

Модель пневмококковой пневмонии у мышей

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

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

Разработана и описана модель пневмококковой пневмонии у мышей линии BALB/c, вызываемая штаммом *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305. Интраназальное введение культуры в дозе 40 ЛД₅₀ приводит к быстрому развитию пневмонии с генерализацией пневмококковой инфекции, в результате чего все животные погибают в течение 4 суток. В крови мышей наблюдается снижение количества лейкоцитов при повышении доли гранулоцитов и уменьшении доли лимфоцитов. Отмечается изменение некоторых биохимических показателей в сыворотке крови. В легочной ткани развиваются патологические изменения воспалительного характера, а в печени – некрозы. Органы иммунной системы реагируют на инфекцию уменьшением объема лимфоидной ткани. Разработанная нами модель пневмококковой пневмонии у мышей является пригодной для оценки активности антибактериальных препаратов. Левофлоксацин в суточных дозах 25 и 100 мг/кг дает хороший лечебный эффект. Однако выживаемость мышей, инфицированных *S. pneumoniae* ATCC 6305, зависит от дозы антибиотика и составляет 70–100%. Лечение инфекции ампициллином в дозах 100 и 400 мг/кг приводит к 100%-й защите мышей от гибели.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, пневмония, мышиная модель, антибиотикотерапия

Для цитирования: Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Перескокова Е.С., Ганина Е.А. Модель пневмококковой пневмонии у мышей. Бактериология. 2024; 9(3): 28–36. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-28-36

Model of pneumococcal pneumonia in mice

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

A model of pneumococcal pneumonia in BALB/c mice, caused by the *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 strain, was developed and described. Intranasal administration of the culture at a dose of 40 LD₅₀ leads to the rapid development of pneumonia with generalization of pneumococcal infection, as a result, of which all animals die within eight days. In the blood of mice, a decrease in the number of leukocytes is observed with an increase in the proportion of granulocytes and a decrease in the proportion of lymphocytes. There is a change in some biochemical parameters in the blood serum. Pathological changes of an inflammatory nature develop in the lung tissue, and necrosis in the liver. Organs of the immune system react to infection by reducing the volume of lymphoid tissue. The model of pneumococcal pneumonia developed by us in mice is suitable for assessing the activity of antibacterial drugs. Levofloxacin in daily doses of 25 and 100 mg/kg gives a good therapeutic effect. However, the survival rate of mice infected with *S. pneumoniae* ATCC 6305 depends on the antibiotic dose and ranges from 70 to 100%. Treatment of infection with ampicillin at doses of 100 mg/kg and 400 mg/kg resulted in 100% protection of mice from death.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, pneumonia, mouse model, antibiotic therapy

For citation: Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., Pereskokova E.S., Ganina E.A. Model of pneumococcal pneumonia in mice. Bacteriology. 2024; 9(3): 28–36. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-28-36

Streptococcus pneumoniae – условно-патогенная грамотрицательная бактерия, способная вызывать легочную инфекцию у людей. Особый риск *S. pneumoniae* представляют для здоровья детей в возрасте до 5 лет [1]. У 20–40% здоровых детей в составе микрофлоры носоглотки имеются пневмококки, но с возрастом количество носителей этих микроорганизмов снижается до 5–10% [2]. Среди возбудите-

лей острых респираторных инфекций доля бактерии *S. pneumoniae* достигает 13,8%, а детская смертность, по некоторым данным, составляет 11% [3]. При благоприятных условиях пневмококки способны из носоглотки проникать в соседние органы и распространяться с кровотоком по организму человека, вызывая тяжелые заболевания – средний отит, пневмонию, менингит, сепсис [4, 5].

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 обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-01-47
E-mail: borzilov@obolensk.org

Статья поступила 07.02.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Alexander I. Borzilov, PhD, MD, Researcher of biological testing laboratory of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-01-47
E-mail: borzilov@obolensk.org

The article was received 07.02.2024, accepted for publication 30.09.2024

На протяжении многих лет исследователи во всем мире ведут разработку актуальных поливалентных вакцин и антибактериальных препаратов, направленных против *S. pneumoniae* [6, 7]. Для оценки их эффективности *in vivo* используют различные модели пневмококковой инфекции – сепсис, отит, менингит, пневмония [8–11].

Экспериментальную легочную пневмококковую инфекцию воспроизводят двумя методами введения: интратрахеальным [12] и интраназальным [13, 14]. Первый способ инфицирования позволяет доставить в легкие максимальное количество заражающих бактерий, но при этом сама манипуляция более сложная и рискованная с технической точки зрения. В качестве модельных животных для воспроизведения пневмококковой пневмонии с успехом используют как инбредных [11, 15], так и аутбредных мышей [16, 17]. Показано, что у разных линий мышей пневмококковая пневмония может протекать остро или подостро. Так, например, гибель мышей линии BALB/c наступает в течение 2–4 дней после заражения, а мыши C57BL погибают на 8–10-е сутки [15].

Интраназальный способ – наиболее простой, атравматичный и наиболее применяемый на практике. Некоторые исследователи выбирают для инфицирования мышей низкие заражающие дозы пневмококка, стараясь максимально моделировать инфекцию у человека [14]. Так, например, К.Л.Крышень с соавт. для моделирования пневмонии заражали мышей линии BALB/c интраназально культурой *S. pneumoniae* ATCC 6303 (серогруппа тип 3) в дозе $5 \cdot 10^5$ КОЕ для исследования патологических изменений в легких [18]. Однако для оценки эффективности антибактериальных препаратов чаще используют высокие дозы патогена, которые вызывают у мышей воспалительный процесс в легких с последующим развитием сепсиса [6, 13]. Достаточно часто при воспроизведении летальной пневмонии берут мышей с индуцированным иммунодефицитом, что позволяет снизить заражающую дозу до 10^4 – 10^5 КОЕ [14, 19]. Интраназальную модель пневмококковой пневмонии часто используют для изучения активности антибактериальных препаратов [14, 15, 20] и эффективности вакцин [21, 22]. После интраназального или интратрахеального заражения модельных животных исследуют обсемененность пневмококками легких и других органов, патологические изменения в них, иммунологический статус, показатели гомеостаза, регистрируют выживаемость и средние сроки гибели животных и т.д.

В ходе наших исследований мы разработали и описали модель легочной пневмококковой инфекции у мышей линии BALB/c, вызываемой штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305, который относится к серогруппе 5. Модель является летальной, но поддается лечению антибиотиками. Разработанная модель пневмококковой пневмонии пригодна для оценки эффективности *in vivo* антибактериальных препаратов.

Материалы и методы

Бактериальные культуры

Для моделирования пневмококкового сепсиса использовали штамм *S. pneumoniae* ATCC 6305 (инв. № В-7398) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Штамм относится к серогруппе 5 и обладает вирулентностью в отношении имму-

нокомпетентных мышей BALB/c при интраназальном введении. Штамм чувствителен к эритромицину, кларитромицину, азитромицину, линкомицину, клиндамицину, тетрациклину, левофлоксацину, спарфлоксацину, моксифлоксацину, га-тифлоксацину, 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 культуры пневмококка использовали шоколадный агар с ростовой добавкой (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Гомогенаты внутренних органов мышей и кровь высеивали на шоколадный агар с селективной и ростовой добавками (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

Левофлоксацин (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) и ампициллина натриевую соль (PanReas AppliChem, Германия) использовали для лечения экспериментальной пневмококковой инфекции у мышей.

Лабораторные животные

Эксперименты *in vivo* проводили на мышах линии BALB/c (самцы/самки, 17–19 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 клетке. За животными проводили ежедневное ветеринарное наблюдение. Павших в процессе эксперимента мышей удаляли из клеток по мере обнаружения.

Заражение лабораторных животных

Бактериальную взвесь для интраназального инфицирования животных готовили из суточной агаровой культуры *S. pneumoniae* ATCC 6305 с концентрацией $\sim 1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Культуру вводили мышам интраназально в объеме 0,02 мл ($2 \cdot 10^7$ КОЕ). Животных перед заражением обездвигивали подкожным введением 0,2%-го рометара.

Изучение динамики развития пневмококковой пневмонии

Пневмококковую пневмонию у мышей линии BALB/c воспроизводили путем интраназального введения культуры *S. pneumoniae* ATCC 6305 в дозе 40 ЛД₅₀ ($2 \cdot 10^7$ КОЕ). Динамику развития летальной пневмококковой инфекции у мышей оценивали по степени обсемененности клетками пневмококка селезенки, легких, головного мозга, почек и крови животных через 3, 6, 12, 24 и 48 ч после заражения. В каждой контрольной точке по 5 мышей эвтаназировали методом декапитации. Гомогенаты органов и кровь направляли на бактериологический анализ.

Для выявления функциональных и морфологических изменений внутренних органов в процессе развития пневмококковой инфекции через 48 ч после инфицирования делали общий и биохимический анализ крови мышей. В это же время проводили гистологическое исследование органов мышей (легких, печени, селезенки, головного 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 при-

бора. Для сбора крови применяли микропробирки с К2-ЭДТА. Исследовали индивидуальные образцы крови от пяти 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).

Бактериологический анализ органов

Легкие, селезенку, почки, 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. Посевы инкубировали при температуре 36,5°C в течение 18–24 ч.

Гистологическое исследование органов и тканей

Гистологическое исследование проводили через 48 ч после внутрибрюшинного заражения (на пике сепсиса). В качестве контролей использовали интактных мышей линии BALB/c. После эвтаназии у животных препарировали легкие, печень, селезенку, тимус, регионарные лимфатические узлы и головной мозг.

Полученные образцы помещали во флакон с 50 мл 4%-го раствора параформа. Через 24 ч экспозиции раствор пара-

форма 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 лечебных препаратов использовали левофлоксацин и ампициллин.

После интраназального инфицирования мыши BALB/c были случайным образом распределены на лечебные и контрольных группы по 10 особей в каждой (табл. 1). Мыши из 1-й и 3-й экспериментальных групп получали подкожно по 100 мг/кг левофлоксацина 1 раз в день. 2-я и 4-я лечебные группы получали этот же препарат ежедневно по 25 мг/кг. Экстренное лечение начинали через 3 ч после заражения (группы 1 и 2), позднее лечение – через 24 ч (группы 3 и 4). Группа 5 являлась контрольной и не получала антибактериального препарата.

Мышам из групп 6 и 8 назначали ампициллин дважды в день подкожно по 200 мг/кг, а мышам из групп 7 и 9 – по 50 мг/кг. Как и в случае с левофлоксацином, терапию начинали через 3 ч (группы 6 и 7) или через 24 ч (группы 8 и 9) после инфицирования.

Таблица 1. Схема лечения летальной легочной инфекции у мышей линии BALB/c, вызванной интраназальным заражением *S. pneumoniae* ATCC 6305

Table 1. Treatment regimen for lethal pulmonary infection in BALB/c mice caused by intranasal infection with *S. pneumoniae* ATCC 6305

№ группы / Group No	Кол-во мышей в группе / Number of mice in the group	Препарат / Drug	Разовая доза препарата, мг/кг / Single dose of drug, mg/kg	Режим лечения / Treatment regimen
1	10	Левофлоксацин / Levofloxacin	100	Начало – через 3 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 3 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
2	10	Левофлоксацин / Levofloxacin	25	Начало – через 3 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 3 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
3	10	Левофлоксацин / Levofloxacin	100	Начало – через 24 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 24 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
4	10	Левофлоксацин / Levofloxacin	25	Начало – через 24 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 24 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
5	10	Без лечения/ Without treatment		
6	10	Ампициллин / Ampicillin	200	Начало – через 3 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 3 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
7	10	Ампициллин / Ampicillin	50	Начало – через 3 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 3 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
8	10	Ампициллин / Ampicillin	200	Начало – через 24 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 24 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
9	10	Ампициллин / Ampicillin	50	Начало – через 24 ч после заражения. Подкожно, 1 раз в сутки, 5 дней / Onset: 24 hours after infection. Subcutaneously, once a day, 5 days
10	10	Без лечения / Without treatment		

Таблица 2. Обсемененность органов и тканей мышей BALB/c бактериями *S. pneumoniae* ATCC 6305 в различные сроки пневмококковой инфекции, обусловленной интраназальным заражением в дозе 40 ЛД₅₀
Table 2. Contamination of organs and tissues of BALB/c mice with *S. pneumoniae* ATCC 6305 bacteria at different times of pneumococcal infection caused by intranasal infection at a dose of 40 LD₅₀

Время после заражения, ч / Time after infection, h	LOG ₁₀ КОЕ/г (мл) клеток <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305* / LOG ₁₀ COE/g (ml) of <i>S. pneumoniae</i> cells ATCC 6305*				
	Селезенка / Spleen	Легкое / Lung	Головной мозг / Brain	Почки / Kidneys	Кровь / Blood
3	<1	7,13 ± 0,63 (5/5)	3,56 ± 0,62 (5/5)	2,91 ± 0,11 (3/5)	<1,1
6	<1	6,49 ± 0,87 (5/5)	3,74 ± 0,68 (5/5)	2,87 ± 0,69 (5/5)	<1,1
12	<1	4,94 ± 0,44 (5/5)	4,60 ± 0,36 (5/5)	2,50 ± 0,31 (3/5)	2,66 ± 0,90 (4/5)
24	6,84 ± 0,26 (5/5)	6,54 ± 0,42 (5/5)	4,84 ± 0,27 (5/5)	5,77 ± 0,12 (5/5)	6,70 ± 0,24 (5/5)
48	7,87 ± 1,34 (5/5)	6,64 ± 0,62 (5/5)	5,49 ± 0,46 (5/5)	7,03 ± 1,01 (5/5)	7,08 ± 0,58 (5/5)

Среднее значение и стандартное отклонение (n = 5); в дробях указано соотношение количества животных, у которых была выявлена культура *S. pneumoniae* ATCC 6305, к общему количеству животных в группе. / Mean and standard deviation (n = 5); fractions indicate the ratio of the number of animals in which *S. pneumoniae* ATCC 6305 culture was detected to the total number of animals in the group.

Продолжительность антибиотикотерапии составила 5 дней. Срок наблюдения за мышами – 14 суток. Эффективность антибиотикотерапии оценивали по выживаемости и степени санации организма выживших животных от культуры тест-штамма.

Статистические методы

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

Результаты исследования

Модель летального пневмококкового сепсиса у мышей

Интраназальное заражение мышей линии BALB/c культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305 в дозе 40 ЛД₅₀ приводит к быстрому развитию пневмонии и сепсиса и 100%-й гибели животных в течение 4 суток.

Результаты бактериологического анализа показали, что интраназальное введение культуры штамма *S. pneumoniae* ATCC 6305 вызывает у мышей линии BALB/c генерализованную инфекцию (табл. 2). Через 3 ч после заражения пневмококки в большом количестве определялись в легких мышей. В это же время бактерии проникали в головной мозг и почки животных, но концентрация патогена в этих органах была невысокой. Несмотря на начавшуюся инвазию клеток пневмококка из респираторного тракта в различные органы, бактериемия у мышей отсутствовала. Через 12 ч происходило некоторое снижение обсемененности легких, но увеличивалось содержание пневмококков в головном мозге и почках. В селезенке культура пневмококка была выявлена только через 24 ч после заражения. Уровень ее обсемененности в это время был достаточно высоким и продолжал расти в течение следующих суток (концентрация клеток *S. pneumoniae* ATCC 630 увеличилась на порядок).

Важно отметить, что, несмотря на быструю колонизацию пневмококками органов, пневмококковая бактериемия была выявлена у 4 из 5 мышей только через 12 ч после инфицирования. Затем обсемененность крови клетками *S. pneumoniae* ATCC 6305 возрастала и ко 2-м суткам инфекции составляла 7,08 LOG₁₀ КОЕ/г.

Общий анализ крови мышей, зараженных интраназально культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305, показал, что через

Таблица 3. Результаты клинического анализа крови мышей BALB/c, проведенного через 48 ч после интраназального заражения культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305 в дозе 40 ЛД₅₀
Table 3. Results of clinical blood analysis of BALB/c mice, carried out 48 hours after intranasal infection with *S. pneumoniae* ATCC 6305 culture at a dose of 40 LD₅₀

Показатель / Indicator	Ед. измерения / Unit of measurement	Интактные мыши (контроль) / Intact mice (control)	Инфицированные мыши / Infected mice	p-value*
1	2	3	4	5
Лейкоциты / Leukocytes	×10 ⁹ /л	5,0 ± 1,2	2,2 ± 1,8	<0,05
Лимфоциты / Lymphocytes	×10 ⁹ /л	3,5 ± 0,8	0,8 ± 0,9	<0,005
Моноциты / Monocytes	×10 ⁹ /л	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	>0,05
Гранулоциты / Granulocytes	×10 ⁹ /л	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,8	>0,05
Лимфоциты / Lymphocytes	%	68,7 ± 6,7	31,5 ± 7,9	<0,0005
Моноциты / Monocytes	%	4,5 ± 0,9	5,8 ± 1,5	>0,05
Гранулоциты / Granulocytes	%	26,8 ± 5,9	62,7 ± 8,9	<0,001
Эритроциты / Erythrocytes	×10 ¹² /л	9,00 ± 0,5	9,77 ± 1,35	>0,05
Гемоглобин / Hemoglobin	г/л	119 ± 12	135 ± 20	>0,05
Гематокрит / Hematocrit	%	39,7 ± 3,9	46,0 ± 6,5	>0,05
Тромбоциты / Thrombocytes	×10 ⁹ /л	957 ± 401	220 ± 232	<0,03
Тромбокрит / Thrombocrit	%	0,432 ± 0,179	0,114 ± 0,114	<0,03

*уровень значимости отличий от контроля для выбранной временной точки; число животных в группе – 5; жирным шрифтом указаны значения, статистически значимо отличающиеся от контроля; все сравнения проводили по двустороннему t-критерию Стьюдента. / *significance level of differences from control for the selected time point; number of animals in a group – 5; values that are statistically significantly different from the control are shown in bold; all comparisons were performed using a two-tailed Student's t-test.

2 суток у мышей развивается лейкоцитопения и лимфоцитопения. Среди других статистически значимых изменений

гематологических показателей крови у инфицированных животных следует отметить четырехкратное снижение уровня тромбоцитов и тромбокрита (табл. 3).

Сыворотки крови мышей, инфицированных культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305, исследовали на содержание общего белка, глюкозы, креатинина, АСТ, АЛТ и ЩФ. Биохимический анализ сывороток крови мышей с пневмококковой инфекцией показал, что через 48 ч после заражения в 2 раза повышается уровень АСТ. С другой стороны, у животных почти в 2 раза снижалось содержание ЩФ (табл. 4). Средние концентрации общего белка, креатинина, глюкозы и АЛТ в сыворотках крови инфицированных мышей значимо не отличались от контроля (сыворотки интактных животных), хотя и имелась тенденция к отклонению от нормы.

Выявленные у инфицированных животных отклонения биохимических показателей крови свидетельствуют о серьезном нарушении функции печени и поджелудочной железы, которые напрямую связаны с развитием у них пневмококкового сепсиса.

Через 48 ч после интраназального заражения летальной дозой *S. pneumoniae* ATCC 6305 (40 ЛД₅₀) было проведено гистологическое исследование легких, печени, селезенки, тимуса, паховых лимфатических узлов, головного мозга и почек мышей BALB/c с целью выявления патологических изменений.

Таблица 4. Результаты биохимического анализа сывороток крови мышей BALB/c, проведенного через 48 ч после интраназального заражения культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305 в дозе 40 ЛД₅₀
 Table 4. Results of biochemical analysis of blood serum of BALB/c mice, carried out 48 hours after intranasal infection with *S. pneumoniae* ATCC 6305 culture at a dose of 40 LD₅₀

Показатель / Indicator	Интактные мыши (контроль)* / Intact mice (control)*	Инфицированные мыши* / Infected mice*
Общий белок, г/л / Total protein, g/l	71,2 ± 12,6	62,4 ± 6,4
Глюкоза, ммоль/л / Glucose, mmol/l	5,08 ± 1,9	3,19 ± 0,06
АСТ, МЕ/л / AST, IU/l	148,9 ± 34,6	287,6 ± 64,7
АЛТ, МЕ/л / ALT, IU/l	40,9 ± 10,2	51,7 ± 26,2
Креатинин, мкмоль/л / Creatinine, μmol/l	38,7 ± 3,9	46,6 ± 3,8
Щелочная фосфатаза, МЕ/л / Alkaline phosphatase, IU/l	448,9 ± 102,0	240,1 ± 43,6

*результаты анализа пула сывороток от пяти мышей в группе. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно ($p < 0,05$) отличающиеся от контроля. / *results of analysis of a pool of sera from five mice per group. Values in bold are significantly ($p < 0,05$) different from the control.

Легкие. Микроскопическое изучение гистологических срезов легких выявило в них выраженные патологические изменения. Просветы бронхов разного калибра заполнены

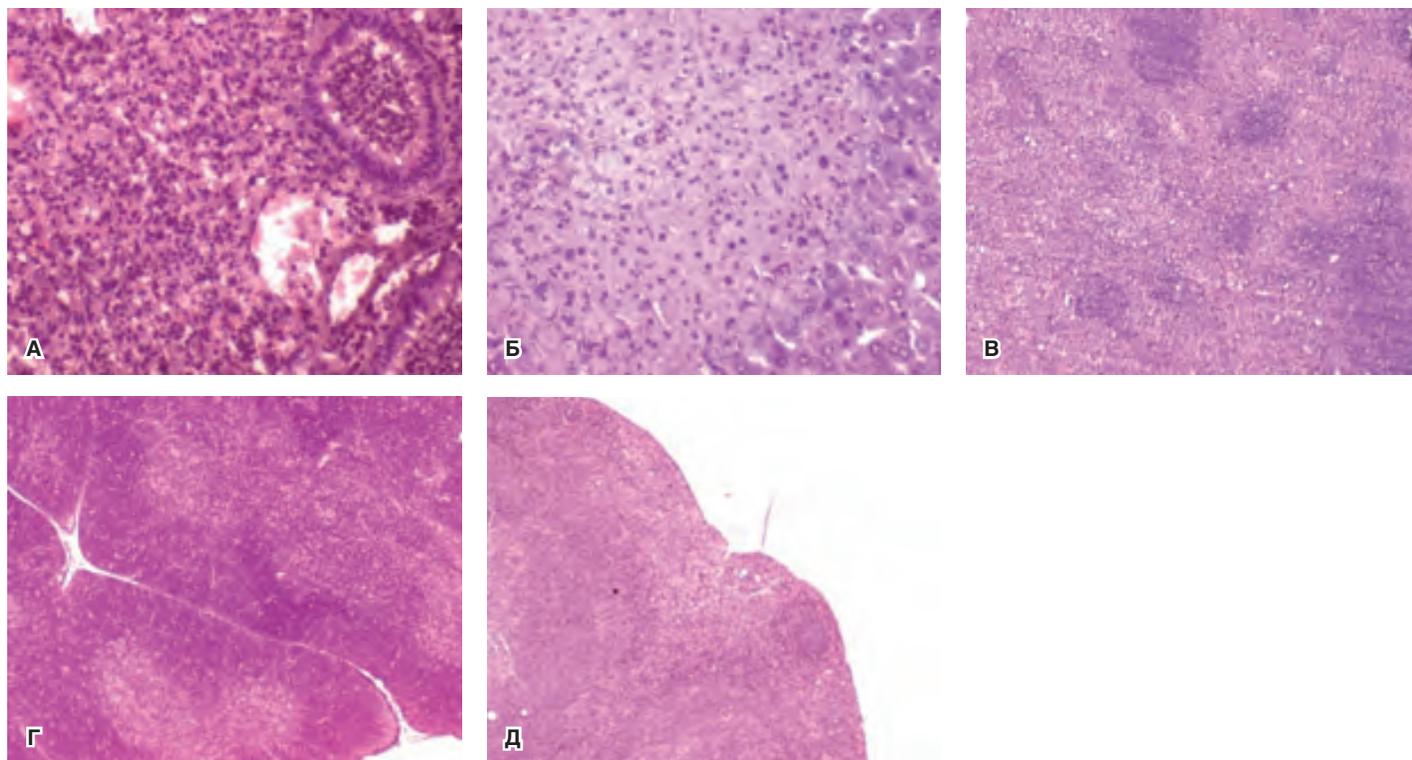


Рис. 1. Микрофотографии органов мышей BALB/c, инфицированных интраназально культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305, 48 ч после заражения: А – легкие. Воспалительный клеточный инфильтрат в бронхах и паренхиме. Увеличение 20×; Б – печень. Обширный очаг некроза. Увеличение 20×; В – селезенка. Лимфатические фолликулы уменьшенного размера, состоят из малого количества лимфоцитов. Увеличение 10×; Г – тимус. Значительное уменьшение ширины коркового вещества. Увеличение 10×; Д – лимфатический узел. Центры размножения в лимфатических фолликулах отсутствуют. Увеличение 10×.

Fig. 1. Photomicrographs of organs of BALB/c mice infected intranasally with *S. pneumoniae* ATCC 6305 culture. 48 hours after infection: A – lungs. Inflammatory cellular infiltrate in the bronchi and parenchyma. Magnification 20×; B – liver. Extensive focus of necrosis. Magnification 20×; C – spleen. Lymphatic follicles are reduced in size, consist of a small number of lymphocytes. Magnification 10×; D – thymus. Significant decrease in the width of the cortex. Magnification 10×; E – lymph node. Reproductive centers are absent in the lymphatic follicles. Magnification 10×.

скоплениями нейтрофилов, между которыми встречаются микробные клетки. В некоторых бронхах имеется большое количество слизи. Эпителиальный слой бронхов без повреждений. В слизистой оболочке бронхов воспалительно-клеточной инфильтрации не выявлено. В паренхиме легких имеется обильная клеточная инфильтрация межальвеолярных перегородок, в просвете альвеол также видны скопления клеток, что приводит к исчезновению альвеолярного строения. Клеточный инфильтрат состоит из макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов и единичных базофилов. Отмечается наличие большого количества микробов в очагах клеточной инфильтрации (рис. 1А).

Печень. В ткани печени имеется множество обширных участков из гепатоцитов в состоянии дегенерации и некроза. Ядра клеток сжаты, гиперхромные. В некоторых клетках отмечается лизис ядер. Цитоплазма гепатоцитов не окрашивается. В паренхиме, окружающей некротические очаги, определяются диффузно расположенные дегенерирующие клетки (рис. 1Б).

Селезенка. Площадь белой пульпы селезенки значительно уменьшена в результате уменьшения лимфатических фолликулов, у которых отсутствует маргинальная зона (рис. 1В). Центры размножения не определяются. Иногда на месте лимфатического фолликула сохраняется лишь небольшое скопление лимфоцитов. В красной пульпе находится довольно большое количество лимфоцитов и нейтрофилов. У некоторых животных в синусах селезенки обнаружены тромбы. В ряде случаев в красной пульпе выявляется большое количество разрушенных клеток.

Тимус. У большинства инфицированных мышей морфология долек тимуса аналогична микроскопическому строению тимуса интактных животных. Кортиковое вещество, расположенное по краевой части долек, состоит из большого количества плотно расположенных лимфоцитов. Мозговое вещество долек содержит меньшее количество лимфоцитов. Отличие тимуса мышей, зараженных пневмококком, от тимуса здоровых мышей заключается в истончении (прибли-

зительно в 2–3 раза) корковой зоны долек (рис. 1Г). У некоторых зараженных пневмококком животных количества лимфоцитов в корковом веществе встречаются лишь единичные лимфоциты, что говорит об усилении патологических процессов.

Лимфатический узел. Кортиковое вещество лимфатических узлов содержат единичные лимфатические фолликулы. Центры размножения не определяются. В паракортикальной зоне и мозговом веществе имеется большое количество лимфоцитов, что свидетельствует о повышенной иммунной активности органа. У части инфицированных мышей количество лимфоцитов в лимфоузлах значительно уменьшается. В результате становится видна строма.

В головном мозге и почках микроскопических отклонений от нормы не выявлено.

Антибиотикотерапия пневмококковой пневмонии

Пригодность разработанной модели летальной легочной инфекции, вызываемой штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305, оценивали в экспериментах по антибиотикотерапии. Полученные результаты показали высокую эффективность ранней антибиотикотерапии, когда введения антибиотиков начинали через 3 ч после заражения. В результате все мыши, получавшие большую дозу левофлоксацина (100 мг/кг), выжили к 14-м суткам после заражения. Меньшая доза препарата (25 мг/кг) защищала от гибели 90% животных. Гибель 1 из 10 мышей в группе 2 произошла только на 11-е сутки инфекции.

Более позднее начало терапии (через сутки после заражения) приводило к худшему результату. В это время у мышей уже имелся выраженный пневмококковый сепсис. При этом эффективность терапии напрямую зависела от терапевтической дозы левофлоксацина. 90% мышей, которым вводили антибиотик в дозе 100 мг/кг (группа 3), оставались живыми в течение срока наблюдения. Лишь 1 животное умерло на 13-е сутки после инфицирования. Выживаемость мышей в группе 4, которым назначали меньшую дозу препарата (25 мг/кг), составила лишь 50%. Гибель животных

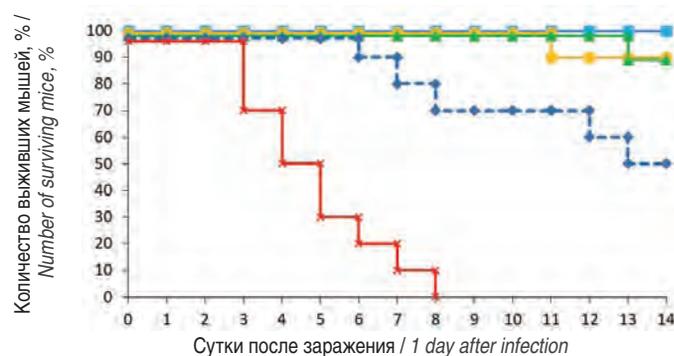


Рис. 2. Эффективность левофлоксацина (ЛФ) при лечении летальной инфекции у мышей BALB/c, вызванной интраназальным введением 40 ЛД₅₀ культуры *S. pneumoniae* ATCC 6305.

Fig. 2. Efficacy of levofloxacin (LF) in the treatment of lethal infection in BALB/c mice caused by intranasal administration of 40 LD₅₀ *S. pneumoniae* ATCC 6305.

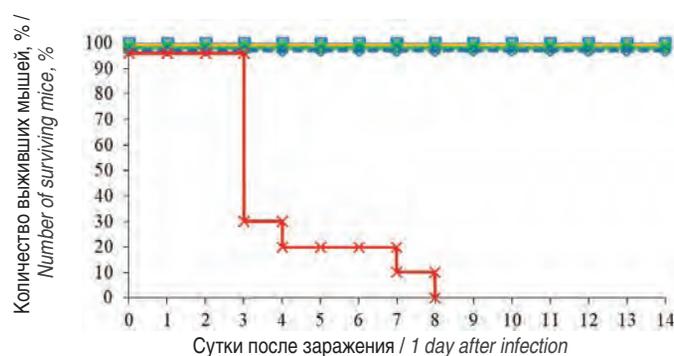


Рис. 3. Эффективность ампициллина (АМ) при лечении летальной инфекции у мышей BALB/c, вызванной интраназальным введением 40 ЛД₅₀ культуры *S. pneumoniae* ATCC 6305.

Fig. 3. Efficacy of ampicillin (AM) in the treatment of lethal infection in BALB/c mice caused by intranasal administration of 40 LD₅₀ of *S. pneumoniae* ATCC 6305 culture.

наблюдалась с 6-х по 13-е сутки. Все контрольные животные (без лечения) умерли в течение 8 суток после заражения (рис. 2).

Из внутренних органов всех павших мышей была выделена культура патогена – *S. pneumoniae* ATCC 6305. По данным бактериологического анализа, проведенного на 14-е сутки после заражения, во внутренних органах и крови всех выживших мышей культура пневмококка отсутствовала. Таким образом, эти животные были полностью санированы от пневмококка.

Результаты лечения пневмококковой пневмонии ампициллином оказались более высокими. Введение мышам этого антибиотика и в максимальной, и в минимальной разовых дозах независимо от сроков начала лечения защищало от гибели 100% мышей, тогда как контрольные мыши, не получавшие ампициллин, умирали в течение 8 суток (рис. 3). Бактериологический анализ органов всех выживших мышей не выявил у них носительства *S. pneumoniae* ATCC 6305.

Обсуждение

Мышиные модели пневмококковой инфекции широко используются исследователями для изучения патогенеза и для оценки лечебной эффективности различных антибактериальных препаратов [23–25]. Ранее мы также описали модель пневмококкового сепсиса у мышей линии BALB/c, вызываемого вирулентным штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305 и авирулентным штаммом *S. pneumoniae* M17 [26].

В этой статье мы представили экспериментальные данные, позволяющие воспроизводить летальную пневмококковую пневмонию у здоровых мышей. Описанная нами модель инфекции позволяет использовать ее для оценки лечебной эффективности антибактериальных препаратов. Многие вирулентные штаммы бактерий, таких как *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Streptococcus pneumoniae*, способны вызывать серьезную легочную инфекцию у здоровых мышей различных линий. В предварительных исследованиях мы отобрали наиболее вирулентный в отношении иммунокомпетентных мышей клинический штамм *S. pneumoniae*, относящийся к серогруппе 5, который после интраназального инфицирования вызывает у мышей тяжелую форму пневмонии, генерализацию инфекции и гибель животных. Известно, что среди штаммов пневмококков этой серогруппы встречаются высоковирулентные варианты [27]. Однако для моделирования смертельной пневмококковой пневмонии пригодны штаммы других серотипов – 1, 3, 6А и 8 [28]. В качестве модельных животных мы использовали мышей линии BALB/c, для которых ЛД₅₀ штамма ATCC 6305 при интраназальном введении составляет $4,5 \cdot 10^5$ КОЕ. Установлено, что инбредные мыши более восприимчивы к пневмококковой инфекции, так как не способны вырабатывать антитела к некоторым антигенам, включая пневмококковые капсульные полисахариды и другие тимуснезависимые антигены [29].

Благодаря достаточно высокой вирулентности тест-штамма мы выбрали для интраназального заражения дозу $2 \cdot 10^7$ КОЕ, которая соответствует 40 ЛД₅₀. Этого количества клеток достаточно, чтобы вызвать 100%-ю летальность у подопытных животных. Другие исследователи для достижения

летального эффекта вводят мышам более высокие дозы пневмококка [30]. Но даже высокие заражающие дозы не всегда приводят к 100%-му летальному исходу [31, 32]. В нашем случае гибель мышей наступала в течение 8 суток после интраназального заражения, что говорит о постепенном развитии пневмококковой инфекции у мышей, хотя уже в первые часы инфекции культура *S. pneumoniae* проникала не только в легкие, но и в головной мозг и почки. Через 12 ч у подопытных мышей появлялась бактериемия, а через сутки развивался выраженный сепсис. Максимальная обсемененность клетками тест-штамма легких, селезенки, головного мозга, почек и крови была выявлена на 2-е сутки инфекции, а через 3 дня после заражения среди животных начиналась гибель.

Как и другие исследователи [32], мы выявили, что летальная легочная инфекция приводит к лейкопении в периферической крови мышей. Количество лейкоцитов уменьшалось в среднем до $2,2 \cdot 10^9$ /л по сравнению с интактным контролем – $5 \cdot 10^9$ /л. Кроме того, у инфицированных мышей снижался уровень тромбоцитов – с $957 \cdot 10^9$ /л до $240 \cdot 10^9$ /л. Следует отметить, что при моделировании первичного сепсиса у мышей, вызываемого этим же штаммом пневмококка, отмечались такие же изменения в формуле крови [26].

Быстрое развитие сепсиса у мышей после интраназального заражения культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305 повлекло за собой нарушение функциональной активности печени. В ходе биохимического анализа сывороток крови мышей было установлено статистически значимое отклонение от нормы показателей АСТ и ЦФ. Средние значения концентрации глюкозы и креатинина в крови также начали смещаться в сторону патологии. Изменения биохимических показателей свидетельствует о функциональной недостаточности внутренних органов, которая приводит к летальному исходу пневмококковой инфекции.

Гистологические исследования органов мышей, проведенные через 48 ч после интраназального инфицирования культурой штамма ATCC 6305 в дозе $2 \cdot 10^7$ КОЕ, выявили выраженные патологические изменения в легких (воспалительный инфильтрат как в просвете бронхов, так и в межальвеолярном пространстве).

Штамм *S. pneumoniae* ATCC 6305 также вызывал образование в печени мышей множественных очагов некроза, что говорит о тяжести развивающейся пневмококковой инфекции.

Результаты микроскопического исследования органов мышей BALB/c, инфицированных интраназально летальной дозой (40 ЛД₅₀) культуры *S. pneumoniae* ATCC 6305, показали развитие серьезных патологических изменений к 3-м суткам пневмококковой инфекции. В воздухоносных путях и респираторном отделе легких развивается воспаление с наличием множества нейтрофилов. В печени происходит дегенерация и некроз гепатоцитов. В органах иммунной системы уменьшается объем лимфоидной ткани. В лимфатических фолликулах селезенки и лимфатических узлов наблюдается снижение пролиферации В-клеток, а в корковой зоне в долях тимуса – Т-лимфоцитов.

J.E.Gotts et al [32] наблюдали похожую патологическую картину в легких мышей, инфицированных интраназально пневмококками серотипа 19F, но в большей дозе – $1 \cdot 10^8$ КОЕ.

На 7-е сутки инфекции в легких животных наблюдались серьезные изменения, связанные с обструкцией бронхов воспалительным экссудатом, отеком альвеолярных перегородок, интерстициальным и периваскулярным клеточным воспалением.

Пригодность разработанной нами модели летальной легочной пневмококковой инфекции у мышей мы оценивали в экспериментах по ее антибиотикотерапии. В качестве лечебных препаратов использовали антибиотик фторхинолонового ряда (левофлоксацин) и β -лактамы (ампициллин), которые обладают высокой активностью *in vitro*. Минимальная подавляющая концентрация левофлоксацина в отношении тест-штамма *S. pneumoniae* ATCC 6305 составляет 0,5 мкг/мл, а ампициллина – <0,008 мкг/мл. Левофлоксацин назначали в суточных дозах 100 и 25 мг/кг, ампициллин – 400 и 100 мг/кг. Выбранные нами дозировки антибактериальных препаратов были эквивалентны средним суточным человеческим дозам [33]. Кроме того, мы применяли два режима начала терапии – через 3 ч и через 24 ч после заражения подопытных животных. Выбор раннего срока начала лечения связан с тем, что через 3 ч после заражения инфекция начинает развиваться и локализуется только в легких (7,13 LOG₁₀ КОЕ/г), головном мозге (3,56 LOG₁₀ КОЕ/г) и у некоторых мышей в почках (2,91 LOG₁₀ КОЕ/г), а бактериемия отсутствует. Очевидно, что антибиотикотерапия в этот период может дать лучший лечебный результат. Более позднее начало лечения (через сутки после заражения), когда у всех животных наблюдается выраженный сепсис и высокая бактериальная нагрузка на легкие (6,54 LOG₁₀ КОЕ/г), селезенку (6,84 LOG₁₀ КОЕ/г), головной мозг (4,84 LOG₁₀ КОЕ/г), почки (5,77 LOG₁₀ КОЕ/г) и кровь (6,7 LOG₁₀ КОЕ/г), ухудшает прогноз заболевания. Тем не менее результаты экспериментального лечения летальной пневмококковой инфекции у мышей линии BALB/c, вызываемой штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305, дали хорошие результаты. В случае левофлоксацина наблюдался дозозависимый эффект: большая доза защищала от гибели 90–100% мышей (в зависимости от срока начала терапии), меньшая доза – 50–90% мышей. Активность *in vivo* ампициллина оказалась максимальной: выжили все инфицированные животные. В то же время все мыши, не получавшие антибиотикотерапии, погибали в течение 8 суток после заражения. Следует отметить, что у 100% выживших мышей возбудитель инфекции – *S. pneumoniae* ATCC 6305 – элиминировал из организма.

Заключение

В результате работы была изучена и апробирована модель летальной пневмонии, вызываемой вирулентным штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305. Экспериментальная пневмококковая инфекция поддается лечению антибиотиками и может быть использована для оценки терапевтической эффективности различных антибактериальных препаратов, предназначенных для борьбы с пневмококковой инфекцией.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Tchidjou HK, Vescio F, Boros S, Guemkam G, Minka E, Lobe M, et al. Seasonal pattern of hospitalization from acute respiratory infections in Yaoundé, Cameroon. *J Trop Pediatr*. 2010 Oct;56(5):317-20. DOI: 10.1093/tropej/fmp127
2. Loughran AJ, Orihuela CJ, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. *Microbiol Spectr*. 2019 Mar;7(2):10.1128/microbiolspec.GPP3-0004-2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0004-2018
3. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al.; Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009 Sep 12;374(9693):893-902. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61204-6
4. Chen Y, Williams E, Kirk M. Risk factors for acute respiratory infection in the Australian community. *PLoS One* 2014;9(7):e101440. DOI: 10.1371/journal.pone.0101440
5. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews. Microbiology*. 2018;16(6):355-367. DOI: 10.1038/s41579-018-0001-8
6. 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):319-324. DOI: 10.1093/infdis/163.2.319/
7. Trolle S, Chachaty E, Kassis-Chikhani N, Wang C, Fattal E, Couvreur P, et al. Intranasal immunization with protein-linked phosphorylcholine protects mice against a lethal intranasal challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine*. 2000;18(26):2991-2998. DOI: 10.1016/S0264-410X(00)00089-X
8. Lacy M, 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):477-481. DOI: 10.1093/jac/44.4.477
9. Melhus Å, Ryan AF. A mouse model for acute otitis media. *APMIS*. 2003;111(10):989-994. DOI: 10.1034/j.1600-0463.2003.1111012.x
10. Djukic M, Böttcher T, Wellmer A, Gerber J, Brocke VV, Eiffert H, et al. Moxifloxacin in experimental *Streptococcus pneumoniae* cerebritis and meningitis. *Neurocrit Care*. 2005;2(3):325-329. DOI: 10.1385/NCC:2:3:325
11. Ramisse F, Binder P, Szatanik M, Alonso JM. Passive and active immunotherapy for experimental pneumococcal pneumonia by polyvalent human immunoglobulin or F(ab')₂ fragments administered intranasally. *J Infect Dis*. 1996;173(5):1123-1128. DOI: 10.1093/infdis/168.4.1030/
12. Rubins JB, Charboneau D, Fasching C, Berry AM, Paton JC, Alexander JE, et al. Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(4):1339-1346. DOI: 10.1164/ajrccm.153.4.8616564
13. Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M, Paton JC, Boulnois GJ, Andrew PW, et al. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis*. 1995;172(1):119-123. DOI: 10.1093/infdis/172.1.119
14. Nuermberger E, Helke K, Bishai WR. Low-dose aerosol model of pneumococcal pneumonia in the mouse: utility for evaluation of antimicrobial efficacy. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;26(6):497-503. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.08.022

15. Azoulay-Dupuis E, Bédos JP, Vallee E, Pocard JJ. Comparative activity of fluorinated quinolones in acute and subacute *Streptococcus pneumoniae* pneumonia models: efficacy of temafloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 1991;28(SupplC):45-53. DOI: 10.1093/jac/28.suppl_c.45
16. 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
17. Kim J-Y, Seo S-M, Lee H-K, Kim H-W, Choi Y-K. Comparison of the virulence of *Streptococcus pneumoniae* in ICR mouse stocks of three different origins. *Laboratory Animal Research.* 2019;35:5. DOI: 10.1186/s42826-019-0002-4
18. Крышень КЛ, Кухаренко АЕ, Вичаре АС, Гайдай ЕА, Крышень АА, Гушин ЯА, и др. Противовоспалительные и иммуномодулирующие эффекты бактериального лизата на моделях асептического лимфаденита и пневмококковой пневмонии *in vivo*. *Медицинская иммунология.* 2020;22(1):111-122. / Kryshen KL, Kukharenko AE, Vichare AS, Gaidai EA, Kryshen AA, Gushchin YaA, et al. Anti-inflammatory and immunomodulating effects of the bacterial lysate in the *in vivo* models of aseptic lymphadenitis and pneumococcal pneumonia. *Medical Immunology (Russia).* 2020;22(1):111-122. DOI: 10.15789/1563-0625-AAI-1758 (In Russian).
19. Weber SE, Haijun T, Pirofski L-A. CD8+ Cells Enhance Resistance to Pulmonary Serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice. *Immunol.* 2011;186(1):432-442. DOI: 10.4049/jimmunol.1001963
20. Wang E, Bergeron Y, Bergeron MG. Ceftriaxone pharmacokinetics in interleukin-10-treated murine pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(5):721-726. DOI: 10.1093/jac/dki085
21. Andonegui G, Goring Kim, Liu D, McCafferty D-M, Winston BW. Characterization of *S. pneumoniae* pneumonia-induced multiple organ dysfunction syndrome: an experimental mouse model of gram-positive sepsis. *Shock.* 2009;31(4):423-8. DOI: 10.1097/SHK.0b013e318188c273
22. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(4):288-301. DOI: 10.1038/nrmicro1871
23. De Hennezel L, Ramisse F, Binder P, Marchal G, Alonso JM. Effective combination therapy for invasive pneumococcal pneumonia with ampicillin and intravenous immunoglobulins in a mouse model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:316-318. DOI: 10.1128/AAC.45.1.316-318.2001
24. Müller-Redetzky HC, Wienhold SM, Berg J, Hocke AC, Hippenstiel S, Hellwig K, et al. Moxifloxacin is not anti-inflammatory in experimental pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:830-840. DOI: 10.1093/jac/dku446
25. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Перескокова ЕС, Ганина ЕА. Мышинные модели пневмококкового сепсиса, вызываемого вирулентным и авирулентным штаммами *Streptococcus pneumoniae*. *Бактериология.* 2023;8(1):7-16. / Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Pereskokova ES, Ganina EA. Mouse models of pneumococcus sepsis caused by virulent and avirulent strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Bacteriology.* 2023;8(1):7-16. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-7-16 (In Russian).
26. Aaberge IS, Eng J, Lemark G, Løvik M. Virulence of *Streptococcus pneumoniae* in mice: a standardized method for preparation and frozen storage of the experimental bacterial inoculum. *Microb Path.* 1995;18(2):141-152. DOI: 10.1016/S0882-4010(95)90125-6
27. Saeland E, Vidarsson G, Jonsdottir I. Pneumococcal pneumonia and bacteremia model in mice for the analysis of protective antibodies. 2000;29(2):81-91. DOI: 10.1006/mpat.2000.0363
28. Borsa N, Pasquale M, Restrepo M. Animal Models of Pneumococcal pneumonia. *Int J Mol Sci.* 2019;20:4220. DOI: 10.3390/ijms20174220
29. Zhang X, Cui J, Wu Y, Wang H, Wang J, Qiu Y, et al. *Streptococcus pneumoniae* Attenuated Strain SPY1 with an Artificial Mineral Shell Induces Humoral and Th17 Cellular Immunity and Protects Mice against Pneumococcal Infection. *Front Immunol.* 2018;8:1983. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01983
30. Ngwa DN, Singh SK, Gang TB, Agrawal A. Treatment of Pneumococcal Infection by Using Engineered Human C-Reactive Protein in a Mouse Model. *Front Immunol.* 2020 Oct 7;11:586669. DOI: 10.3389/fimmu.2020.586669
31. Gotts JE, Bernard O, Chun L, Croze RH, Ross JT, Nessler N, et al. Clinically relevant model of pneumococcal pneumonia, ARDS, and nonpulmonary organ dysfunction in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2019 Nov 1;317(5):L717-L736. DOI: 10.1152/ajplung.00132.2019
32. Majhi A, Adhikary R, Bhattacharyya A, Mahanti S, Bishayi B. Levofloxacin-ceftriaxone combination attenuates lung inflammation in a mouse model of bacteremic pneumonia caused by multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* via inhibition of cytolytic activities of pneumolysin and autolysin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Sep;58(9):5164-80. DOI: 10.1128/AAC.03245-14
33. Гуськова ТА. Токсикология лекарственных средств. М., 2003. / Gus'kova TA. Toksikologiya lekarstvennykh sredstv. M., 2003. (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 in Biological Sciences, Senior Researcher of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Tatyana I. Kombarova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Evgenia S. Pereskokova, Junior Researcher of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Elena A. Ganina, Researcher of the laboratory of nanobiotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор