

А.А. ЛЫЗИКОВ, Е.В. ВОРОПАЕВ, В.А ОСИПОВ, А.А. ПЕЧЕНКИН

## МОДЕЛИРОВАНИЕ УСЛОВИЙ ВЫСОКОГО РИСКА ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

УО «Гомельский государственный медицинский университет»,  
Республика Беларусь

**Цель.** Создать экспериментальную модель субкультуральной бактериемии для изучения биологических реакций сосудистых кондуитов на присутствие патогенных микроорганизмов в дозе, недостаточной для развития сепсиса.

**Материал и методы.** Экспериментальные исследования выполнены на 30 беспородных собаках весом  $15,3 \pm 3,7$  кг. Выполнялось аорто-бедренное шунтирование комбинированным кондуитом. У 20 животных до оперативного вмешательства проводилось моделирование послеоперационных септических осложнений, которое заключалось во внутривенном введении культуры *Staphylococcus aureus*. 10 животных служили контролем, и не инфицировались.

**Результаты.** Уровень лейкоцитов и клинические показатели в опытной группе достоверно не отличались от животных контрольной группы. На 3–5 сутки 14 из 20 животных опытной группы погибли от массивного кровотечения из анастомозов. Был проведен ПЦР-анализ: у части животных наряду с контрольным штаммом стафилококка идентифицирована нормальная микрофлора и другие виды стафилококка.

**Заключение.** Наличие субкультуральной бактериемии не вызывает клинической и лабораторной картины системного воспалительного ответа, но вызывает осложнения со стороны протеза, аналогичные септическим. Развитие инфекционных осложнений не зависит от дозы патогенного агента.

*Ключевые слова:* инфекция протеза, эксперимент, моделирование субкультуральной бактериемии, септические осложнения

**Objectives.** To create the experimental model of the subcultural bacteremia to study biological reactions of the vascular conduits on the presence of pathogenic microorganisms in the dose insufficient for sepsis development.

**Methods.** Experimental investigations were carried out on 30 out bred dogs with an average weight  $15,3 \pm 3,7$  kg. Aorto-femoral bypass with a combined conduit was performed in all of them. Modeling of high-risk conditions of postoperative septic complications by a single intravenous injection of *S.aureus* was performed in 20 dogs before the operation. 10 other animals were used for control and were not infected.

**Results.** The leucocytes level and clinical parameters in the experimental group didnt reliably differ from ones in the control group. For 3–5 days 14 out of 20 animals of the experimental group died because of the massive hemorrhage from the anastomoses. PCR analysis was carried out: in some animals together with the control strain of *Staphylococcus* a normal micro flora was identified as well as other types of *Staphylococcus*.

**Conclusions.** The presence of subcultural bacteremia doesn't cause clinical and laboratory manifestations of sepsis but result in complications of conduit survival similar to the septic ones. Development of infectious complications doesn't depend on the dosage of pathogenic agent.

*Keywords:* prosthesis infection, experiment, modeling, subcultural bacteremia, septic complications

### Введение

Обязательным компонентом сердечно-сосудистой хирургии является сосудистый протез. Однако взаимодействие кондуита и организма не ограничивается чисто механическими аспектами, а является сложным многофакторным и весьма динамичным процессом [1]. Понимание происходящего представляет собой ключ к обеспечению длительного функционирования сосудистого протеза [2]. Одним из наиболее сложных состояний, с точки зрения сохраннос-

ти кондуита, является критическая ишемия нижних конечностей при наличии гнойно-некротических поражений [3]. Наличие трофических нарушений кожных покровов носит местный характер без признаков общих проявлений сепсиса, но сопровождается повышенной угрозой инфицирования используемого протеза и развития грозных осложнений [4]. Возможно, это связано с наличием бактериемии, но концентрация патогенных микроорганизмов в крови при этом ниже уровня (в литературе в качестве пороговой концентрации фигурирует  $10^9$ ), необходимо-

го для развития сепсиса, и недостаточна для определения методом культивирования. Крайне важным для изучения биологических закономерностей сохранения кондуита в данных условиях является моделирование подобной субкультуральной бактериемии в эксперименте. В качестве экспериментальной модели нами были выбраны собаки, как наиболее сходные с человеком по биологическим реакциям [5].

**Цель исследования** – создать экспериментальную модель субкультуральной бактериемии для изучения биологических реакций сосудистых кондуитов на присутствие патогенных микроорганизмов в дозе, недостаточной для развития системного воспалительного ответа.

### Материал и методы

В исследование включено 30 экспериментальных животных - беспородных собак, самцов, весом  $15,3 \pm 3,7$  кг.

Экспериментальная часть выполнялась на базе патофизиологической группы ЦНИЛ БелМАПО в стандартных условиях вивария. Все собаки были оперированы. Им выполнялось аорто-бедренное шунтирование комбинированным кондуитом, состоящим из фрагментов бедренной аутолены, большой подкожной аутолены и протеза из политетрафторэтилена. У 20 животных до оперативного вмешательства проводилось моделирование инфицирования организма путем внутривенного введения культуры *Staphylococcus aureus* (опытная группа). 10 животных составили контрольную группу, в предоперационном периоде они не инфицировались микроорганизмами.

При проведении экспериментальных исследований руководствовались Инструкцией МЗ РБ 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ»; МУ «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)» (Руководящий нормативный документ РД-126-91. М., 1992); МР «Правила работы с использованием экспериментальных животных» (утв. 16.06.2004г. ректором БелМАПО).

Анестезиологическое обеспечение осуществлялось препаратами: тиопентал натрия, фентанил и дроперидол.

В ходе операции и в послеоперационном периоде (на 2-е сутки) осуществлялся забор кро-

ви для гематологических исследований. Кровь отбирали в пробирки с антикоагулянтom (ЭДТА) по 3 мл. Дальнейшие исследования проводили на гематологическом анализаторе «MICROS 60» («HoribaABX diagnostics», США).

Инфицирование моделировалось путем внутривенного введения культуры *Staphylococcus aureus* за 10 минут до создания сосудистых анастомозов. Для контроля забиралась кровь на бактериологическое исследование и ПЦР до и после введения культуры.

Для инфицирования искусственных сосудистых протезов с целью создания модели гнойно-воспалительных осложнений использовался штамм *Staphylococcus aureus*, как наиболее частый возбудитель гнойных осложнений при искусственном протезировании сосудов. Для маркирования штамма с целью подтверждения его этиологической роли и дифференциации от «диких» штаммов стафилококков, которые также могут вызвать нагноительные процессы у экспериментальных животных (попав в рану с поверхности кожи, окружающей среды и т.д.) наиболее доступна метка штамма по антибиотикограмме. Штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 35592 отличается своей устойчивостью к оксациллину (метициллину). Это так называемый метициллинрезистентный стафилококк - MRSA, по литературным данным, не получивший широкого распространения в РБ.

Поскольку внутривенное введение *St. aureus* штамма в количестве  $10^9$  КОЕ в 1 мл вызывает экспериментальный сепсис, то следовало подобрать меньшую инъекционную дозу. В основной группе вводили 2,5 мл раствора в концентрации  $10^6$ /мл однократно. Таким образом, было введено  $2,5 \times 10^6$  микробных тел *St. aureus* по стандартам мутности MacFarland.

Для выделения стафилококков используется система контроля стерильности крови BacT/ALERT 3D (Франция). Флаконы с универсальной жидкой питательной средой и автоматическая система контроля роста гарантируют выделение *Staphylococcus aureus* в течение 10 суток, даже если в исследуемом материале будет содержаться всего 100 КОЕ.

Для идентификации и определения чувствительности стафилококков использовался бактериологический анализатор ATB Expression (Франция):

1. Стрипы идентификации ID 32 STAPH (Кат. №32 500)
2. Стрипы для определения чувствительно-

сти АТВ® СТАРН 5 (Кат. № 14 325):

PEN – пенициллин, TSU – котримаксозол, GEN – гентамицин, ERY – эритромицин, CLI – клиндамицин, TET – тетрациклин, MIN – миноциклин, VAN – ванкомицин, TEC – тейкопланин, RFA – рифампицин, NOR – норфлоксацин, LVX – левофлоксацин, FUC – фузидиевая кислота, FUR – нитрофурантоин, QDA – квинпристин-дальфопристин, OXA – оксациллин.

Контроль качества исследований подтвержден применением штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, рекомендованный производителем. Использование данного метода по профилям резистентности позволяет выявить оксациллинрезистентный штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 35592.

Для дополнительного контроля эксперимента, проведенного бактериологическим методом, проведен молекулярно-генетический анализ, для чего использован метод ПЦР в реальном времени (RealTime PCR) протокол SybrGreen, проведенный на амплификаторе RotorGene 3000. Для исследования проводили ПЦР с универсальными праймерами для быстрой идентификации различных бактериологических штаммов.

U1– CCAGCAGCCGCGGTAATACG,

U2–ATCGG(C/T)TACSTTGTTACGACTTC.

Условия проведения ПЦР были стандартными для SybrGreen протокола.

Проведен анализ кривых плавления.

Праймеры синтезированы по нашему заказу ОДО «Праймтех», г. Минск. Для проведения ПЦР в реальном времени использовались реагенты фирмы Fermentas (Литва).

Полученные данные отображены в формате «среднее ± стандартное отклонение». Обработку данных осуществляли при помощи пакетов Microsoft Office фирмы Microsoft и Statistica 6.0 фирмы Statsoft. При сравнении двух групп

данных использовали двусторонний тест Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

На вторые сутки после внутривенного введения культуры *Staphylococcus aureus* проводился гематологический анализ (таблица 1) и измерялись ЧСС, частота дыхания и температура тела (таблица 2). За основу критериев развития сепсиса брали критерии консенсуса American College of Chest Physicians (ACCP)/ Society of Critical Care Medicine (SCCM), 1992. Использовали следующие показатели: уровень лейкоцитов крови, температуру тела, частоту сердечных сокращений (ЧСС) и частоту дыхания. Поскольку физиологические нормы собак отличаются от таковых у человека, то признаком изменения учитываемых показателей считали достоверные различия с контрольной группой.

Из таблиц 1 и 2 видно, что уровень лейкоцитов и клинические показатели в опытной группе достоверно не отличались от животных контрольной группы, что позволило сделать вывод об отсутствии сепсиса. Поведение и состояние собак в обеих группах в первые несколько дней после операции также не различалось и было адекватным тяжести хирургического вмешательства. Двигательная активность была значительно снижена, что связано с характером хирургического вмешательства.

К 3-им суткам констатировали улучшение общего состояния оперированных животных: отмечалось значительное повышение двигательной активности (собаки вставали на ноги и могли перемещаться по клетке), восстановление пищевого поведения, погребления жидкости и пр.

Однако, неожиданно, на 3-5 сутки из 10 опе-

Таблица 1

Показатели гематологического анализа крови (M±σ)				
Показатель	Опытная группа	Контрольная группа	t	p
Лейкоциты, ×10 <sup>9</sup>	9,34±5,37	6,21±2,25	1,75	0,09
Эритроциты, ×10 <sup>12</sup>	6,05±0,95	6,29±1,22	-0,57	0,57
Гемоглобин, г/л	130,9±15,9	131,5±21,9	-0,086	0,93

Таблица 2

Клинические показатели в исследуемых группах (M±σ)				
Показатель	Опытная группа	Контрольная группа	t	p
ЧСС	105,4±12,2	97,6±11,8	-1,7	0,1
Частота дыхания	17,5±6,3	14,2±3,0	-1,6	0,1
Температура тела С°	38,5±0,7	38,5±0,5	0,2	0,9

рированных животных опытной группы 9 погибли от массивного кровотечения из анастомозов. Таким образом было выявлено, что внутривенное введение культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 35592, (MRSA) в дозе  $2,5 \times 10^6$  не вызывает системной реакции, но является причиной классических инфекционных осложнений (аррозивного кровотечения). У нас возникло предположение, что инфекционные осложнения со стороны сосудистого кондукта нельзя объяснить только непосредственным воздействием инфекционного агента на протез. Для дальнейшего изучения данного феномена нами было дополнительно прооперировано 5 животных по вышеописанной методике, но с меньшей дозой *St. aureus* ATCC 35592 (внутривенно 1,5 мл раствора, содержащего 500000 микробных тел /мл). Для каждой собаки проводили бактериологический анализ, ПЦР-анализ и иммунологический скрининг. Несмотря на протекание послеоперационного периода и восстановление двигательной активности, сходные с таковыми у животных контрольной группы, 4 из 5 собак также погибли на 3-и сутки от острого обильного аррозивного кровотечения из анастомозов. Последняя собака из этой серии погибла на 79-е сутки от тех же причин. Данные бактериологического исследования приведены в таблице 3.

На основании результатов наблюдений, приведенных в таблице 3, удалось установить, что все животные были успешно инфицированы контрольным штаммом *Staphylococcus aureus* ATCC 35592, (MRSA), но у собак Б, В, Г на разных этапах исследования при взятии крови образцы были контаминированы представителями нормальной микрофлоры животных.

Для дополнительного контроля эксперимента, проведенного бактериологическим методом, был проведен молекулярно-генетический анализ.

При проведении анализа кривых плавления установлено следующее. Кривые по температуре плавления четко делятся на три группы. В первую группу вошли образцы, полученные от 3 животных (А, В, Г) в третьей части эксперимента (3-и сутки после операции), у которых бактериологически идентифицирован *St. aureus* ATCC 35592. Вторую группу составила *E.coli*. В третью группу вошли различные микроорганизмы - как представители нормальной микрофлоры, так и *St. aureus*, но, по данным анализа кривых плавления, – это другие виды стафилококка. В качестве дополнительного контроля был использован штамм ATCC 25923, с которым совпадают кривые плавления некоторых образцов. При попарном сравнении вторых и

Таблица 3

**Результаты бактериологического исследования крови животных, инфицированных *Staphylococcus aureus* ATCC 35592, (MRSA) в/в введением 1,5 мл физиологического раствора, содержащего 500000 микробных тел в 1 мл**

Условное обозначение инфицированного животного	Результат бактериологического исследования образцов крови, взятых у животных			Примечания
	До инфицирования	30 минут после инфицирования <i>St. aureus</i> ATCC 35592, MRSA	На 3-е сутки после инфицирования <i>St. aureus</i> ATCC 35592, MRSA	
А(26)	роста микрофлоры не получено	выделен <i>St. aureus</i> ATCC 35592, MRSA	выделен <i>St. aureus</i> ATCC 35592, MRSA	
Б(27)	роста микрофлоры не получено	выделен <i>St. aureus</i> ATCC 35592, MRSA	выделен <i>St. simulans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i> – представитель нормальной микрофлоры кожных покровов и дыхательных путей собак
В(28)	роста микрофлоры не получено	выделен <i>St. aureus</i> ATCC 35592, MRSA)	выделена <i>E.coli</i>	<i>E. coli</i> – представитель нормальной микрофлоры кишечника собак
Г(29)	роста микрофлоры не получено	выделен <i>St. simulans</i>	выделен <i>St. aureus</i> ATCC 35592, MRSA	<i>Staphylococcus simulans</i> - представителем нормальной микрофлоры кожных покровов и дыхательных путей собак
Д(30)	выделена <i>Pasteurella pneumotropica</i>	выделен <i>St. aureus</i> ATCC 35592, MRSA)	выделен <i>St. aureus</i> ATCC 35592, MRSA	<i>Pasteurella pneumotropica</i> – представитель нормальной микрофлоры дыхательных путей собак

третьих образцов полное совпадение видов микроорганизмов (второй и третий образцы) отмечено только для собаки Д.

Таким образом, можно предположить, что у части инфицированных животных (А и Д) произошло устойчивое инфицирование контрольным штаммом *St. aureus*, а у части животных (Б, В, Г) наряду с контрольным стафилококком идентифицирована нормальная микрофлора и, вероятно, другие виды стафилококка, что свидетельствует о возможной контаминации и индивидуальном иммунном ответе, способном подавить *St. aureus*. Результаты ПЦР совпадают с бактериологическими по 4 из 5 животных (собаки Б, В, Г, Д).

Иммунологический анализ результатов не дал, поскольку были использованы тест-системы для определения антител к *St. aureus*, предназначенные для человека. По-видимому, необходимы тест-системы для оценки клеточного иммунитета собаки, которые оказались для нас недоступны.

На завершающем этапе эксперимента прооперировано еще 5 животных контрольной группы. Им вводили антибиотик Бициллин внутримышечно в дозе 300 000 ЕД на 2-е сутки, что позволило избежать их гибели, но при этом сохранялась морфологическая картина инфицирования кондуитов.

### Заключение

1. Наличие субкультуральной бактериемии не вызывает клинической и лабораторной картины системного воспалительного ответа, но вызывает осложнения со стороны искусственного протеза, сходные с таковыми при сепсисе.

2. Развитие инфекционных осложнений не зависит от дозы патогенного агента.

3. По данным исследований, от 40 до 60% животных оказались инфицированы сапрофитной флорой вместо эталонного штамма *St. aureus*, использованного для первичного инфицирования. Можно предположить, что инфицирование малыми дозами патогенной микрофлоры запускает процесс десенсибилизации иммунной систе-

мы хозяина, что создает условия для инфицирования сапрофитной флорой, которая, в свою очередь, приводит к развитию септических осложнений.

4. Для создания экспериментальной модели потенциального инфицирования искусственного протеза сосуда, сходной с наличием гнойно-трофических нарушений, достаточно однократного введения *St. aureus* в дозе  $1,25 \times 10^6$  микробных тел с последующей однократной инъекцией антибиотика пенициллинового ряда, что позволяет избежать гибели животных от септических осложнений со стороны протеза при сохранении морфологической картины инфицирования кондуитов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Kassab, G. S. Biomechanical Considerations in the Design of Graft: The Homeostasis Hypothesis / G. S. Kassab, J. A. Navia // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* – 2006. – Vol. 242. – P. 19-28.
2. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass: a review of the literature / P. Klinkert [et al.] // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 2004. – Vol. 27, N 4. – P. 357-362.
3. Neoartical reconstruction for aortic graft infection: need for endovascular adjunctive therapies? / J. Faulk [et al.] // *Ann. Vasc. Surg.* – 2005. – Vol. 19, N 6. – P. 774-781.
4. Vascular allografts are resistant to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through indoleamine 2, 3-dioxygenase in a murine model / A. Saito [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2008. – Vol. 136, N 1. – P. 159-167.
5. Scales, J. T. Tissue reactions to synthetic materials / J. T. Scales // *Proc. R. Soc. Med.* – 1953. – Vol. 46. – P. 647-652.

### Адрес для корреспонденции

246050, Республика Беларусь,  
г. Гомель, ул. Ланге, д. 5,  
Гомельский государственный  
медицинский университет,  
курс сердечно-сосудистой хирургии,  
тел.моб.: +375 29 656-80-29,  
e-mail: Lyzikov@mail.ru,  
Лызиков А.А.

Поступила 28.03.2011 г.