфекциях.

**Цель исследования:** Оценить значимость бактериальной транслокации при перитоните в эксперименте.

**Материал и методы.** Моделирование перитонита проводили с использованием крыс породы Вистар (самцы) (20 животных), которым вначале вводили в брюшную полость смесь, состоящую из равного количества суточных культур *E. coli* БЛРС и *B. fragilis* ISCST1982 (зарегистрирован в Genbank, QUBP00000000) [10], выделенных нами от больных острым аппендицитом, в объёме 2 мл на животного, содержащей по 0,6 млрд микробных тел/мл в верхний этаж брюшной полости. При повторном инфицировании брюшины (через 6 часов) аэробно-анаэробную смесь вводили в нижний этаж брюшной полости. Количество микробных тел  $1,2 \times 10^9$  КОЕ/мл (4 McFarland) рассчитывали с помощью денситометра Densimatbio Merieux (Франция). Используемые штаммы обладали полилекарственной устойчивостью.

Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики. Эксперименты выполнялись в соответствии с нормами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Guidelines of the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, international» согласно протоколу, одобренному этическим комитетом ИНЦХТ. Выведение из эксперимента осуществляли на 12 часов, 1, 3, 7 суток.

Для морфологического исследования забирали образцы тонкого кишечника. Фиксацию материала проводили в растворе Fine Fix (Milestone, Италия). После фиксации осуществляли проводку и заливку материала в парафиновые блоки, изготавливали серийные срезы толщиной 3 мкм. Исследования проводили методом световой микроскопии с использованием стандартных окрасок гематоксилин-эозином.

Бактериологические исследования проводились на 3-и - 7-е сутки от начала эксперимента (по 5 животных на 1 срок). Животных выводили из эксперимента под наркозом и с соблюдением правил эвтаназии.

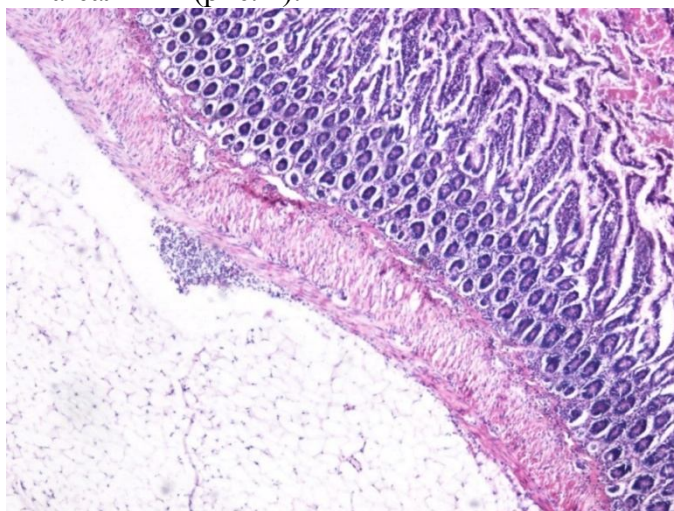
С целью изучения бактериальной транслокации экссудат из брюшной полости забирали в транспортную систему фирмы «Копан» "Swabtransportsystem" (Италия). Бактериологический метод включал аэробную и анаэробную технику культивирования, выделение, количественное определение, идентификацию аэробных и анаэробных микроорганизмов и определение их чувствительности к антимикробным препаратам с использованием высоко-селективных сред, диагностических экспресс-тестов и полуавтоматического микробиологического анализатора «АТВ Expression» (bioMérieux, Франция).

Посевы экссудатов осуществляли на расширенный набор питательных сред для аэробных, факультативно-анаэробных (5% кровяной агар, шоколадный агар, среда Эндо, ЖСА, агар Сабуро) и неклостридиальных анаэробных бактерий (анаэробный кровяной агар, к основе которого добавляется 5% гемолизированной крови, 10 мкг/мл витамина К и 5 мкг/мл гемина. Исследуемый материал в аэробных условиях инкубировали при 35 °С 18–24 часа. Культивирование в строго анаэробных условиях – при 35 °С в течение 48 часов с применением микроанаэроостатов GENbox anaer (bioMérieux, Франция), в которых анаэробные условия создавались с помощью газогенерирующих пакетов.

Видовую идентификацию выделенных микроорганизмов проводили по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим признакам с помощью автоматического бактериологического анализатора АТВ Expression (bio Mérieux, Франция) с использованием тест-систем (ID 32A, API 20E, API 20 Strep, ID 32GN).

Обнаружение БЛРС (бета-лактамаз расширенного спектра) у *E. coli* проводили с помощью фенотипического метода и метода «двойных дисков».

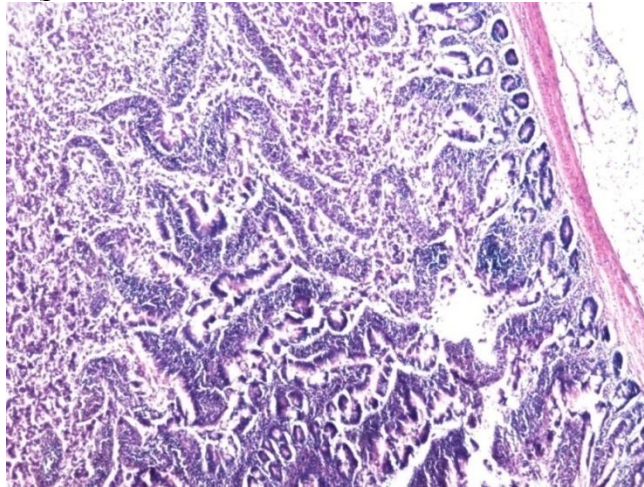
**Результаты.** Установлено, что у всех животных при моделировании развивался патологический процесс в брюшной полости. Через 12 часов после заражения наблюдались гнойные наложения на брюшине, нейтрофильная инфильтрация сальника, подслизистого слоя кишки, спайки типа кишка-сальник (рис. 1).



**Рис. 1.** Гистограмма. Стенка тонкой кишки с наложениями на брюшине, спайкой типа кишка – сальник, сохранные ворсины кишечника, 12 часов эксперимента, окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 40×

Через 1 сутки отмечена деструкция части ворсин, гнойные наложения на брюшине, стаз в сосудах сальника, спайки по типу «кишка – сальник». К 3-м суткам гнойно-

деструктивные явления в ворсинах нарастали, отмечены спайки типа «кишка – сальник», выраженный гнойный оментит. К 7-м суткам отмечалась дальнейшая отрицательная динамика процесса – большие зоны деструкции ворсин, крипт-абсцессы, гнойно-продуктивные наложения на брюшине, спайки по типу «кишка – сальник», «кишка – кишка». В просвете кишечника – гной и детрит (рис. 2).



**Рис. 2.** Гистограмма. Стенка тонкой кишки, спайка типа кишка – сальник, деструкция ворсин, детрит в просвете кишечника. 7 суток эксперимента, окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 40×

По результатам проведённых нами бактериологических исследований установлено, что на 3-и сутки инфицированность экссудата выявлена у всех 5 крыс (в 100% наблюдений). *E. coli* БЛРС были выделены во всех случаях в концентрациях  $10^5$ – $10^6$  КОЕ/мл. Штамм *B. fragilis* высеян только из одного экспериментального образца (20%) в концентрации  $10^5$  КОЕ/мл.

При увеличении сроков эксперимента до семи суток в перитонеальном экссудате обнаруживался только аэробный тест-штамм *E. coli* БЛРС в концентрациях  $10^3$ – $10^4$  КОЕ/мл, что на 1–2 порядка ниже (рост в анаэробных условиях), чем в предыдущем исследовании, при полном отсутствии роста *B. fragilis*.

Чистые культуры *E. coli* БЛРС и *B. fragilis*, выделенные из экссудата брюшной полости экспериментальных животных, по своим биохимическим свойствам были идентичны штаммам, использованным для моделирования перитонита. Все выделенные штаммы *E. coli* продуцировали бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), чем также подтверждена их идентичность.

Поскольку в норме полость брюшины является стерильной, рост любого вида микроорганизмов кроме тест-штаммов оценивался нами как результат бактериальной транслокации.

Так, на 3-и сутки эксперимента *E. coli* БЛРС в виде моноинфекции представлен только в одном образце экссудата. В 3 случаях (60%) *E. coli* БЛРС выявлены в ассоциации с *Enterococcus faecalis*, концентрация которого составляла  $10^4$ – $10^5$  КОЕ/мл (табл. 1), а также *Lactobacillus* ssp. ( $10^4$  КОЕ/мл), который является представителем нормальной микрофлоры.

На 7-е сутки в одном образце выявлен представитель нормобиоты желудочно-кишечного тракта – *Actinomyces* spp. (табл. 2).

Таблица 1

Результаты исследования видового и количественного состава микрофлоры перитонеального экссудата (3-и сутки эксперимента)

Посев в аэробных условиях			Посев в анаэробных условиях	
№	Вид микроорганизмов	КОЕ/мл	Вид микроорганизмов	КОЕ/мл
5011	<i>E. coli</i> ESBL	$10^5$	<i>E. coli</i> ESBL <i>Enterococcus faecalis</i>	$10^5$ $10^5$
5012	<i>E. coli</i> ESBL	$10^5$	<i>E. coli</i> ESBL <i>Enterococcus faecalis</i>	$10^5$ $10^4$
5013	<i>E. coli</i> ESBL	$10^6$	<i>E. coli</i> ESBL	$10^5$

5014	<i>E. coli</i> ESBL	10 <sup>5</sup>	<i>E. coli</i> ESBL <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Lactobacillus</i> ssp.	10 <sup>5</sup> 10 <sup>5</sup> 10 <sup>4</sup>
5015	<i>E. coli</i> ESBL	10 <sup>5</sup>	<i>E. coli</i> ESBL <i>Enterococcus faecalis</i>	10 <sup>5</sup> 10 <sup>5</sup>

Бактериологическое исследование экссудата обычным методом и в анаэробных условиях выявило различия в высеваемой микрофлоре. Данный пример является также наглядной демонстрацией того, насколько важна полная бактериологическая диагностика, раскрывающая истинный микробный пейзаж перитонеального экссудата – объект воздействия при комплексном лечении перитонита.

Установлен приоритет контаминации экссудата грамотрицательной флорой, а также на синергизм аэробной и анаэробной микрофлоры, что необходимо учитывать в клинической практике при назначении адекватной рациональной антибактериальной терапии.

Таблица 2

Результаты исследования видового и количественного состава микрофлоры перитонеального экссудата (7-е сутки эксперимента)

Посев в аэробных условиях			Посев в анаэробных условиях	
№	Вид микроорганизмов	КОЕ/мл	Вид микроорганизмов	КОЕ/мл
5016	<i>E. coli</i> ESBL	<10 <sup>3</sup>	<i>E. coli</i> ESBL <i>Actinomyces</i> spp.	10 <sup>3</sup> 10 <sup>3</sup>
5017	<i>E. coli</i> ESBL	10 <sup>4</sup>	<i>E. coli</i> ESBL	10 <sup>4</sup>
5018	<i>E. coli</i> ESBL	10 <sup>4</sup>	<i>E. coli</i> ESBL	10 <sup>4</sup>
5019	роста нет		<i>E. coli</i> ESBL	10 <sup>3</sup>
5020	<i>E. coli</i> ESBL	10 <sup>4</sup>	<i>E. coli</i> ESBL	10 <sup>4</sup>

**Заключение.** Таким образом, нами воспроизведена модель перитонита с применением наиболее ревалентных полирезистентных госпитальных штаммов [11]. Главной причиной бактериальной транслокации при экспериментальном перитоните мы считаем нарушение проницаемости эпителиального кишечного барьера, что подтверждено микробиологическими и морфологическими данными. Доказано вовлечение кишечной стенки в патологический процесс с нарастанием гнойно-деструктивных изменений в стенке кишки и разрушением ворсин.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках НИР 01201280990. Исследование проведено с применением оборудования ЦКП «Диагностические изображения в хирургии».

### Литература

1. Томнюк Н.Д., Данилина Е.П., Черных А.Н., Парно А.А., Шурко К.С. Перитонит, как одна из основных причин летальных исходов. Современные наукоёмкие технологии. 2010. 10. 81-84.
2. Дремина Н.Н., Чепурных Е.Е., Фадеева Т.В., Шурыгина И.А. Бактериальная транслокация при перитоните. Современные проблемы науки и образования. 2018. 6. 48.
3. Zharikov A.N., Lubyansky V.G., Zharikov A.A. A differentiated approach to repeat small-bowel anastomoses in patients with postoperative peritonitis: a prospective cohort study. Eur J Trauma Emerg Surg. 2019. doi: 10.1007/s00068-019-01084-7.
4. Gauzit R., Péan Y., Barth X., Mistretta F., Lalaude O. Epidemiology, management, and prognosis of secondary nonpostoperative peritonitis: a French prospective observational multicenter study. Surg Infect. 2009. 10 (2). 119-127.
5. Dever J.B., Sheikh M.Y. Review article: spontaneous bacterial peritonitis-bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention. Aliment Pharmacol Ther. 2015. 41 (11). 1116-1131. doi: 10.1111/apt.13172.

6. Волков А.Г., Заривчацкий М.Ф. Микробный пейзаж абдоминальных хирургических инфекций у больных многопрофильного стационара. Пермский медицинский журнал. 2014. 31 (1). 53-57.
7. Фадеева Т.В., Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Ветохина А.В., Владимирова Л.М., Аюшинова Н.И., Панасюк А.И. Микробиологическая диагностика гнойно-воспалительных заболеваний живота. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2016. 110 (4). 95-98.
8. Гостищев В.К. Бактериальная транслокация при острой кишечной непроходимости. Медицина и экология. 2015. 1. 57-61.
9. Nagpal R., Yadav H. Bacterial translocation from the gut to the distant organs: an overview. Ann NutrMetab. 2017. 71 (1). 11-16. doi: 10.1159/000479918.
10. Bacteroidesfragilisstrain: ISCST1982. Availablefrom: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA485001>.
11. Фадеева Т.В., Дремина Н.Н., Шурыгина И.А., Чепурных Е.Е. *Bacteroidesfragilis* в развитии абдоминальной хирургической инфекции. Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2018. 154 (3). 5-11.

### References

1. Tomnjuk N.D., Danilina E.P., Chernyh A.N., Parno A.A., Shurko K.S. Peritonitis, as one of the main causes of deaths. Sovremennye naukoemkie tehnologii. 2010. 10. 81-84. in Russian.
2. Dremina N.N., Chepurnykh E.E., Fadeeva T.V., Shurygina I.A. Bacterial translocation in peritonitis. Sovremennye problem nauki i obrazovaniya. 2018. 6. 48. in Russian.
3. Zharikov A.N., Lubyansky V.G., Zharikov A.A. A differentiated approach to repeat small-bowel anastomoses in patients with postoperative peritonitis: a prospective cohort study. Eur J Trauma Emerg Surg. 2019. doi: 10.1007/s00068-019-01084-7.
4. Gauzit R., Péan Y., Barth X., Mistretta F., Lalaude O. Epidemiology, management, and prognosis of secondary nonpostoperative peritonitis: a French prospective observational multicenter study. Surg Infect. 2009. 10 (2). 119-127.
5. Dever J.B., Sheikh M.Y. Review article: spontaneous bacterial peritonitis--bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention. Aliment Pharmacol Ther. 2015. 41 (11). 1116-1131. doi: 10.1111/apt.13172.
6. Volkov A.G., Zarivchatskiy M.F. Microbial landscape of abdominal surgical infections in patients with a multidisciplinary hospital. Permskiy meditsinskiy zhurnal. 2014. 31 (1). 53-57. in Russian.
7. Fadeeva T.V., Shurygina I.A., Shurygin M.G., Vetokhina A.V., Vladimirova L.M., Ayushinova N.I., Panasyuk A.I. Microbiological diagnosis of purulent-inflammatory diseases of the abdomen. Byulleten' VSNTs SO RAMN. 2016. 110 (4). 95-98. in Russian.
8. Gostishchev V.K. Bacterial translocation in acute intestinal obstruction. Meditsina i ekologiya. 2015. 1. 57-61. in Russian.
9. Nagpal R., Yadav H. Bacterial translocation from the gut to the distant organs: an overview. Ann NutrMetab. 2017. 71 (1). 11-16. doi: 10.1159/000479918.
10. Bacteroidesfragilisstrain: ISCST1982. Availablefrom:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA485001>.
11. Fadeeva T.V., Dremina N.N., Shurygina I.A., Chepurnykh E.E. *Bacteroidesfragilis* in the development of abdominal surgical infection. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk). 2018. 154 (3). 5-11. In Russian.