

Omar Montenegro¹
Soledad Illescas²
José Carlos González²
David Padilla³
Pedro Villarejo³
Víctor Baladrón¹
Rocio Galán⁴
Natalia Bejarano⁵
Lucía Medina-Prado⁶
Natalia Villaseca⁶
José Manuel Pérez-Ortiz⁶
José Ramón Muñoz-Rodríguez⁶
Juan Luis Santiago⁶
Francisco Javier Redondo¹

Desarrollo de modelo experimental animal de peritonitis bacteriana

¹Servicio de Anestesiología y Reanimación. Hospital General Universitario de Ciudad Real.

²Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Ciudad Real.

³Servicio de Cirugía. Hospital General Universitario de Ciudad Real.

⁴Servicio de Oncología. Hospital General Universitario de Ciudad Real.

⁵Servicio de Pediatría. Hospital General Universitario de Ciudad Real.

⁶Unidad de Investigación Traslacional. Hospital General Universitario de Ciudad Real.

Article history

Received: 19 August 2019; Revision Requested: 3 October 2019; Revision Received: 9 October 2019; Accepted: 14 October 2019

RESUMEN

Objetivo. Desarrollar un modelo de sepsis abdominal en animal de experimentación.

Material y métodos. Se utilizan ratas Sprague-Dawley®, machos de 5 semanas con pesos entre 270-280 g en el momento de la inoculación (N=39). Inicialmente se realiza un estudio piloto (N=9), distribuyéndolas en 3 grupos (3/3/3) con inóculo de 1cc de *Escherichia coli* ATCC 25922 intraperitoneal en concentraciones de 10⁸, 10⁹ y 10¹⁰ UFC. En un segundo estudio (N=6) con distribución en dos grupos (3/3) se utilizan 1cc una concentración de *E. coli* 10¹⁰ UFC que se diluyen en 10 y 15 ml de agua destilada para su inoculación. Por último se inicia un ensayo experimental con aleatorización de 24 ratas en tres grupos de tratamiento tras la infección intraperitoneal: Grupo I con suero fisiológico (N=6), Grupo II con antibiótico (ceftriaxona) (N=9), Grupo III con antibiótico más adyuvante (ceftriaxona más alicina) (N=9). Se realizan muestras microbiológicas de sangre y líquido peritoneal, así como estudio histopatológico de órganos intraperitoneales (hígado, diafragma y peritoneo).

Resultados. Se observa muerte en el 100% de las ratas infectadas con la concentración de *E. coli* 10¹⁰ UFC con la dilución de 15 ml de agua destilada y sin antibiótico. El hemocultivo y cultivo de líquido peritoneal es positivo a la misma cepa en todas ellas. Se observa la formación de abscesos en la superficie del hígado e infiltración por polimorfonucleares en los tejidos.

Conclusión. Se establece que la dosis letal de *E. coli* es 10¹⁰ UFC diluida en 15 ml agua destilada en inyección intraperitoneal.

Palabras clave: Sepsis, peritonitis, *Escherichia coli*, ratas

Correspondencia:
Fco Javier Redondo Calvo,
Servicio de Anestesiología y Reanimación. Unidad de Investigación Traslacional.
Hospital General Universitario de Ciudad Real.
C/Obispo General Torija s/n.13005. Ciudad Real. España
Tfno.: 626320968
E-mail: fjredondo@sescam.jccm.es

Development of animal experimental model for bacterial peritonitis

ABSTRACT

Objective. The aim of the study was to develop a model of abdominal sepsis in the experimental animal.

Material and methods. Sprague-Dawley male rats of 5 weeks (N=39) were used. Initially, a pilot study (N = 9) was performed and distributed in 3 groups with 1cc inoculum of *Escherichia coli* ATCC 25922 intraperitoneally at concentrations of 10⁸, 10⁹ and 10¹⁰ CFU. Subsequently, concentrations of 10¹⁰ CFU are used in two groups of 3 rats with dilutions of 10 cc and 15 cc of distilled water respectively. Finally, a randomized trial of 24 rats was started in three treatment groups after intraperitoneal infection: Group I with physiological serum (N = 6), Group II with ceftriaxone (N = 9), Group III with ceftriaxone plus allicin (N = 9). Microbiological samples of blood and peritoneal fluid were made, as well as histopathological study of intraperitoneal organs (liver, diaphragm and peritoneum).

Results. Death of 100% of the rats infected with 10¹⁰ *E. coli* UFC concentration with the dilution of 15 ml of distilled water and without antibiotic was observed. The blood culture and peritoneal fluid culture was positive for the same strain in all of them. The formation of abscesses on the liver surface and polymorphonuclear infiltration in tissues were observed.

Conclusion. The lethal dose of *E.coli* is 10¹⁰ CFU diluted in 15 cc distilled water by intraperitoneal injection

Key words: Sepsis, peritonitis, *Escherichia coli*, rats

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia se han utilizado animales de experimentación para crear distintos modelos que ayuden a comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los propios animales. También han

servido como aporte a la docencia biológica, desarrollo, producción y control de medicamentos y alimentos [1].

En el contexto de la sepsis/shock séptico existen una gran cantidad de modelos animales que intentan replicar la fisiopatología de la sepsis humana. Sin embargo encontramos importantes diferencias entre ambas especies y el desarrollo del proceso séptico normalmente no reproduce las condiciones de la sepsis humana. En primer lugar, la sepsis en humanos es una patología de presentación paulatina e insidiosa y en los animales la sepsis suele ser mucho más aguda [2]. En segundo lugar, la intervención experimental sucede en las etapas tempranas de la sepsis, cuando todavía los niveles de citocinas inflamatorias están elevados y el daño orgánico y vascular es mínimo, a diferencia del ser humano, donde la intervención terapéutica habitualmente se produce cuando la respuesta de las citocinas proinflamatorias está cambiando a anti-inflamatorias y el daño orgánico ya es aparente. En tercer lugar, es habitual que la población susceptible en humanos sea en los extremos de la vida (niños y adultos mayores), en cambio los animales que se utilizan para experimentación son adultos jóvenes sin otras comorbilidades. En cuarto lugar, los animales en la mayoría de modelos no reciben un tratamiento de soporte completo que incluya la ventilación mecánica, fluidoterapia, fármacos inotrópicos, antibioterapia, soporte nutricional enteral o parenteral y terapia renal sustitutiva. Por último, el tiempo transcurrido desde el comienzo de los síntomas hasta el fallo orgánico es mucho más corto en modelos animales, en los que el proceso se concentra en unos pocos días. En humanos el tiempo transcurrido hasta el fallo orgánico suele ser de semanas. Todo esto afecta severamente a la evaluación de las terapias farmacológicas anti sepsis [3]. Y de aquí que no exista un modelo idóneo, cada modelo presenta ventajas y desventajas en función del parámetro que se desea estudiar y el animal de experimentación empleado.

Uno de los modelos de experimentación animal más utilizada es el creado a partir de la inyección, tanto local como sistémica de bacterias vivas, con frecuencia *Escherichia coli* o de productos bacterianos o endotoxinas como los lipopolisacáridos (LPL) [4]. El uso de endotoxinas presenta una gran cantidad de limitaciones en roedores, siendo la principal, la elevada dosis necesaria para producir un estado de shock, que es entre 10 y 100 veces superior a la necesaria en humanos. Por otro lado, existen diferencias en la clínica que la endotoxina induce en roedores y en humano [5, 6].

Otros modelos se generan a partir de la manipulación del intestino y el vertido de contenido fecal a la cavidad peritoneal generando una peritonitis polimicrobiana y como consecuencia una respuesta inflamatoria sistémica.

El procedimiento más ampliamente utilizado para generar un modelo de peritonitis en roedores es la ligadura y punción del ciego (CLP "*cecal ligation and puncture*"). Este modelo es apto para la evaluación de terapias que actúan sobre los cambios fisiopatológicos producidos durante el proceso séptico. Se ha considerado la técnica "gold standard" [7, 8].

Dados los escasos modelos de sepsis reproducibles en la

literatura se plantea desarrollar y estandarizar un modelo de sepsis abdominal en animal de experimentación mediante la inoculación de *E. coli* con punción única en cavidad peritoneal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación y condiciones de estudio. Se ha desarrollado un estudio experimental (ensayo terapéutico) de infección intraabdominal donde se utiliza el animal de experimentación rata Sprague-Dawley®, Harlan Laboratories Models SL, macho, 5 semanas y 100-125 g. Tras una semana de aclimatación y previo a la experimentación todos los animales alcanzan pesos entre 270-280 g. Se lleva a cabo en las instalaciones de la Unidad de Investigación Traslacional (UIT) del Hospital General Universitario de Ciudad Real.

Se realiza en idéntico horario, para evitar la posible influencia del ciclo circadiano en los resultados del trabajo. Todos los animales estaban sanos y no recibieron tratamiento previo.

Los animales se mantienen con comida y agua *ad libitum*, con un ciclo 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y una temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ con una humedad relativa del aire del 50-70% y con 15-20 renovaciones/hora sin recirculación de aire. Son estabulados conforme al RD 53/2013 y ninguno en solitario, para favorecer el comportamiento grupal de los mismos. Además se mantienen una semana en estas condiciones ambientales, para permitir su aclimatación, antes del inicio del estudio.

Se realiza un marcaje mediante tatuaje permanente en la cola de las ratas, para poder hacer el seguimiento individual del estado de bienestar de cada una de ellas. La localización de los animales y su estabulación se realiza en el animalario la citada Unidad de Investigación Traslacional.

Todos los procedimientos experimentales se realizan de acuerdo con las directrices de la normativa Europea (Directiva 2010/63/EU) de protección de los animales de experimentación y con la española (RD 53/2013). El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal y Órgano Habilitado del Hospital General Universitario de Ciudad Real.

Los desechos convencionales y biológicos son retirados y eliminados de forma regular, segura y conforme a las recomendaciones institucionales de riesgos laborales.

Modelo de trabajo animal

Determinación de dosis letal (estudio piloto). Inicialmente se realiza un estudio piloto con (N=9), distribuyéndolas en 3 grupos (3/3/3) con inóculo de 1 ml de *E. coli* ATCC 25922 intraperitoneal en concentraciones de 10^8 , 10^9 y 10^{10} UFC. En un segundo estudio (N=6) con distribución en dos grupos (3 / 3) se utilizan 1 ml de *E. coli* 10^{10} UCF siendo diluidas en 10 y 15 ml de agua destilada para su inoculación.

Para la creación del modelo de peritonitis se realiza inyección intraperitoneal a ratas con pesos comprendidos entre 270-280 gramos, previa anestesia con ketamina/xilacina 75/10 mg/kg intraperitoneal (figura 1).

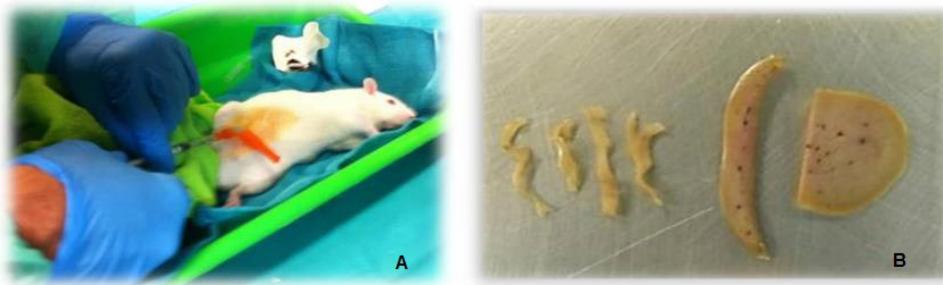


Figura 1 | Corresponde a la administración de tratamiento inmediatamente después de la inoculación con *E. coli* intraperitoneal en la rata anestesiada (A). Cortes realizados en el hígado para evaluación histopatológica (B).

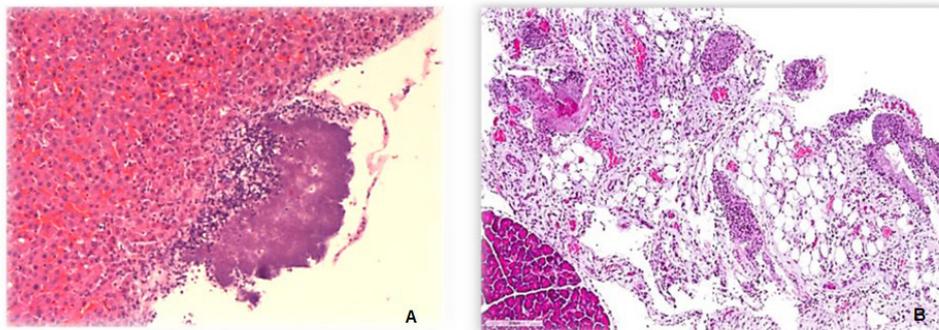


Figura 2 | Absceso en la superficie del hígado. Infiltración de PMN y colonias bacterianas (A). PMN y *E. coli* en superficie peritoneal (B)

La preparación del inóculo se realiza en agua destilada con una suspensión de *E. coli* ATCC 25922 a diferentes concentraciones de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). En un inicio se compara la concentración del inóculo en un espectrofotómetro y verifica con un espectrómetro de DADE.

Partiendo de esta suspensión se preparan tantos tubos como ratas se van a inocular, añadiendo a 1 ml de la suspensión la cantidad de ml de agua destilada a ensayar. Se comprueba que la concentración bacteriana se ajusta a lo esperado realizando diluciones seriadas. Para ello se siembran en recuento en un agar sangre. Tras extensión se realiza control y lectura a las 18-24 h a 37°C.

El tiempo transcurrido entre la preparación del inóculo y la inoculación siempre es inferior a 2 horas en todos los casos ensayados

Estudio terapéutico. Una vez encontrada la dosis letal, se realiza aleatorización en tres grupos de animales: grupo I (con suero fisiológico), grupo II (con ceftriaxona), grupo III (con ceftriaxona más alicina). Inclusión de 6 ratas en grupo control (conocimiento de la dosis letal y aplicación del principio

de las tres Rs.) y 9 ratas en los grupos II y III. Para el cálculo de tamaño muestral se tienen en cuenta estudios de modelos anteriores [4, 7, 8] y las normas en las que se basan los principios éticos para minimizar el uso de animales en la investigación: las tres "Rs": Reducir, Reemplazar y Refinar.

Se genera un modelo de peritonitis en todos los grupos. Las ratas de diferentes grupos nunca son estabuladas en el mismo estante.

Durante el ensayo, cuando el animal muere dentro de las primeras 24 horas, se realiza cultivo microbiológico de líquido peritoneal y se toman muestras de hígado, riñón, intestino y peritoneo para evaluación histopatológica (figura 1). Con el resto de animales se espera al día del sacrificio o séptimo día de tratamiento. Los parámetros valorados son: congestión hepática, polimorfonucleares (PMN) en sinusoides hepáticos, PMN en superficie de hígado y peritoneo y colonización de bacterias en superficie de hígado y peritoneo (figura 2).

RESULTADOS

Estudio piloto. Se utilizan 9 ratas para realizar el estudio piloto (tres por cada una de las concentraciones indicadas). Con dichas concentraciones y dilución se observa que todas

Tabla 1 Resumen de los diferentes estudios realizados. Se muestra el empleo del inóculo de *E. coli* a diferentes concentraciones y las diluciones administradas a nivel intraperitoneal. También se muestran los resultados de cultivos de líquido peritoneal con su respectivo antibiograma.

	Inóculo <i>E. coli</i> ^a 1cc/UFC	Dilución agua destilada (cc)	Ratas (n)	Éxito	Grupo tratamiento ^b	Cultivo líquido peritoneal	Sensibilidad ^c
ENSAYO PILOTO	10 ⁸ UFC	-	3	0		<i>E. coli</i>	Multisensible
	10 ⁹ UFC	-	3	0		<i>E. coli</i>	Multisensible
	10 ¹⁰ UFC	-	3	0		<i>E. coli</i>	Multisensible
	10 ¹⁰ UFC	10 cc	3	1		<i>E. coli</i>	Multisensible
	10 ¹⁰ UFC	15 cc	3	3		-	-
ENSAYO TERAPÉUTICO	10 ¹⁰ UFC	15 cc	6	6	Grupo I	<i>E. coli</i>	Multisensible
	10 ¹⁰ UFC	15 cc	9	1	Grupo II	<i>E. coli</i>	Multisensible
	10 ¹⁰ UFC	15 cc	9	0	Grupo III	-	-

^a*E. coli* ATCC 25922 con sensibilidad a ampicilina, vancomicina y teicoplanina.

^bGrupos de tratamiento : Grupo I - control, Grupo II- antibiótico, Grupo III- antibiótico más adyuvante

^cSensibilidad de antibiograma Multisensible: ampicilina, vancomicina y teicoplanina.

UFC: Unidad formadora de colonias.

las ratas sobreviven tras la inyección intraperitoneal a pesar de la ausencia de tratamiento antibiótico. A continuación se estudia la posibilidad de aumentar el volumen de dilución a 10 ml utilizando la concentración más alta de 10¹⁰ UFC/ml. De las tres analizadas sólo una de ellas muere antes de las 24 horas. Finalmente se establece que el volumen óptimo para producir el 100% de las muertes en las primeras 6 horas del animal es de 15 ml (las tres ratas mueren tras la inyección intraperitoneal de dicha dilución) (tabla 1).

Ensayo terapéutico. Posteriormente determinada la concentración y la dilución óptima para provocar una peritonitis eficaz en el estudio piloto se realiza el ensayo terapéutico con la dilución de 15 ml de agua destilada en el grupo I (control), todas las ratas fallecen entre las 4 y 6 horas siguientes. En todas ellas se toman muestras de líquido peritoneal y sangre verificando que se encuentra una cepa de *E. coli* con idéntica sensibilidad antibiótica a la utilizada para la inoculación.

En el grupo II y III a la vez que se produce la inoculación, son tratadas con antibiótico. Se observa que sobreviven todas (18 ratas) excepto una, en la cual se verifica cepa de *E. coli* en el análisis de líquido peritoneal con similar sensibilidad en antibiograma.

Cuando el animal fallece dentro de las primeras 24 horas se realiza cultivo de líquido peritoneal. En todos los casos se observa el crecimiento de *E. coli* con idéntica sensibilidad antibiótica a la utilizada en la inoculación (tabla 1).

En la valoración histopatológica se observa formación de abscesos en la superficie del hígado, gran infiltración de polimorfonucleares (PMN) y colonias bacterianas (figura 2).

También se pueden observar PMN y abundantes colonias de *E. coli* en la superficie peritoneal.

DISCUSIÓN

Algunos autores recalcan la importancia de conseguir un modelo estandarizado en el que el proceso séptico se induzca de una forma fácil y reproducible. Estos mismos autores crean un modelo de peritonitis a partir de material fecal de origen humano. Las heces se recogen y procesan de manera protocolaria y son inyectadas intraperitonealmente en los animales [9]. Otro de los modelos probados es la colocación de "stent" en la pared del colon ascendente (colon ascendens stent peritonitis - CASP). Este resuelve uno de los problemas que pueden ocurrir con CLP, que es la formación de un absceso intraabdominal en lugar de un shock séptico por peritonitis. El CASP es un modelo relativamente nuevo y poco común de peritonitis difusa polimicrobiana que reproduce la clínica de una peritonitis aguda [10], además de alterar el flujo sanguíneo cecal con necrosis secundaria de la pared intestinal. La principal desventaja de CASP en comparación con CLP es su mayor complejidad.

El modelo desarrollado en este estudio parte de la referencia en la literatura de generar peritonitis mono microbiana con *E. coli*. Sanchez et al [11] describen dosis letales en ratas sanas, con cirrosis con y sin ascitis, aplicando inóculos de *E. coli* a diferentes concentraciones y diluciones en ratas sanas entre 180-230 gramos. Observan que la mortalidad a corto plazo en menos de 48 horas con un inóculo de 1 ml de *E. coli* con 10⁸ y 10⁹ UFC diluido en 20 ml de agua estéril (78% y 100% de *E. coli* respectivamente) aumentaba significativamente la mortalidad. Sin embargo observan que estas mismas dosis en ratas sanas con pesos de 450-500 gramos no presentan mortalidad. Esto les lleva a concluir que la mortalidad puede estar relacionada directamente con el volumen inyectado en cavidad peritoneal [12]. Estos mismos autores describen como las ratas con cirrosis sin ascitis muestran que la mortalidad a corto plazo dependía de la concentración de *E. coli* administrada, independiente-

mente del volumen administrado. Cuando las concentraciones son bajas de *E. coli* (10^7 UFC/ml), solo una rata fallece (1/13). Sin embargo cuando se inocula 10^8 UFC/ml de *E. coli* se observa que la mortalidad aumenta, pero significativamente menor a la producida con 10^9 UFC/ml (63% -23/37- vs 95% -35/37-; $p < 0,01$) [13]. Este modelo concuerda con lo encontrado por otros autores [12] y es similar a lo descrito en el modelo que presentamos.

En nuestro modelo se inocula inicialmente con 1 ml de *E. coli* con 10^8 , 10^9 y 10^{10} UFC, basándonos en que las concentraciones altas independientes del volumen eran suficientes para producir una sepsis sin mortalidad alguna. En segunda instancia se inocula una concentración de 10^{10} UFC, añadiendo un volumen de dilución de 10 y 15 ml de agua estéril para corroborar que tanto la concentración como el volumen son determinantes en el desarrollo de sepsis. Sin embargo, con estas premisas encontramos una mortalidad del 33% en las que recibieron 10 ml, mientras quienes reciben 15 ml fallecen 100% en menos de 6 horas. Esto coincide con lo descrito en la literatura, aunque en nuestro caso el volumen administrado es ligeramente inferior al utilizado en otros trabajos [11].

Finalmente al realizar el ensayo terapéutico se confirma que el 100% de las ratas control fallecen dentro de las primeras 6 horas por inoculación de *E. coli* al 10^{10} UFC diluidas en 15 ml.

Este modelo experimental mono bacteriano presenta ciertas ventajas y desventajas. Por una parte al conocer el germen, la cepa y la cantidad del inóculo que administramos, puede ser muy útil en el estudio de cambios fisiopatológicos de la sepsis, ya que somos capaces de controlar las condiciones bajo las que se produce. Algunos autores [13] afirman que este modelo en roedores es capaz de reproducir varios cambios característicos de la sepsis humana, pero su relevancia clínica está limitada por el hecho de que son necesarias elevadas concentraciones de bacterias en un modelo con un huésped incapaz de localizar la infección, a diferencia de lo que viene ocurriendo en humanos [14]. Además la mayoría de modelos infectan a ratas sanas, jóvenes y sin comorbilidades a diferencia de los humanos donde las poblaciones más vulnerables son los extremos de la vida con comorbilidades y donde el tratamiento de la sepsis es multidisciplinario incluyendo estrategias de nutrición, soporte ventilatorio, soporte hemodinámico, etc. Hasta el momento se han descrito muchos modelos de sepsis en experimentación animal, pero ninguno logra reproducir completamente la sepsis en humanos ya que se trata de un proceso heterogéneo, dependiente de la susceptibilidad genética de cada individuo y se acompaña de importantes comorbilidades y consumo de fármacos [13].

Las líneas de investigación se centran actualmente en el uso de ratones "humanizados". Se trata de ratones que son trasplantados con células madre hematopoyéticas humanas que llevan a cabo la respuesta inflamatoria [15, 16]. El principal inconveniente es que para obtener estos ratones el procedimiento es lento y de coste elevado. Otra forma de mejorar los modelos sería obtener ratones de más edad con/sin comorbilidades asociadas.

El modelo aquí descrito establece una dosis letal de *E. coli* de 10^{10} UFC diluida en 15 ml agua estéril. Tras una inyección intraperitoneal genera una infección eficaz, controlada y fácilmente reproducible que podría servir de base para la realización de futuras líneas de investigación.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran que no han recibido financiación para la realización de este trabajo.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ward PA. New approaches to the study of sepsis. *EMBO Mol Med* 2012;4:1234–43. doi:10.1002/emmm.201201375.
2. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991;99(1):169–7. doi:10.1378/chest.99.1.169.
3. Liu X, Wang N, Wei G, Fan S, Lu Y, Zhu Y, et al. Consistency and pathophysiological characterization of a rat polymicrobial sepsis model via the improved cecal ligation and puncture surgery. *Int Immunopharmacol* 2016;32:66–75. doi:10.1016/j.intimp.2015.12.041.
4. van der Heijden KM, van der Heijden IM, Galvao FH, Lopes CG, Costa SF, Abdala E, et al. Intestinal translocation of clinical isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and ESBL-producing *Escherichia coli* in a rat model of bacterial colonization and liver ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* 2014;9:e108453. doi:10.1371/journal.pone.0108453.
5. Martinez-G LA, Quintiliani R, Tilton RC. Clinical experience on the detection of endotoxemia with the limulus test. *J Infect Dis* 1973;127:102–5. doi:10.1093/infdis/127.1.102.
6. Perakash I, Satpati P, Agarwal KC, Chakravarti RN, Chhuttani PN. Prolonged peritoneal lavage in fecal peritonitis. *Surgery* 1970;68:842–5.
7. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 2011;19:198–208. doi:10.1016/j.tim.2011.01.001.
8. Fink MP. Animal models of sepsis. *Virulence* 2014;5:143–53. doi:10.4161/viru.26083.
9. Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, et al. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res* 2011;170. doi:10.1016/j.jss.2011.05.019.
10. Traeger T, Koerner P, Kessler W, Cziupka K, Diedrich S, Busemann A, et al. Colon ascendens stent peritonitis (CASP)—a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp* 2010. doi:10.3791/2299.

11. Sánchez E, Such J, Teresa Chiva M, Soriano G, Llovet T, Mercè J, et al. Development of an experimental model of induced bacterial peritonitis in cirrhotic rats with or without ascites. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1230–6. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01182.x.
12. Dunn DL, Barke RA, Ahrenholz DH, Humphrey EW, Simmons RL. The adjuvant effect of peritoneal fluid in experimental peritonitis. Mechanism and clinical implications. *Ann Surg* 1984;199:37–43. doi:10.1097/0000658-198401000-00007.
13. van der Poll T. Preclinical sepsis models. *Surg Infect (Larchmt)* 2012;13:287–92. doi:10.1089/sur.2012.105.
14. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980;29:189–201. doi:10.1016/0022-4804(80)90037-2.
15. Skirecki T, Drechsler S, Hoser G, Jafarmadar M, Siennicka K, Pojda Z, et al. The fluctuations of leukocytes and circulating cytokines in septic humanized mice vary with outcome. *Front Immunol* 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.01427.
16. Laudanski K, Stentz M, Dimeglio M, Furey W, Steinberg T, Patel A. Potential Pitfalls of the Humanized Mice in Modeling Sepsis. *Int J Inflam* 2018; 2018:6563454. doi:10.1155/2018/6563454.