

# Мышиные модели пневмококкового сепсиса, вызываемого вирулентным и авирулентным штаммами *Streptococcus pneumoniae*

А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, Е.С.Перескокова, Е.А.Ганина

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Разработаны две модели острого сепсиса у мышей линии BALB/c, вызываемого вирулентным и авирулентным штаммами пневмококка. Внутривентральное заражение модельных животных культурой штамма *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 (вирулентный) в дозе 30 LD<sub>50</sub> вызывает 100%-ю гибель. Авирулентный штамм *S. pneumoniae* M17 также приводит к летальному исходу инфекции при внутривентральном заражении мышей в количестве 30 LD<sub>50</sub> в 2,5%-м растворе муцина. После заражения мышей штаммом M17 клетки бактерий в течение нескольких часов проникали в органы брюшной полости, легкие и головной мозг, вызывая в них патологические изменения воспалительно-некротического характера. Антибиотикотерапия пневмококкового сепсиса, вызванного обоими штаммами, продемонстрировала пригодность разработанных моделей. Экспериментальная пневмококковая инфекция поддается лечению антибиотиками, активными *in vitro* в отношении этих тест-штаммов. Пятидневное введение инфицированным мышам ампициллина (400 мг/кг/сутки) или левофлоксацина (120 мг/кг/сутки) обеспечивает 100%-ю выживаемость и санацию организма мышей от клеток пневмококка. Обе модели острой генерализованной инфекции, вызываемой штаммами ATCC 6305 и M17, являются удобным и наглядным инструментом для оценки эффективности *in vivo* антибактериальных препаратов различной природы.

**Ключевые слова:** *Streptococcus pneumoniae*, пневмококковая инфекция, мышиная модель, сепсис, экспериментальное лечение

**Для цитирования:** Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Перескокова Е.С., Ганина Е.А. Мышиные модели пневмококкового сепсиса, вызываемого вирулентным и авирулентным штаммами *Streptococcus pneumoniae*. Бактериология. 2023; 8(1): 7–16. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-7-16

## Mouse models of pneumococcus sepsis caused by virulent and avirulent strains of *Streptococcus pneumoniae*

A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, E.S.Pereskokova, E.A.Ganina

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Two models of acute sepsis in BALB/c mice caused by virulent and avirulent strains of pneumococcus have been developed. Intraperitoneal infection of model animals with a culture of the strain *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 (virulent) at a dose of 30 LD<sub>50</sub> causes 100% death. The avirulent strain of *S. pneumoniae* M17 also leads to a lethal outcome of the infection when mice are infected intraperitoneally in an amount of 30 LD<sub>50</sub> in a 2.5% mucin solution. After infecting mice by the M17 strain, bacterial cells penetrated into the abdominal organs, lungs and brain within several hours, causing pathological changes of an inflammatory-necrotic nature in them. Antibiotic therapy of pneumococcal sepsis caused by both strains demonstrated the suitability of the developed models. Experimental pneumococcal infection is treatable by antibiotics active *in vitro* against these test strains. A five-day administration of ampicillin (400 mg/kg/day) or levofloxacin (120 mg/kg/day) to infected mice provides 100% survival and sanitation of mice from pneumococcal cells. Both models of acute generalized infection caused by strains ATCC 6305 and M17 are a convenient and illustrative tool for evaluating the *in vivo* efficacy of antibacterial drugs of various nature.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, pneumococcal infection, mouse model, sepsis, experimental treatment

**For citation:** Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., Pereskokova E.S., Ganina E.A. Mouse models of pneumococcus sepsis caused by virulent and avirulent strains of *Streptococcus pneumoniae*. Bacteriology. 2023; 8(1): 7–16. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-7-16

### Для корреспонденции:

Борзилов Александр Иосифович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
Телефон: (4967) 36-0147

Статья поступила 29.03.2023, принята к печати 28.04.2023

### For correspondence:

Alexander I. Borzilov, MD, PhD, Leading Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0147

The article was received 29.03.2023, accepted for publication 28.04.2023

**S**treptococcus pneumoniae, или пневмококки, представляют собой грамположительные каталазо- и оксидазо-отрицательные мелкие шаровидные или ланцетовидной формы бактерии, являющиеся факультативными анаэробами [1]. Они условно-патогенны для человека и представляют серьезную проблему для общественного здравоохранения во всем мире [2, 3]. Наиболее часто пневмококковая инфекция поражает детей и пожилых людей. Инвазивные формы инфекции, такие как бактериемия, менингит и пневмония, часто становятся причиной смерти людей [4, 5].

Основываясь на различиях в составе полисахаридных капсул, на сегодняшний день идентифицировано около 100 различных серотипов *S. pneumoniae* [2, 6]. Однако заболевания у человека вызывают лишь несколько серотипов, которые могут изменяться с течением времени, в зависимости от возрастной группы и географического региона [2, 7]. Вирулентность *S. pneumoniae* также связана с наличием полисахаридной капсулы, обеспечивающей антифагоцитарную активность. Среди других факторов патогенности у пневмококков отмечают протеин адгезии, протеазы секреторного IgA, тейхоевой кислоты и фрагменты пептидогликана, активизирующие комплемент по альтернативному типу [1, 2].

Основной путь передачи пневмококка от человека человеку – воздушно-капельный. Входными воротами пневмококковой инфекции является носоглотка, которую колонизируют бактерии *S. pneumoniae* [2, 8]. Колонизируя слизистую носоглотки, пневмококк может вызывать местные воспаления (синусит, отит) или, распространяясь кровотоком по организму человека, приводить к более серьезным проявлениям – бактериемии, пневмонии и менингиту [2, 9].

Бактерии *S. pneumoniae* имеют природную устойчивость к азтреонаму, теомоциллину, полимиксину В, налидиксовой кислоте, фузидиевой кислоте и аминогликозидам [1]. Лечение пневмококковой инфекции у людей нередко затруднено из-за циркуляции штаммов, обладающих полирезистентностью к лекарственным препаратам. С другой стороны, некоторые авторы отмечают чувствительность 90–100% изолятов *S. pneumoniae* к амоксициллину и к амоксициллину с клавулановой кислотой, а также к ципрофлоксацину [10], моксифлоксацину и ванкомицину [11]. Однако с каждым годом доля антибиотикочувствительных штаммов пневмококка уменьшается [11].

Для изучения патогенеза пневмококковой инфекции, факторов патогенности пневмококков, оценки эффективности средств специфической профилактики и этиологического лечения используют различные виды лабораторных животных – мышей, крыс, морских свинок, кроликов, нечеловекообразных обезьян [12]. Наиболее популярная животная модель пневмококковой инфекции – мышьяная. Линейные мыши (BALB/c, C57BL/6, DBA и CBA) применяются для воспроизведения пневмококковой пневмонии [13], сепсиса [14], менингита [15] и среднего отита [16]. Для этих же целей используют и аутбредных мышей, таких как MF1, CD-1 (Swiss), Swiss-Webster, NMRI [16–20]. Иногда для повышения чувствительности мышей к пневмококковой инфекции применяют нокаутных иммунодефицитных мышей, таких как CBA/N [20, 21], или аутбредных мышей с индуцированным иммунодефицитом [20].

Пневмококковую инфекцию индуцируют у мышей с помощью лабораторных и клинических штаммов *S. pneumoniae*

определенных серотипов. Так, например, сепсис у мышей воспроизводят с помощью штаммов пневмококка, относящихся к серотипу 3 [20–22], пневмонию – с использованием штаммов серотипов 3, 6, 9 и 16 [20, 22–24]. Штаммы серотипов 3 и 6 успешно применяют для моделирования пневмококкового менингита [25, 26].

Экспериментальный пневмококковый сепсис может вызываться внутривенным или внутрибрюшинным введением мышам культуры *S. pneumoniae*. Второй способ приводит к вторичному сепсису на фоне развивающегося перитонита. Мышиная модель септической пневмококковой инфекции является одной из наиболее применяемых. Следует отметить, что некоторые штаммы *S. pneumoniae* при внутрибрюшинном способе заражения вызывают гибель мышей, тогда как при внутривенном введении эти же культуры оказывались авирулентными [21, 27].

Начиная с 1980-х гг. внутривенную модель пневмококкового сепсиса у мышей активно применяют для изучения антительного ответа [28], факторов патогенности *S. pneumoniae* [18, 19, 29], для исследования эффективности пневмококковых вакцин [30, 31], комплексного ответа макроорганизма на инфекцию [20], для оценки активности *in vivo* антибактериальных препаратов (в том числе фаговых лизинов) [32]. Внутрибрюшинное заражение также давно и широко используется для индукции генерализованной пневмококковой инфекции у мышей. Эта модель хорошо себя зарекомендовала при изучении факторов вирулентности [33], исследовании роли цитокинов в развитии сепсиса [34], разработке перспективных вакцин [35], тестировании антибиотиков [36].

В наших исследованиях мы разработали две модели острого летального сепсиса и легочной пневмококковой инфекции у мышей линии BALB/c, пригодные для оценки эффективности *in vivo* антибактериальных препаратов. Обе модели являются летальными, но поддаются лечению препаратами, высокоактивными *in vitro* в отношении штаммов пневмококка.

## Материалы и методы

### Бактериальные культуры

Для моделирования пневмококкового сепсиса использовали два штамма *S. pneumoniae* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Штамм ATCC 6305 (Инв. № В-7398) относится к серогруппе 5 и обладает высокой вирулентностью в отношении иммунокомпетентных мышей BALB/c при внутрибрюшинном введении ( $LD_{50} = 10$  КОЕ). Штамм M17 (Инв. № В-9931) принадлежит серогруппе 20 и является авирулентным ( $LD_{50} > 10^6$  КОЕ) для этих животных. Обе культуры пневмококка чувствительны к эритромицину, кларитромицину, азитромицину, линкомицину, клиндомицину, тетрациклину, левофлоксацину, спарфлоксацину, моксифлоксацину, гатифлоксацину, ванкомицину, рифампицину, хлорамфениколу и линезолиду. Минимальные подавляющие концентрации цефотаксима составляют 0,008 мкг/мл, ампициллина – <0,008 мкг/мл, меропенема – <0,004 мкг/мл, кларитромицина – <0,004 мкг/мл, левофлоксацина – 0,5 мкг/мл, ванкомицина – 0,063 мкг/мл, хлорамфеникола – 2–4 мкг/мл.

#### *Питательные среды, антибиотики*

Для выращивания культур *S. pneumoniae* использовали триптон-соевый агар (ТСА) (ФБУН ГНЦПМБ, Россия) с добавлением 5 дефибринированной крови и 0,1% глюкозы, а также шоколадный агар с ростовой добавкой (ФБУН ГНЦПМБ, Россия). Гомогенаты внутренних органов мышей и кровь высевали на ТСА (ФБУН ГНЦПМБ, Россия) с добавлением 5% гемолизированной крови и 0,1% глюкозы, а также шоколадный агар с селективной и ростовой добавками (ФБУН ГНЦПМБ, Россия).

Ампициллина натриевую соль (Pan Reac Appli Chem, Испания) и левофлоксацина гемигидрат (Dr. Reddy's, Индия) использовали для лечения экспериментальной пневмококковой инфекции у мышей.

#### *Лабораторные животные*

Для экспериментов *in vivo* использовали мышей линии BALB/c (самцы/самки, 16–19 г). Животных содержали в поликарбонатных клетках (Lab Products Inc., США) в помещениях со стандартными условиями микроклимата. Мыши имели постоянный доступ к воде и корму (ООО «Лабораторкорм»). Мышей содержали группами не более 6 животных в каждой и проводили за ними ежедневное ветеринарное наблюдение. Умерших в процессе эксперимента мышей удаляли из клеток по мере обнаружения.

#### *Заражение лабораторных животных*

Бактериальную взвесь для инфицирования животных готовили из ночной агаровой культуры. Выросшие культуры суспендировали в физиологическом растворе (0,85%-й хлорид натрия). Взвеси доводили до плотности 3,8 по стандарту оптической мутности (по МакФарланду), что приблизительно соответствует  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл. Затем делали последовательные разведения суспензий до достижения необходимой концентрации бактерий. Культуры вводили мышам внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. Для инъекций использовали инсулиновые шприцы с иглой диаметром 26–28 G. Контроль количества клеток во взвеси осуществляли путем посева по 0,1 мл из соответствующих разведений исходной взвеси на ТСА с добавлением 5% гемолизированной крови и 0,1% глюкозы. Посевы инкубировали в течение 24 ч при температуре 36,5°C.

#### *Изучение динамики развития пневмококкового сепсиса*

Для моделирования пневмококкового сепсиса культуру *S. pneumoniae* ATCC 6305 вводили внутрибрюшинно мышам линии BALB/c в дозе 30 LD<sub>50</sub> ( $3 \times 10^2$  КОЕ). Штамм M17 вводили мышам в растворе 2,5%-го муцина в количестве 30 LD<sub>50</sub> ( $1,2 \times 10^4$  КОЕ).

Динамику развития летальной пневмококковой инфекции у мышей оценивали по степени специфической бактериальной обсемененности паренхиматозных органов и уровню бактериемии через 1,5, 3, 6, 12 и 24 ч после внутрибрюшинного заражения. В каждый временной интервал по 5 животных эвтаназируют и отбирали селезенку, легкие, почки, мозг и кровь для проведения количественного бактериологического анализа. Для выявления клеток пневмококка в гомогенатах органов и крови использовали плотную питательную среду для выделения пневмококков из цельных суспензий –

шоколадный агар с селективной и ростовой добавками. Десятикратные разведения высевали на ТСА с добавлением 5% гемолизированной крови и 0,1% глюкозы. Посевы инкубировали при температуре 36,5°C в течение 24–48 ч.

Для выявления функциональных и морфологических изменений внутренних органов в процессе развития генерализованной пневмококковой инфекции через 24 ч после инфицирования делали общий и биохимический анализ крови экспериментальных животных. В это же время проводили гистологическое исследование органов мышей (селезенки, легких, печени, мозга, регионарных лимфатических узлов и тимуса).

#### *Клинический анализ крови*

Общий анализ крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе PCE-90Vet (High Technology, США) в соответствии с руководством по использованию прибора. Для сбора крови применяли микропробирки с K2-ЭДТА. Исследовали индивидуальные образцы крови от 5 животных в группе.

#### *Биохимический анализ крови*

Уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатамино-трансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), общего белка, глюкозы и креатинина в сыворотках крови мышей определяли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе StatFax-3300 (Awareness Technology, США) с использованием реактивов UTS (ООО «Юнимед», Россия). Для анализа использовали индивидуальные сыворотки крови от 5 подопытных мышей.

#### *Бактериологический анализ органов*

Животных эвтаназируют методом декапитации, а затем вскрывали для получения образцов органов. Селезенку, почки, легкие и головной мозг мышей растирали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением кварцевого песка. В гомогенаты добавляли 1 мл стерильного физиологического раствора и перемешивали до получения однородной суспензии. Полученные суспензии (цельные и их десятикратные разведения) высевали на поверхность питательного агара. Для выявления культуры пневмококка использовали шоколадный агар с селективной и ростовой добавками и ТСА с добавлением 5% гемолизированной крови и 0,1% глюкозы. Посевы инкубировали при температуре 36,5°C в течение 18–24 ч.

#### *Гистологическое исследование органов и тканей*

Гистологическое исследование проводили через 24 ч после внутрибрюшинного заражения (на пике сепсиса). В качестве контролей использовали интактных мышей линии BALB/c. После эвтаназии у животных препарировали селезенку, легкие, печень, головной мозг, регионарные лимфатические узлы и тимус.

Полученные образцы помещали во флакон с 50 мл 4%-го раствора параформа. Через 24 ч экспозиции раствор параформа заменяли свежей порцией. Исследованию подвергали гистологические срезы органов, окрашенные гематоксилином и эозином по стандартной методике. Анализ гистологических препаратов проводили с использованием микроскопа

Nikon Elipse 80i и программы анализа изображения NIS Elements F4.60.00. Определяли наличие признаков воспалительно-некротических изменений в исследуемых образцах.

**Антибиотикотерапия летального пневмококкового сепсиса**

Пригодность разработанной модели пневмококковой инфекции оценивали в экспериментах по антибиотикотерапии. В качестве антибактериальных препаратов использовали ампициллин и левофлоксацин, активные *in vitro* против тест-штаммов пневмококка.

Сепсис вызывали у интактных мышей линии BALB/c, заражая их внутрибрюшинно летальной дозой (30 LD<sub>50</sub>) штамма *S. pneumoniae* ATCC 6305 или штамма *S. pneumoniae* M17 (с муцином). После инфицирования животные были рандомизированы на 4 лечебные и 1 контрольную группы по 10 особей в каждой. Мышей из 1-й и 2-й групп лечили ампициллином (200 мг/кг) 2 раза в день подкожно. Терапию начинали через 3 ч (экстренное лечение) и 12 ч (позднее лечение) соответственно и продолжали в течение 5 дней. Мыши из 3-й и 4-й групп получали подкожно левофлоксацин (60 мг/кг) дважды в день. Продолжительность лечения составляла 5 дней. Начало лечения – через 3 и 12 ч после заражения соответственно. Группа 5 являлась контрольной и не получала антибактериальных препаратов. Срок наблюдения за мышами – 14 суток. Эффективность антибиотикотерапии оценивали по выживаемости и степени санации организма выживших животных от культуры соответствующего тест-штамма.

**Статистические методы**

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.

**Результаты и обсуждение**

**Модель летального пневмококкового сепсиса у мышей**

Внутрибрюшинное заражение мышей линии BALB/c культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305 или *S. pneumoniae* M17 (с муцином) в дозе 30 LD<sub>50</sub> вызывает быстрое развитие сепсиса и 100%-ю гибель животных в течение 2–5 суток.

**Результаты бактериологического анализа**

Через 3 ч после инфицирования клетки пневмококка не обнаруживались ни в крови, ни в паренхиматозных органах, ни в головном мозге животных (табл. 1). Через 6 ч культура штамма ATCC 6305 появлялась в небольших количествах в крови, селезенке и почках большинства животных. Затем сепсис нарастал, и к 12-му часу инфекции концентрация клеток патогена в крови, селезенке и почках достигала высоких значений. В это же время пневмококки уже обнаруживались в легких и головном мозге зараженных животных. Через сутки после инфицирования пневмококковая инвазия селезенки, легких и почек достигала своего максимума. Приблизительно на 2 порядка увеличивалась концентрация бактерий *S. pneumoniae* ATCC 6305 в головном мозге и крови мышей линии BALB/c.

Авирулентный штамм *S. pneumoniae* M17 также вызывал быструю генерализацию пневмококковой инфекции у мышей линии BALB/c. Уже через 3 ч после внутрибрюшинного введения культуры в растворе муцина пневмококки обнаруживались в крови, почках и селезенке всех инфицированных мышей (табл. 2). По прошествии 6 ч бактерии *S. pneumoniae* M17 проникали в легкие и головной мозг. В это же время значительно повышался уровень обсемененности органов, нарастала бактериемия. Через 24 ч сепсис достигал своего

Таблица 1. Обсемененность селезенки, легких, головного мозга, почек и крови мышей линии BALB/c бактериями *S. pneumoniae* ATCC 6305 в различные сроки острой пневмококковой инфекции, обусловленной внутрибрюшинным заражением в дозе 30 LD<sub>50</sub>

| Время после заражения, ч | LOG10 КОЕ/г (мл)  |                   |                   |                   |                   |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                          | селезенка         | легкое            | головной мозг     | почки             | кровь             |
| 1,5                      | <1                | <1                | <1                | <1                | <1,1              |
| 3                        | <1                | <1                | <1                | <1                | <1,1              |
| 6                        | 3,10 ± 0,50 (5/5) | <1                | <1                | 2,27 ± 0,34 (3/5) | 2,74 ± 1,00 (5/5) |
| 12                       | 4,91 ± 0,49 (5/5) | 4,72 ± 0,37 (5/5) | 2,95 ± 0,39 (3/5) | 4,42 ± 0,54 (5/5) | 4,79 ± 0,41 (5/5) |
| 24                       | 7,52 ± 0,41 (5/5) | 6,78 ± 0,43 (5/5) | 4,52 ± 0,46 (5/5) | 7,04 ± 0,44 (5/5) | 6,27 ± 0,36 (5/5) |

Представлены средние значения и стандартные отклонения (n = 5); в дробях указано соотношение количества животных, у которых была выявлена культура *S. pneumoniae* ATCC 6305, к общему количеству животных в группе.

Таблица 2. Обсемененность селезенки, легких, головного мозга, почек и крови мышей линии BALB/c бактериями *S. pneumoniae* M17 в различные сроки острой пневмококковой инфекции, обусловленной внутрибрюшинным заражением в дозе 30 LD<sub>50</sub>

| Время после заражения, ч | LOG10 КОЕ/г (мл)  |                   |                   |                   |                   |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                          | селезенка         | легкое            | головной мозг     | почки             | кровь             |
| 1,5                      | <1                | <1                | <1                | <1                | <1,1              |
| 3                        | 3,90 ± 0,20 (5/5) | <1                | <1                | 3,61 ± 0,20 (5/5) | 3,33 ± 0,18 (5/5) |
| 6                        | 5,92 ± 0,19 (5/5) | 4,17 ± 0,38 (5/5) | 3,55 ± 0,19 (5/5) | 6,05 ± 0,38 (3/5) | 5,49 ± 0,32 (5/5) |
| 12                       | 7,93 ± 0,19 (5/5) | 5,62 ± 0,55 (5/5) | 5,94 ± 0,60 (3/5) | 7,58 ± 0,35 (5/5) | 7,93 ± 0,54 (5/5) |
| 24                       | 7,73 ± 0,60 (5/5) | 5,89 ± 0,17 (5/5) | 6,21 ± 0,72 (5/5) | 7,64 ± 0,64 (5/5) | 7,98 ± 0,64 (5/5) |

Представлены средние значения и стандартные отклонения (n = 5); в дробях указано соотношение количества животных, у которых была выявлена культура *S. pneumoniae* M17, к общему количеству животных в группе.

Таблица 3. Результаты клинического анализа крови мышей BALB/c, сделанного через 24 ч после внутрибрюшинного введения 30 LD<sub>50</sub> культур *S. pneumoniae*

| Показатель  | Ед. измерения        | Контроль      | <i>S. pneumoniae</i><br>ATCC 6305 | <i>p</i> -value* | Контроль      | <i>S. pneumoniae</i><br>M17 | <i>p</i> -value* |
|-------------|----------------------|---------------|-----------------------------------|------------------|---------------|-----------------------------|------------------|
| Лейкоциты   | ×10 <sup>9</sup> /л  | 4,6 ± 1,1     | <b>1,8 ± 1,0</b>                  | <0,003           | 7,8 ± 1,1     | <b>2,7 ± 1,2</b>            | <0,002           |
| Лимфоциты   | ×10 <sup>9</sup> /л  | 2,6 ± 1,0     | <b>0,7 ± 0,5</b>                  | <0,02            | 5,7 ± 0,6     | <b>1,9 ± 0,9</b>            | <0,0003          |
| Моноциты    | ×10 <sup>9</sup> /л  | 0,2 ± 0,1     | 0,1 ± 0,0                         | >0,05            | 0,3 ± 0,1     | <b>0,1 ± 0,1</b>            | <0,009           |
| Гранулоциты | ×10 <sup>9</sup> /л  | 1,8 ± 0,7     | 1,0 ± 0,6                         | >0,05            | 1,8 ± 0,5     | <b>0,8 ± 0,7</b>            | <0,04            |
| Лимфоциты   | %                    | 54,7 ± 16,2   | 39,0 ± 8,6                        | >0,05            | 73,2 ± 3,4    | 71,9 ± 19,5                 | >0,05            |
| Моноциты    | %                    | 5,1 ± 2,3     | 6,3 ± 2,0                         | >0,05            | 3,4 ± 0,1     | 2,6 ± 1,3                   | >0,05            |
| Гранулоциты | %                    | 40,2 ± 14,0   | 54,8 ± 8,0                        | >0,05            | 23,4 ± 3,3    | 25,5 ± 18,7                 | >0,05            |
| Эритроциты  | ×10 <sup>12</sup> /л | 7,58 ± 1,60   | <b>9,89 ± 0,47</b>                | <0,03            | 8,36 ± 0,18   | <b>9,16 ± 0,58</b>          | <0,02            |
| Гемоглобин  | г/л                  | 105 ± 24      | <b>144 ± 12</b>                   | <0,02            | 128 ± 4       | 135 ± 8                     | >0,05            |
| Гематокрит  | %                    | 34,8 ± 6,1    | <b>45,9 ± 4,2</b>                 | <0,02            | 39,0 ± 0,3    | 41,0 ± 2,3                  | >0,05            |
| Тромбоциты  | ×10 <sup>9</sup> /л  | 616 ± 133     | <b>323 ± 108</b>                  | <0,006           | 612 ± 166     | <b>220 ± 45</b>             | <0,006           |
| Тромбокрит  | %                    | 0,258 ± 0,045 | <b>0,147 ± 0,052</b>              | <0,008           | 0,278 ± 0,163 | <b>0,119 ± 0,024</b>        | <0,008           |

Представлены средние значения и стандартные отклонения (*n* = 5); \* уровень значимости отличий от контроля для выбранной временной точки; жирным шрифтом указаны значения, статистически значимо отличающиеся от контроля; все сравнения проводили по двустороннему *t*-критерию Стьюдента.

пика: концентрация *S. pneumoniae* M17 в них была максимальной.

#### Результаты общего анализа крови

Общий анализ крови мышей, зараженных штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305, показал, что через сутки у мышей развивается лейкоцитопения и лимфоцитопения. Общее количество лейкоцитов и лимфоцитов достоверно снижалось по сравнению с контрольной группой неинфицированных животных (табл. 3). В то же время наблюдалось повышение концентрации эритроцитов в крови и увеличение гематокрита. Среди других статистически значимых (*p* < 0,008) изменений у инфицированных животных следует отметить почти двукратное снижение уровня тромбоцитов и, как следствие, понижение тромбокрита.

В случае штамма *S. pneumoniae* M17 инфекция также вызывала у мышей существенное снижение количества клеток белой крови – лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов – по сравнению с контролем (табл. 3). В то же время наблюдалось достоверное повышение количества эритроци-

тов и уменьшение концентрации тромбоцитов. Других заметных изменений в формуле крови инфицированных животных не было выявлено.

#### Результаты биохимического анализа крови

Биохимический анализ сывороток крови мышей, инфицированных внутрибрюшинно культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305, проведенный через 24 ч после заражения, выявил значительное повышение уровня общего белка и креатинина по сравнению с контрольными мышами. Кроме того, было замечено незначительное повышение уровня АСТ. С другой стороны, у животных в 1,5–1,7 раза снижалось содержание глюкозы, АЛТ и ЩФ.

Для штамма *S. pneumoniae* M17 было характерным снижение в 3 раза по сравнению с контролем уровня глюкозы и некоторое уменьшение количества общего белка. В 3,7 и 3,1 раза по сравнению с интактным контролем повышалось содержание АСТ и АЛТ. Показатели уровня креатинина и ЩФ оставались на уровне контроля (табл. 4).

#### Данные гистологических исследований

Через 24 ч после внутрибрюшинного заражения мышей штаммами *S. pneumoniae* ATCC 6305 и *S. pneumoniae* M17 в дозе 30 LD<sub>50</sub> было проведено гистологическое исследование внутренних органов мышей (паховые лимфатические узлы, селезенка, тимус, печень, почки, легкие, головной мозг) с целью выявления патоморфологических изменений.

#### Штамм *S. pneumoniae* ATCC 6305

Микроскопические изменения в паховых лимфатических узлах мышей линии BALB/c, инфицированных *S. pneumoniae* ATCC 6305, ограничены корковой зоной. Отмечается уменьшение ширины корковой зоны, в которой снижено количество лимфоцитов, а также уменьшение величины лимфатических фолликулов. В середине фолликулов, на месте центров размножения, сохраняются преимущественно клетки ретикуло-макрофагальной стромы, лимфоциты исчезают. Некоторое количество лимфоцитов разрушилось с образованием скоплений апоптозных тел. Мозговая зона занимает

Таблица 4. Результаты биохимического анализа крови мышей BALB/c, сделанные через 24 ч после внутрибрюшинного введения 30 LD<sub>50</sub> культур *S. pneumoniae*

| Показатель              | Контроль      | <i>S. pneumoniae</i><br>ATCC 6305 | Контроль     | <i>S. pneumoniae</i><br>M17 |
|-------------------------|---------------|-----------------------------------|--------------|-----------------------------|
| Общий белок, г/л        | 77,8 ± 7,4    | <b>103,6 ± 1,1</b>                | 81,1 ± 5,7   | 73,9 ± 3,1                  |
| Г л у к о з а , ммоль/л | 4,02 ± 0,59   | <b>2,61 ± 0,50</b>                | 7,23 ± 0,62  | <b>2,27 ± 0,31</b>          |
| АСТ, МЕ/л               | 131,1 ± 22,2  | <b>166,7 ± 7,9</b>                | 169,4 ± 2,8  | <b>631,7 ± 25,6</b>         |
| АЛТ, МЕ/л               | 46,2 ± 6,7    | <b>28,5 ± 9,4</b>                 | 40,0 ± 9,9   | <b>126,3 ± 58,1</b>         |
| Креатинин, мкмоль/л     | 36,5 ± 0,4    | <b>181,7 ± 2,1</b>                | 41,9 ± 0,9   | 44,1 ± 5,4                  |
| ЩФ, МЕ/л                | 408,9 ± 105,7 | <b>244,5 ± 1,4</b>                | 358,0 ± 57,0 | 326,8 ± 72,8                |

Представлены средние значения и стандартные отклонения (*n* = 5); жирным шрифтом указаны значения, статистически значимо отличающиеся от контроля; все сравнения проводили по двустороннему *t*-критерию Стьюдента.

основную площадь лимфатических узлов и плотно заполнена лимфоцитами.

В селезенке мышей белая пульпа состоит из множества крупных лимфатических фолликулов, в которых отсутствует маргинальная (краевая) зона и образуется заметная граница с красной пульпой в виде светлой полосы, состоящей из клеток ретикуло-макрофагальной стромы без инфильтрации лимфоцитами. Красная пульпа гиперемирована, содержит множество эритроцитов. В синусоидах красной пульпы имеется большое количество базофильно окрашенных частиц разной величины, образующихся в результате массовой гибели ядродержащих клеток. Среди погибших клеток определяются единичные лимфоциты.

У инфицированных мышей, как и у интактных животных, в дольках тимуса сохраняется разделение на корковую зону с большим количеством лимфоцитов и мозговую зону – с меньшим количеством лимфоцитов. В корковой зоне тимуса выявлены патологические изменения, которые выражаются в массовой гибели лимфоцитов с образованием мелкоочаговых скоплений апоптозных тел среди плотно расположенных лимфоцитов.

В паренхиме печени инфицированных мышей встречаются обширные участки, состоящие из гепатоцитов с признаками дегенерации. Ядра гепатоцитов сжаты, имеют значительно меньшую величину, чем в клетках паренхимы, окружающей очаг. Изменяется окраска цитоплазмы клеток, уменьшается их размер. Выявлена патология в кровеносной системе печени: на срезах вен видны обширные тромбы, которые обнаруживаются внутри некротических участков в паренхиме.

#### Штамм *S. pneumoniae* M17

При микроскопии гистологических срезов лимфатических узлов мышей, зараженных культурой *S. pneumoniae* M17, было обнаружено, что основная площадь узлов представлена клетками ретикуло-макрофагальной стромы. Лимфоциты сохраняются в виде узких малоклеточных тяжей между клетками стромы. Лимфатические фолликулы отсутствуют.

В селезенке мышей отмечается резкая гиперемия красной пульпы. В синусах красной пульпы преобладают эритроциты. Имеется небольшое количество лимфоцитов и нейтрофилов и некоторое количество базофильно окрашенного некротического субстрата. Белая пульпа занимает большую площадь. Центры размножения не выражены. По всей площади белой пульпы обнаруживаются небольшие очаги из погибших клеток в виде скоплений апоптозных тел.

Через сутки после заражения культурой *S. pneumoniae* M17 у мышей значительно уменьшался размер тимуса по сравнению с интактными мышами. Микроскопическое исследование показало, что в дольках тимуса корковая зона – место пролиферации тимоцитов – заметно уменьшена и сохраняется в виде узкой полосы по краю долек. В области корковой зоны имеется скопление апоптозных тел, что указывает на гибель лимфоцитов в тимусе.

В печени выявлены обширные очаги некроза, которые не имеют отчетливой границы и постепенно переходят в окружающую паренхиму из гепатоцитов, имеющих нормальное строение. Некротизированная ткань состоит из лизированных клеток: границы клеток и ядер не определяются. В некоторых клетках сохраняются измененные мелкие ядра на фоне разрушенной цитоплазмы.

В почках, легких и головном мозге мышей, инфицированных тест-штаммами пневмококка, не выявлено микроскопических отклонений от нормы.

#### **Антибиотикотерапия экспериментального пневмококкового сепсиса**

Пригодность разработанных нами моделей пневмококкового сепсиса у мышей BALB/c, обусловленного *S. pneumoniae* ATCC 6305 и *S. pneumoniae* M17, оценивали в экспериментах по его лечению. Летальную пневмококковую инфекцию моделировали на мышах линии BALB/c, которых заражали внутрибрюшинно тест-штаммами в дозе 30 LD<sub>50</sub>. В качестве антибактериальных препаратов для лечения летального сепсиса использовали высоко активные *in vitro* против этих бактерий ампициллин (минимальная подавляющая концентрация (МПК) <0,008 мкг/мл) и левофлоксацин (МПК 0,5 мкг/мл).

Результаты антибиотикотерапии показали высокую активность ампициллина и левофлоксацина как при раннем начале лечения (через 3 ч после заражения), когда сепсис еще не развился, так и в случае позднего начала (через 12 ч после заражения), когда генерализация инфекции достигала высокого уровня. Все мыши, инфицированные штаммом ATCC 6305 и получавшие в ампициллин или левофлоксацин, оставались живыми в течение 14 суток после заражения. 100% контрольных животных (без лечения) пали в течение 4 суток после заражения, причем 9 из 10 умерли на 2-е сутки.

Из внутренних органов всех павших мышей была выделена культура патогена – *S. pneumoniae* ATCC 6305. По данным бактериологического анализа внутренних органов и крови все выжившие мыши не были носителями пневмококковой инфекции, то есть были полностью санированы от клеток тест-штамма.

Аналогичные результаты были получены в результате антибиотикотерапии пневмококковой инфекции у мышей BALB/c, вызванной внутрибрюшинным введением авирулентного штамма *S. pneumoniae* M17 в растворе муцина. Пятидневный курс лечения ампициллином или левофлоксацином независимо от срока начала терапии защищал от гибели всех инфицированных животных. Следует отметить, что выжившие мыши не были носителями *S. pneumoniae* M17. В то же время все животные из контрольной группы погибали в период со 2-х по 12-е сутки, а 70% из них умерли через 2 дня после заражения. Бактериологический анализ внутренних органов всех павших мышей выявил наличие культуры тест-штамма.

Для оценки эффективности различных препаратов, предназначенных для профилактики и лечения бактериальных инфекций, важно иметь работоспособные и воспроизводимые животные модели. Особенно удобными и наглядными являются летальные экспериментальные инфекции, поскольку позволяют получить наиболее убедительную информацию о терапевтическом действии препаратов по показателям выживаемости и санации организма модельных животных от возбудителя экспериментальной инфекции. Среди лабораторных животных чаще других используются мыши, благодаря их относительно невысокой стоимости и доступности. В своих исследованиях мы также с успехом использо-

вали мышинные модели экспериментального сепсиса различной этиологии [37–42].

В данной статье описаны модели острого пневмококкового сепсиса у инбредных мышей, вызываемые штаммами *S. pneumoniae* ATCC 6305 и *S. pneumoniae* M17 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». Штамм ATCC 6305 был наиболее вирулентным для мышей линии BALB/c среди нескольких других штаммов. Показатель его LD<sub>50</sub> при внутрибрюшинном заражении животных составляет 10 КОЕ. Аутбредные мыши оказались менее чувствительными (LD<sub>50</sub> >1 × 10<sup>6</sup> КОЕ) к этому штамму. Другой тест-штамм – *S. pneumoniae* M17 – был авирулентным в отношении аутбредных мышей и мышей линии BALB/c (LD<sub>50</sub> >1 × 10<sup>6</sup> КОЕ). Для повышения чувствительности мышей к этой культуре пневмококка мы вводили бактериальную взвесь внутрибрюшинно в растворе 2,5%-го муцина. Этот препарат подавляет функциональную активность макрофагов, что способствует развитию инфекции у модельных животных [43]. Такой подход позволил нам повысить вирулентность штамма M17 (LD<sub>50</sub> = 400 КОЕ) для мышей линии BALB/c. Во всех экспериментах по моделированию пневмококкового сепсиса и его лечению мы использовали инбредных мышей линии BALB/c, как и другие исследователи [12].

Экспериментальный пневмококковый сепсис у мышей вызывали путем внутрибрюшинного введения культуры штаммов ATCC 6305 или M17 (с муцином) в количестве 30 LD<sub>50</sub>, что составило 3 × 10<sup>2</sup> и 1,2 × 10<sup>4</sup> КОЕ соответственно. Эта заражающая доза вызывает гибель у 100% инфицированных животных. Таким образом, оба штамма – вирулентный и авирулентный – оказались пригодными для моделирования летальной пневмококковой инфекции. Бактериологический анализ внутренних органов показал, что в случае штамма *S. pneumoniae* ATCC 6305 генерализация пневмококковой инфекции начинается промежутке времени от 3 до 6 ч, когда культура патогена колонизирует селезенку и почки. В это же время у животных появляется бактериемия. К 12 ч клетки патогена проникают в легкие и головной мозг. Через сутки после инфицирования обсемененность селезенки, легких, головного мозга, почек и крови пневмококками штамма ATCC 6305 достигает своего максимума, начинается гибель мышей.

При заражении мышей культурой *S. pneumoniae* M17 наблюдалась похожая динамика развития пневмококкового сепсиса, с той лишь разницей, что диссеминация патогена в организме мышей начиналась уже через 3 ч после внутрибрюшинного инфицирования. К этому времени клетки тест-штамма проникали в селезенку, почки и кровь. В дальнейшем (через 6 ч) культура распространялась в легкие и головной мозг. Концентрация клеток пневмококка в органах и тканях продолжала расти в течение суток. Интенсивная генерализация пневмококковой инфекции, обусловленной штаммом M17, также приводит к раннему началу гибели мышей.

Быстрое развитие пневмококкового сепсиса у мышей приводит к характерным для инфекционного заболевания изменениям гомеостаза. Среди гематологических показателей наиболее выраженными являются лейкопения и тромбоцитопения. Следует отметить, что через сутки после зараже-

ния у мышей выявляются значительные отклонения от нормы некоторых биохимических показателей: АЛТ, АСТ, глюкозы. В случае штамма *S. pneumoniae* ATCC 6305 было отмечено также отклонение в показателях общего белка, ЩФ и креатинина. Результаты биохимического анализа вывороток крови мышей свидетельствуют о серьезных функциональных нарушениях печени, поджелудочной железы, почек. Таким образом, у инфицированных животных развивается прогрессирующая полиорганная недостаточность, которая наряду с интоксикацией приводит к летальному исходу.

Через сутки после внутрибрюшинного заражения культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305 или *S. pneumoniae* M17 у мышей развиваются патологические изменения в органах иммунной системы (лимфатические узлы, селезенка, тимус). В отличие от авирулентного штамма M17, у мышей, инфицированных вирулентным штаммом ATCC 6305, в лимфоузле и тимусе обнаружен апоптоз лимфоцитов. Оба штамма вызывают в красной пульпе селезенки накопление эритроцитов, а также разрушение ядросодержащих клеток. Микроскопический анализ образцов селезенки мышей, зараженных вирулентным штаммом пневмококка, выявил большее количество базофильно окрашенных некротических частиц в красной пульпе. Оба штамма вызывают образование обширных некрозов в паренхиме печени мышей. Существенным отличием патологического действия вирулентного штамма является образование тромбов в венозных сосудах печени, вокруг которых локализуются участки некрозов. Таким образом, данные гистологических исследований говорят о том, что пневмококковый сепсис у мышей приводит к быстрым и тяжелым патологическим изменениям в органах, что, в свою очередь, нарушает их функцию и приводит к гибели животных.

Пригодность разработанных моделей мы оценили в экспериментах по антибиотикотерапии пневмококкового сепсиса. Для лечения использовали антибиотики ампициллин и левофлоксацин. Дозы препаратов для мышей были эквивалентны человеческим и рассчитаны с учетом соответствующего коэффициента [44]. Пятидневные курсы терапии начинали в разные периоды экспериментальной пневмококковой инфекции: до начала генерализации (1,5 ч после заражения) и в разгар сепсиса (через 12 ч после заражения). Результаты антибиотикотерапии показали, что все животные, получавшие антибиотики, в течение 5 дней остались живыми и санированными от бактерий *S. pneumoniae* ATCC 6305 и *S. pneumoniae* M17. В то же время смертность в контрольных группах (без лечения) составляла 100%.

## Заключение

В результате работы были изучены и предложены для практического применения две модели летального пневмококкового сепсиса, вызываемого вирулентным и авирулентным штаммами *S. pneumoniae*. Эти модели поддаются лечению антибиотиками и могут быть использованы для оценки лечебной эффективности различных антибактериальных препаратов, предназначенных для борьбы с пневмококковой инфекцией.

### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

### Funding information

The work was carried out within the framework of the industry program of Rosпотребнадзор.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

### Литература

- MP 4.2.0114-16. Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии. 2017; 64 с.
- Pneumococcal Conjugate Vaccines in Infants and Children Under 5 Years of Age: WHO position paper – February 2019. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/310968/WER9408.pdf?ua=1>
- Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16 (6):355-367. DOI: 10.1038/s41579-018-0001-8
- Hanquet G, Krizova P, Valentiner-Branth P, Ladhani SN, Nuorti JP, Lepoutre A, et al., Pastore Celentano L, Savulescu C; SplIDnet/I-MOVE+ Pneumo Group. Effect of childhood pneumococcal conjugate vaccination on invasive disease in older adults of 10 European countries: implications for adult vaccination. *Thorax*. 2019 May;74(5):473-482. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2018-211767
- Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2007 Mar 23;82(12):93-104.
- Ganaie F, Saad JS, McGee L, van Tonder AJ, Bentley SD, Lo SW, et al. A New Pneumococcal Capsule Type, 10D, is the 100<sup>th</sup> Serotype and Has a Large cps Fragment from an Oral *Streptococcus*. *mBio*. 2020 May 19;11(3):e00937-20. DOI: 10.1128/mBio.00937-20
- Namkoong H, Ishii M, Funatsu Y, Kimizuka Y, Yagi K, Asami T, et al. Theory and strategy for Pneumococcal vaccines in the elderly. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(2):336-43. DOI: 10.1080/21645515.2015.1075678
- Bogaert D, De Groot, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(3):144-154. DOI: 10.1016/S1473-3099(04)00938-7
- Faden, H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville pediatrics*. *J Infect Dis*. 1997;175(6):1440-1445. DOI: 10.1086/516477
- Zafar A, Hasan R, Nizamuddin S, Mahmood N, Mukhtar S, Ali F, et al. Antibiotic susceptibility in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pyogenes* in Pakistan: a review of results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2002-15. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(1):103-9. DOI: 10.1093/jac/dkw076
- Larsson M, Nguyen HQ, Olson L, Tran TK, Nguyen TV. Multi- drug resistance in *Streptococcus pneumoniae* among children in rural Vietnam more than doubled from 1999 to 2014. *Acta Paediatrica*. 2021;110(6):1916-1923. DOI: 10.1111/apa.157
- Chiavolini D, Pozzi G, Ricci S. Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Oct;21(4):666-85. DOI: 10.1128/CMR.00012-08
- Ramisse F, Binder P, Szatanik M, Alonso JM. Passive and active immunotherapy for experimental pneumococcal pneumonia by polyvalent human immunoglobulin or F(ab')<sub>2</sub> fragments administered intranasally. *J Infect Dis*. 1996;173(5):1123-8. DOI: 10.1093/infdis/168.4.1030
- Iannelli F, Chiavolini D, Ricci S, Oggioni MR, Pozzi G. Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun*. 2004;72(5):3077-80. DOI: 10.1128/IAI.72.5.3077-3080.2004
- Grandgirard D, Steiner O, Täuber MG, Leib SL. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol*. 2007 Dec;114(6):609-17. DOI: 10.1007/s00401-007-0304-8
- Melhus Å, Ryan AF. A mouse model for acute otitis media. *APMIS*. 2003;111(10):989-94. DOI: 10.1034/j.1600-0463.2003.1111012.x
- Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Andrew PW. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by deficiency of pneumolysin and by differences in serotype. *Infect. Immun*. 2002;70(6):2886-2890. DOI: 10.1128/IAI.70.6.2886-2890.2002
- Iannelli F, Chiavolini D, Ricci S, Oggioni MR, Pozzi G. Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect. Immun*. 2004;72(5):3077-80. DOI: 10.1128/IAI.72.5.3077-3080.2004
- Chiavolini D, Tripodi S, Parigi R, Oggioni MR, Blasi E, Cintonino M, et al. Method for inducing experimental pneumococcal meningitis in outbred mice. *BMC Microbiol*. 2004;4(36). DOI: 10.1186/1471-2180-4-36
- Wang E, Ouellet N, Simard M, Fillion I, Bergeron Y, Beauchamp D, Bergeron MG. Pulmonary and systemic host response to *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in normal and immunosuppressed mice. *Infect Immun*. 2001;69(9):5294-304. DOI: 10.1128/IAI.69.9.5294-5304.2001
- Briles DE, Crain MJ, Gray BM, Forman C, Yother J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun*. 1992;60(1):111-6. DOI: 10.1128/iai.60.1.111-116.1992
- Soriano F, Ponte C, Nieto E, Parra A. Correlation of *in vitro* activity and pharmacokinetics parameters with *in vivo* effect of amoxicillin, co-amoxiclav and cefotaxime in a murine model of pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother*. 1996;38(2):227-36. DOI: 10.1093/jac/38.2.227
- Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, Van Ginkel FW, Benjamin WH. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2003;188(3):339-48. DOI: 10.1086/376571
- Azoulay-Dupuis E, Bédos JP, Vallee E, Hardy DJ, Swanson RN, Pocidal JJ. Antipneumococcal activity of ciprofloxacin, oxofloxacin and temafloxacin in an experimental mouse pneumonia model at various stages of the disease. *J Infect Dis*. 1991;163(2):319-24. DOI: 10.1093/infdis/163.2.319
- Zwijnenburg PJG, van der Poll T, Florquin S, van Deventer SJH, Roord JJ, van Furth Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. *Infect Dis*. 2001;183(7):1143-6. DOI: 10.1086/319271
- Bhatt S, Halpin C, Hsu W, Thedinger BA, Levine RA, Tuomanen E, Nadol JBJ. Hearing loss and pneumococcal meningitis: an animal model. *Laryngoscope*. 1991;101(12Pt1):1285-92. DOI: 10.1002/lary.5541011206
- Briles DE, Nahm MH, Schroer K, Davie J, Baker P, Kearney J, Barletta R. Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med*. 1981;153(3):694-705. DOI: 10.1084/jem.153.3.694
- McDaniel LS, Benjamin WH, Forman C, Briles DE. Blood clearance by anti-phosphocholine antibodies as a mechanism of protection in experimental pneumococcal bacteremia. *J Immunol*. 1984;133(6):3308-12. DOI: 10.4049/jimmunol.133.6.3308
- Balachandran P, Brooks-Walter A, Virolainen-Julkunen A, Hollingshead SK, Briles DE. Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2002;70(5):2526-34. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2526-2534.2002
- Swiatlo E, King J, Nabors GS, Mathews B, Briles DE. Pneumococcal surface protein A is expressed *in vivo*, and antibodies to PspA are effective for therapy in

- a murine model of pneumococcal sepsis. *Infect Immun.* 2003 Dec;71(12):7149-53. DOI: 10.1128/IAI.71.12.7149-7153.2003
31. Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1999;67(9):4720-4. DOI: 10.1128/IAI.67.9.4720-4724.1999
  32. Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun.* 2003 Nov;71(11):6199-204. DOI: 10.1128/IAI.71.11.6199-6204.2003
  33. Yuste J, Botto M, Paton JC, Holden DW, Brown JS. Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J Immunol.* 2005 Aug 1;175(3):1813-9. DOI: 10.4049/jimmunol.175.3.1813
  34. O'Brien DP, Briles DE, Szalai AJ, A Tu H, Sanz I, Nahm MH. Tumor necrosis factor alpha-receptor I is important for survival from *Streptococcus pneumoniae* infections. *Infect. Immun.* 1999;67(2):595-601. DOI: 10.1128/IAI.67.2.595-601.1999
  35. Ogunniyi DA, Folland RL, Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2000;68(5):3028-33. DOI: 10.1128/IAI.68.5.3028-3033.2000
  36. Lacy MK, Nicolau DP, Banevicius MA, Nightingale CH, Quintiliani R. Protective effect of trovafloxacin, ciprofloxacin and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in a murine sepsis model. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999;44(4):477-81. DOI: 10.1093/jac/44.4.477
  37. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякинина ВП, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, и др. Эффективность бактериофага Рm3 и ципрофлоксацина при лечении экспериментальной протейной инфекции у мышей. *Бактериология.* 2020;5(1):14-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-14-24
  38. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Абаев ИВ. Эффективность бактериофага SA18 при лечении экспериментальной стафилококковой инфекции у мышей линии BALB/c. *Инфекция и иммунитет.* 2017;5:906.
  39. Борзилов АИ, Мякинина ВП, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Красильникова ВМ, Вережкин ВВ, Воложанцев НВ. Оценка лечебно-профилактической эффективности бактериофага *Klebsiella pneumoniae* vB\_Krnp\_KpV289 на модели острого сепсиса у мышей. *Бактериология.* 2017;2(1):73-77.
  40. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякинина ВП, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, Воложанцев НВ. Сравнительное изучение антибактериальной активности бактериофага PA5 и полимиксина на модели летальной синегнойной инфекции у мышей. *Бактериология.* 2019;2(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43
  41. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Денисенко ЕА, Верёвкин ВВ, Ганина ЕА, Воложанцев НВ. Эффективность фаготерапии экспериментальной эшерихиозной инфекции у мышей. *Бактериология.* 2021;6(2):8-22. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-8-22
  42. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Перескокова ЕС, Ганина ЕА. Мышиная модель летального листериоза для оценки эффективности антибактериальных препаратов. *Бактериология.* 2022;7(2):8-21. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-8-21
  43. Sein J, Cachicas V, Becker MI, de Ioannes AE. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. *Biol Res.* 1993;26:371-380.
  44. Гуськова ТА. Токсикология лекарственных средств. М., 2003; 153 с.
  3. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16 (6):355-367. DOI: 10.1038/s41579-018-0001-8
  4. Hanquet G, Krizova P, Valentiner-Branth P, Ladhani SN, Nuorti JP, Lepoutre A, et al., Pastore Celentano L, Savulescu C; SplDnet/I-MOVE+ Pneumo Group. Effect of childhood pneumococcal conjugate vaccination on invasive disease in older adults of 10 European countries: implications for adult vaccination. *Thorax.* 2019 May;74(5):473-482. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2018-211767
  5. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2007 Mar 23;82(12):93-104.
  6. Ganaie F, Saad JS, McGee L, van Tonder AJ, Bentley SD, Lo SW, et al. A New Pneumococcal Capsule Type, 10D, is the 100<sup>th</sup> Serotype and Has a Large cps Fragment from an Oral Streptococcus. *mBio.* 2020 May 19;11(3):e00937-20. DOI: 10.1128/mBio.00937-20
  7. Namkoong H, Ishii M, Funatsu Y, Kimizuka Y, Yagi K, Asami T, et al. Theory and strategy for Pneumococcal vaccines in the elderly. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;12(2):336-43. DOI: 10.1080/21645515.2015.1075678
  8. Bogaert D, De Groot, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(3):144-154. DOI: 10.1016/S1473-3099(04)00938-7
  9. Faden, H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville pediatrics. J Infect Dis.* 1997;175(6):1440-1445. DOI: 10.1086/516477
  10. Zafar A, Hasan R, Nizamuddin S, Mahmood N, Mukhtar S, Ali F, et al. Antibiotic susceptibility in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pyogenes* in Pakistan: a review of results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2002-15. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(1):103-9. DOI: 10.1093/jac/dkw076
  11. Larsson M, Nguyen HQ, Olson L, Tran TK, Nguyen TV. Multi- drug resistance in *Streptococcus pneumoniae* among children in rural Vietnam more than doubled from 1999 to 2014. *Acta Paediatrica.* 2021;110(6):1916-1923. DOI: 10.1111/apa.157
  12. Chiavolini D, Pozzi G, Ricci S. Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Oct;21(4):666-85. DOI: 10.1128/CMR.00012-08
  13. Ramisse F, Binder P, Szatanik M, Alonso JM. Passive and active immunotherapy for experimental pneumococcal pneumonia by polyvalent human immunoglobulin or F(ab')<sub>2</sub> fragments administered intranasally. *J Infect Dis.* 1996;173(5):1123-8. DOI: 10.1093/infdis/168.4.1030
  14. Iannelli F, Chiavolini D, Ricci S, Oggioni MR, Pozzi G. Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun.* 2004;72(5):3077-80. DOI: 10.1128/IAI.72.5.3077-3080.2004
  15. Grandgirard D, Steiner O, Täuber MG, Leib SL. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol.* 2007 Dec;114(6):609-17. DOI: 10.1007/s00401-007-0304-8
  16. Melhus Å, Ryan AF. A mouse model for acute otitis media. *APMIS.* 2003;111(10):989-94. DOI: 10.1034/j.1600-0463.2003.1111012.x
  17. Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Andrew PW. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by deficiency of pneumolysin and by differences in serotype. *Infect. Immun.* 2002;70(6):2886-2890. DOI: 10.1128/IAI.70.6.2886-2890.2002
  18. Iannelli F, Chiavolini D, Ricci S, Oggioni MR, Pozzi G. Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect. Immun.* 2004;72(5):3077-80. DOI: 10.1128/IAI.72.5.3077-3080.2004
  19. Chiavolini D, Tripodi S, Parigi R, Oggioni MR, Blasi E, Cintonino M, et al. Method for inducing experimental pneumococcal meningitis in outbred mice. *BMC Microbiol.* 2004;4(36). DOI: 10.1186/1471-2180-4-36
  20. Wang E, Quellet N, Simard M, Fillion I, Bergeron Y, Beauchamp D, Bergeron MG. Pulmonary and systemic host response to *Streptococcus pneumoniae* and

## References

1. MR 4.2.0114-16. Laboratory diagnostics of community-acquired pneumonia of pneumococcal etiology. 2017; 64 p. (In Russian).
2. Pneumococcal Conjugate Vaccines in Infants and Children Under 5 Years of Age: WHO position paper – February 2019. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/310968/WER9408.pdf?ua=1>

- Klebsiella pneumoniae* bacteremia in normal and immunosuppressed mice. Infect Immun. 2001;69(9):5294-304. DOI: 10.1128/IAI.69.9.5294-5304.2001
21. Briles DE, Crain MJ, Gray BM, Forman C, Yother J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 1992;60(1):111-6. DOI: 10.1128/iai.60.1.111-116.1992
  22. Soriano F, Ponte C, Nieto E, Parra A. Correlation of *in vitro* activity and pharmacokinetics parameters with *in vivo* effect of amoxicillin, co-amoxiclav and cefotaxime in a murine model of pneumococcal pneumonia. J Antimicrob Chemother. 1996;38(2):227-36. DOI: 10.1093/jac/38.2.227
  23. Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, Van Ginkel FW, Benjamin WH. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis. 2003;188(3):339-48. DOI: 10.1086/376571
  24. Azoulay-Dupuis E, Bédos JP, Vallee E, Hardy DJ, Swanson RN, Pocidalo JJ. Antipneumococcal activity of ciprofloxacin, oxofloxacin and temafloxacin in an experimental mouse pneumonia model at various stages of the disease. J Infect Dis. 1991;163(2):319-24. DOI: 10.1093/infdis/163.2.319
  25. Zwijnenburg PJG, van der Poll T, Florquin S, van Deventer SJH, Roord JJ, van Furth Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. Infect Dis. 2001;183(7):1143-6. DOI: 10.1086/319271
  26. Bhatt S, Halpin C, Hsu W, Thedinger BA, Levine RA, Tuomanen E, Nadol JBJ. Hearing loss and pneumococcal meningitis: an animal model. Laryngoscope. 1991;101(12Pt1):1285-92. DOI: 10.1002/lary.5541011206
  27. Briles DE, Nahm MH, Schroer K, Davie J, Baker P, Kearney J, Barletta R. Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 *Streptococcus pneumoniae*. J Exp Med. 1981;153(3):694-705. DOI: 10.1084/jem.153.3.694
  28. McDaniel LS, Benjamin WH, Forman C, Briles DE. Blood clearance by anti-phosphocholine antibodies as a mechanism of protection in experimental pneumococcal bacteremia. J Immunol. 1984;133(6):3308-12. DOI: 10.4049/jimmunol.133.6.3308
  29. Balachandran P, Brooks-Walter A, Virolainen-Julkunen A, Hollingshead SK, Briles DE. Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of *Streptococcus pneumoniae*. Immun. 2002;70(5):2526-34. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2526-2534.2002
  30. Swiatlo E, King J, Nabors GS, Mathews B, Briles DE. Pneumococcal surface protein A is expressed *in vivo*, and antibodies to PspA are effective for therapy in a murine model of pneumococcal sepsis. Infect Immun. 2003 Dec;71(12):7149-53. DOI: 10.1128/IAI.71.12.7149-7153.2003
  31. Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 1999;67(9):4720-4. DOI: 10.1128/IAI.67.9.4720-4724.1999
  32. Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. Infect Immun. 2003 Nov;71(11):6199-204. DOI: 10.1128/IAI.71.11.6199-6204.2003
  33. Yuste J, Botto M, Paton JC, Holden DW, Brown JS. Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. J Immunol. 2005 Aug 1;175(3):1813-9. DOI: 10.4049/jimmunol.175.3.1813
  34. O'Brien DP, Briles DE, Szalai AJ, A Tu H, Sanz I, Nahm MH. Tumor necrosis factor alpha-receptor I is important for survival from *Streptococcus pneumoniae* infections. Infect. Immun. 1999;67(2):595-601. DOI: 10.1128/IAI.67.2.595-601.1999
  35. Ogunniyi DA, Folland RL, Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 2000;68(5):3028-33. DOI: 10.1128/IAI.68.5.3028-3033.2000
  36. Lacy MK, Nicolau DP, Banevicius MA, Nightingale CH, Quintiliani R. Protective effect of trovafloxacin, ciprofloxacin and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in a murine sepsis model. J Antimicrob. Chemother. 1999;44(4):477-81. DOI: 10.1093/jac/44.4.477
  37. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, et al. Effectiveness of bacteriophage pm3 and ciprofloxacin in treating experimental proteus infections in mice. Bacteriology. 2020;5(1):14-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-14-24 (In Russian).
  38. Borzilov AI, Korobova O V, Kombarova TI, Abaev IV. Efficacy of bacteriophage SA18 in the treatment of experimental staphylococcal infection in BALB/c mice. Russian Journal of Infection and Immunity. 2017;5:906. (In Russian).
  39. Borzilov AI, Myakinina VP, Korobova OV, Kombarova TI, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Volozhantsev NV. Evaluation of preventive and therapeutic efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB\_Kpnp\_KpV289 on the model of acute sepsis in mice. Bacteriology. 2017;2(1):73-77. (In Russian).
  40. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Volozhantsev NV. Comparative study of antibacterial activities of bacteriophage PA5 and polymyxin on the model of lethal pseudomonas infection in mice. Bacteriology. 2019;4(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43 (In Russian).
  41. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Denisenko EA, Verevkin VV, Ganina EA, Volozhantsev NV. Phage therapy efficiency of experimental escherichiosis infection in mice. Bacteriology. 2021;6(2):8-22. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-8-22 (In Russian).
  42. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Pereskokova ES, Ganina EA. A mouse model of lethal listeria for assessing the efficiency of antibacterial drugs. Bacteriology. 2022;7(2):8-21. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-8-21 (In Russian).
  43. Sein J, Cachicas V, Becker MI, de Ioannes AE. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. Biol Res. 1993;26:371-380.
  44. Guskova TA. Toxicology of medicines. Moscow, 2003; 153 p. (In Russian).
- 
- Информация о соавторах:**  
 Коробова Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- Перескокова Евгения Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- Ганина Елена Анатольевна, научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- 
- Information about co-authors:**  
 Olga V. Korobova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
- Tatiana I. Kombarova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
- Evgenia S. Pereskokova, Junior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
- Elena A. Ganina, Researcher of the Nanobiotechnology Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор