



ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК: 599.323.45: 616.9-092.9

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.3.18

СРАВНЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ НА МОДЕЛИ ЛИЧИНКИ БОЛЬШОЙ ВОСКОВОЙ МОЛИ И МЫШИНОЙ МОДЕЛИ. ВОЗМОЖНА ЛИ ЗАМЕНА?

Тараскин А.О.* – мл. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-4039-9266); Крышень К.Л. – руководитель отдела специфической токсикологии и микробиологии (ORCID 0000-0003-1451-7716).

АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»

*taraskin.ao@doclinika.ru

Ключевые слова: вирулентность, LD50, *Galleria mellonella*, мышь линии ICR CD1, доклинические исследования, концепция 3R.

Key words: virulence, LD50, *Galleria mellonella*, ICR CD1 mouse, preclinical studies.

Поступила: 12.07.2023

Принята к публикации: 11.09.2023

Опубликована онлайн: 29.09.2023



РЕФЕРАТ

На сегодняшний день проведение экспериментов с участием животных затруднено по причине дороговизны, сложности воспроизводимости, а также этическими нормами современного общества. Концепция 3R, разработанная в прошлом столетии поощряет разработку альтернативных тест-систем. Среди прочих альтернативных тест-систем особое место занимает личинка большой восковой моли. Использование личинок большой восковой моли (*Galleria mellonella*) в качестве тест-системы для определения вирулентных свойств микроорганизмов является перспективным направлением и создает возможность удешевления исследований. Однако, не во всех экспериментах исследователи могли зарегистрировать одинаковые полетальные дозы для выбранных штаммов при сравнении тест-системы *Galleria mellonella* и млекопитающих. Ранее было проведено исследование, где среди прочего определили полетальные дозы некоторых штаммов при использовании тест-системы *Galleria mellonella*. Целью данного исследования было сравнить полетальные дозы выбранных штаммов при введении их *G. mellonella* и мышам. Для проведения эксперимента животным внутривенно вводили суспензии эталонных штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922 (ВКПМ В – 8076), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303 и клинических изолятов *Escherichia coli* ENV 194, *Staphylococcus aureus* SA 0077 (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* 1068 19 A. После заражения за животными наблюдали ежедневно на протяжении всего эксперимента. Во время ежедневного клинического наблюдения визуально отмечали (при наличии) клинические признаки, свидетельствующие о развитии инфекционного процесса, а также регистрировали массу тела.

После определения LD₅₀ результаты были сопоставлены с полученными данными в эксперименте с личинками большой восковой моли. В результате сравнения полулетальных доз выбранных штаммов можно сделать вывод об отсутствии четкой корреляции между данными, полученными в двух экспериментах.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Вирулентность – это степень патогенности микроорганизма, фенотипическое выражение патогенного генотипа. Вирулентность устанавливается в острых экспериментах с последующим расчетом полулетальной дозы (LD₅₀), способной вызвать гибель половины инфицированных животных. Для этой цели чаще всего используют мышей и другие виды, например, морских свинок и кроликов. Использование животных в доклинических исследованиях – одна из сложнейших этических проблем современного мира. Вопрос о сокращении использования позвоночных животных возник ещё в прошлом столетии. В шестидесятых годах 20 века была сформулирована концепция 3R, на основании которой научное сообщество было призвано заменять млекопитающих на животных, находящихся на более низких филогенетических уровнях, при проведении экспериментов [1, 2]. В некоторых экспериментах уже сейчас позвоночные заменены насекомыми, в том числе и личинкой большой восковой моли (*G. mellonella*) [3, 4]. По сравнению с традиционными тест-системами, состоящими большей частью из млекопитающих, *G. mellonella* дешевле, проще в уходе (так как не требует особых условий содержания), а короткая продолжительность жизни делает их идеальными для высокопроизводительных исследований. Сходство с каскадами иммунного ответа у млекопитающих и насекомых послужило причиной активного использования личинок для моделирования инфекций [5]. В одном из исследований на личинках большой восковой моли авторы подтвердили гипотезу о корреляции вирулентности штаммов стрептококков группы А при заражении личинки восковой моли и мышей [4]. Однако, в эксперименте со штаммами *Acinetobacter baumannii* было установлено, что для некоторых штаммов LD₅₀ при заражении личинок и мышей

совпадали, а для некоторых она различалась [6]. Из чего следует, что тест-система *G. mellonella* не всегда может послужить заменой традиционных тест-систем.

Ранее было проведено исследование, где была установлена полулетальная доза некоторых бактериальных штаммов для личинки большой восковой моли [7]. Данное исследование провели, чтобы подтвердить возможность замены мышей на личинок в экспериментах с участием этих штаммов. Цель – сравнить LD₅₀ выбранных штаммов при введении их *G. mellonella* и мышам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHOD

Микроорганизмы

Для индукции патологии выбраны бактериальные штаммы, которые использовались в эксперименте на личинках [7]. Они были представлены эталонными штаммами из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC): *Escherichia coli* ATCC 25922 (ВКПМ В – 8076), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303, а также клиническими изолятами, из коллекции ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России: *Escherichia coli* ENV 194, *Staphylococcus aureus* SA 0077 (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* 1068 19 А. Перед началом эксперимента микроорганизмы *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* были активированы высевом на Tryptic Soy агар, штаммы *Streptococcus pneumoniae* высевали на Tryptic Soy агар с добавлением дефибринированной бараньей крови до окончательной концентрации 5,0%. Условия культивирования на питательных средах для получения культуры: инкубация в термостате при температуре +35±2 °С в аэробной атмосфере в течение 24 часов для штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, для *Streptococcus pneu-*

toniae при температуре $+35\pm 2$ °C в течение 48 часов атмосфера 4-6 % CO₂.

Животные

В исследовании было использовано 130 самцов мыши линии ICR CD1 в возрасте от 8 до 12 недель. Животные были предоставлены питомником АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Для эксперимента животных распределили в группы по 5 особей методом модифицированной блочной рандомизации [8].

После введения бактериального штамма животные содержались в индивидуально-вентилируемых клетках Shanghai Pretty Industries Co., Ltd (Китай) по 5 особей в одной клетке. Животных содержали в условиях с соблюдением основных зооигиенических требований: температурный режим 18-26 °C, влажность 40–50%, 12-часовой световой день, свободный доступ к корму и воде [9]. Протокол данного эксперимента был одобрен биоэтической комиссией АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (протокол № 1.15/22 от 08.04.2022).

Дизайн эксперимента.

В соответствии с правилами 3R было принято решение о проведении экспериментальной части исследования в два этапа для уменьшения количества животных. Целью первого этапа являлась предварительная оценка летальности штаммов при внутрибрюшинном введении суспензии бактерий (штаммы *St. aureus*, *Str. pneumoniae*, *E.Coli*). Для этого были сформированы 6 групп по 5 особей. В первый день каждое животное взвешивали, затем внутрибрюшинно заражали суспензией выбранного штамма в дозе $2,5\times 10^{10}$ КОЕ/кг. За животными наблюдали ежедневно на протяжении всего эксперимента. Во время ежедневного клинического наблюдения визуально отмечали (при наличии) клинические признаки, свидетельствующие о развитии инфекционного процесса. С целью объективизации полученных данных и оценки выраженности патологии применялась балльная система (таблица 1), основанная на степени выраженности клинического признака. Количество баллов здорового

животного было равно 5 как сумма максимальных баллов для каждого показателя. По мере развития патологического процесса количество баллов снижалось. Животные, погибшие до окончания этапа, были подвергнуты процедуре некропсии, в процессе которой регистрировали макроскопические изменения в органах и тканях. Выживших к 7 дню животных эвтаназировали путем цервикальной дислокации и выборочно подвергали патоморфологическому исследованию.

После окончания первого этапа были отобраны штаммы для второго этапа, выбор производили согласно разработанной блок-схеме (рис. 1).

Для второго этапа сформировали 20 групп по 5 особей. Для каждого штамма использовали 5 доз заражающей суспензии ($2,5\times 10^9$ КОЕ/кг, $2,5\times 10^8$ КОЕ/кг, $2,5\times 10^7$ КОЕ/кг, $2,5\times 10^6$ КОЕ/кг, $2,5\times 10^5$ КОЕ/кг). Каждой дозой суспензии заражали 5 особей. Таким образом, одним штаммом были заражены 5 групп, каждой группе вводили определенную дозу суспензии. Схема манипуляций на втором этапе осталась прежней. После второго этапа были установлены диапазоны полужетальных доз для выбранных штаммов.

Статистическая обработка цифрового материала (коэффициент корреляции Спирмена) была проведена с использованием программ Microsoft Excel и GraphPad Prism 9.2.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

По результатам первого этапа было установлено, что необходимой вирулентностью обладали только штаммы *E. coli* и *Str. pneumoniae* (рис. 2). Смертность в группах наблюдали на следующий день после заражения. Штаммы *Str. pneumoniae* ATCC 6303 и *E. coli* ATCC 25922 обладали 100% летальностью при использовании выбранной дозы. Летальность штаммов *Str. pneumoniae* 1068 19A и *E. coli* ENV 194 составила 80% и 60%, соответственно. При проведении исследования у животных проводили клинический осмотр и взвешивание. Во время клинического осмотра фиксировали признаки развития заболевания. По мере прогрес-

Таблица 1

Балльная система учета показателей здоровья мышей

Критерий	Описание	Оценка
Реакция на раздражители	Сниженная	0
	Норма	1
Масса тела	Снижается	0
	Не изменяется или повышается	1
Положение тела в пространстве	Сгорбленная поза	0
	Нормальная поза	1
Состояние шерсти	Взъерошенная и грязная	0
	Взъерошенная	1
	Норма	2



Рис. 1 – Блок-схема возможных вариантов развития эксперимента

сирования патологических процессов, вызванных заражением животных, уменьшалось количество баллов (рис. 3). Снижение количества баллов было сопоставимо с изменением массы тела экспериментальных животных на протяжении первого этапа.

Чаще остальных признаков перед гибелью регистрировали снижение активности и сгорбленную позу. Масса тела животных, зараженных штаммами *E. coli*

ATCC 25922 и *Str. pneumoniae* ATCC 6303 снижалась постепенно вплоть до гибели. Масса тела животных, зараженных штаммами *E. coli* ENV 194 и *Str. pneumoniae* 1068 19A, снизилась после заражения, но начиная с четвертого и пятого дней, соответственно, постепенно восстанавливалась. У животных, зараженных штаммами *St. aureus*, масса тела изменялась схожим образом.

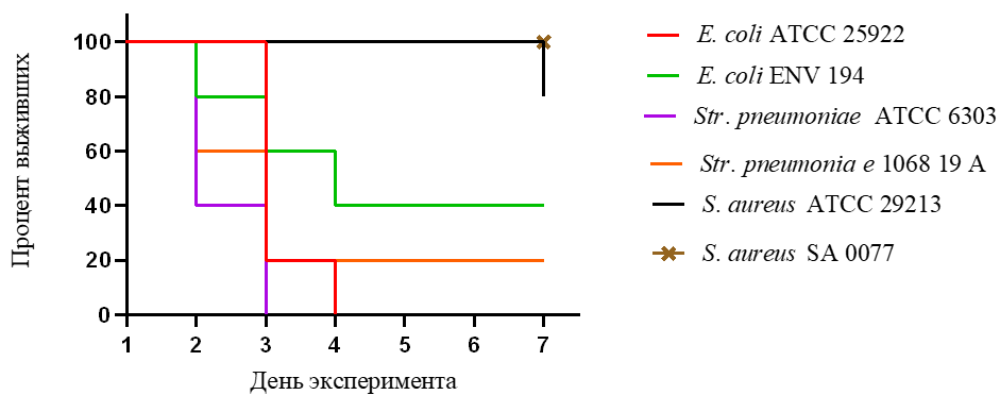


Рис. 2 – Кривая выживаемости Каплана-Мейера на первом этапе.

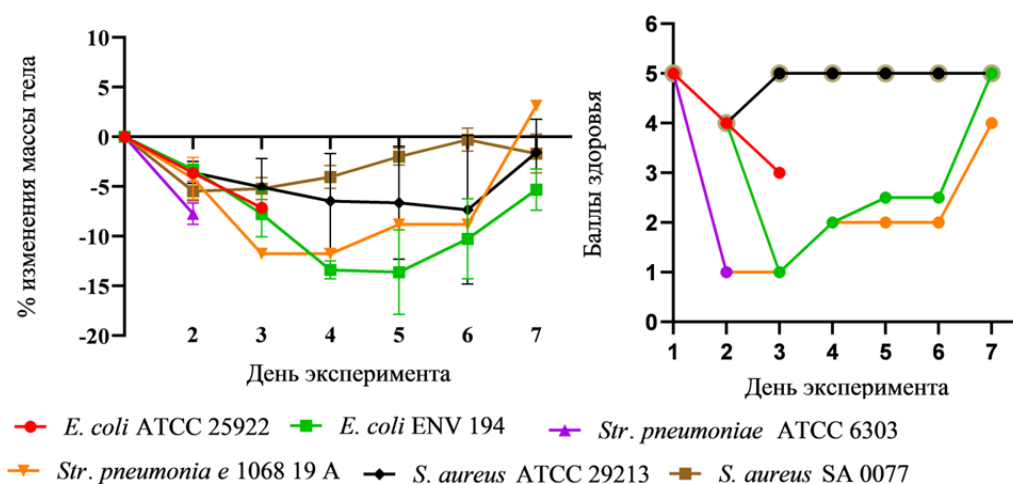


Рис. 3 – Изменение массы тела животных на первом этапе (а) и изменение количества баллов (б)

Согласно вышеизложенному плану, штаммы *S. aureus* не были выбраны для проведения второго этапа, так как летальность в группах, зараженных данными штаммами, не достигла необходимой отметки. Исходя из полученных данных можно утверждать, что полуметальная доза данных штаммов выше используемой дозы ($>2,5 \times 10^{10}$ КОЕ/кг).

На основании полученных результатов для проведения второго этапа были выбраны штаммы *E. coli* и *Str. pneumoniae*. В качестве максимальной концентрации вводимой суспензии использована доза $2,5 \times 10^9$ и еще 4 десятикратных разведений. На втором этапе животным после взвешивания внутрибрюшинно вводили суспензию выбранного штамма в определенной дозе. Далее ежедневно, в течение 7 дней, проводили клинический осмотр и взвешивание. По итогам второго этапа установлено, что смертность наблюдалась только в группах, зараженных штаммом *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303 (рис.4). Другие штаммы на втором этапе не вызвали гибели. При клиническом осмотре в группах животных, зараженных штаммами *E. coli* и *Str. pneumoniae* 1068 19 А не было установлено каких-либо отклонений кроме изменения массы тела.

При заражении мышей в четырех установленных дозах штаммом *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303 при клиническом осмотре регистрировали все признаки развития инфекционного процесса. В группе с наименьшей дозой ухудшения состояния после инфицирования данным штаммом не наблюдалось, смертность в этой группе также отсутствовала (рис. 4). У животных зараженных штаммом *E. coli* ATCC 25922 на втором этапе наблюдалось дозозависимое изменение массы тела (рис.5). Так, в группах животных, зараженных в дозах $2,5 \times 10^9$ КОЕ/кг и $2,5 \times 10^8$ КОЕ/кг наблюдалось снижение массы после заражения, в то время как в группах с меньшими дозами наблюдалось повышение. Аналогичная динамика массы тела была и в группах, зараженных штаммом *E. coli* ENV 19. Масса тела животных, инокулируемых штаммом *Str. pneumoniae* ATCC 6303, снизилась после заражения на второй день в трех группах. Заражение животных штаммом *Str. pneumoniae* 1068 19 А не вызвало значительного снижения массы тела экспериментальных животных, в группах, зараженных данным штаммом на втором этапе наблюдался физиологический прирост массы тела.

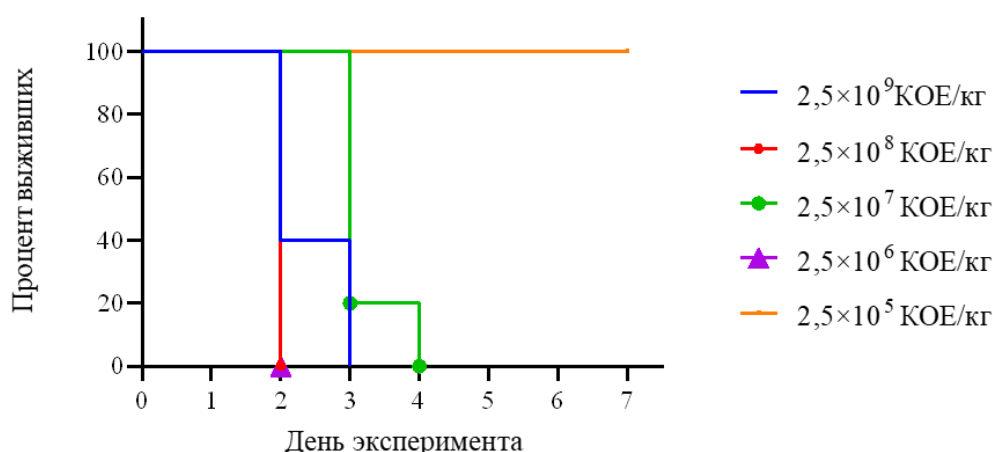


Рис. 4 – Кривая выживаемости Каплана-Мейера на втором этапе для животных, зараженных суспензиями *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303.

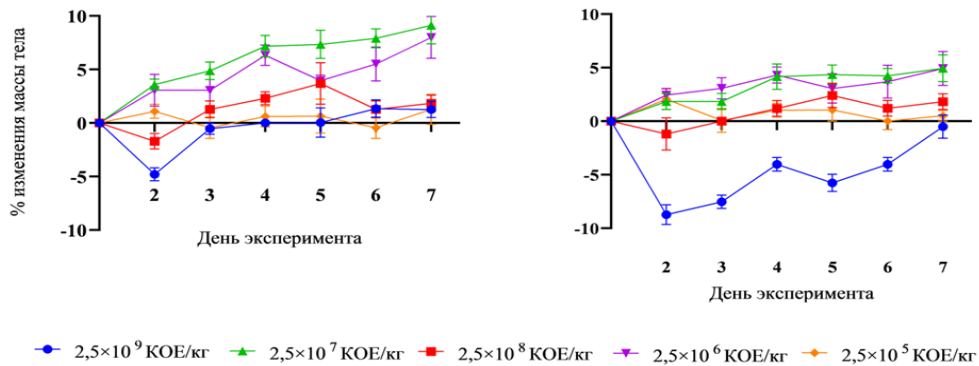


Рис. 5 – Изменение массы тела животных на втором этапе (а) *E. coli* ATCC 25922 и (б) *E. coli* ENV 194

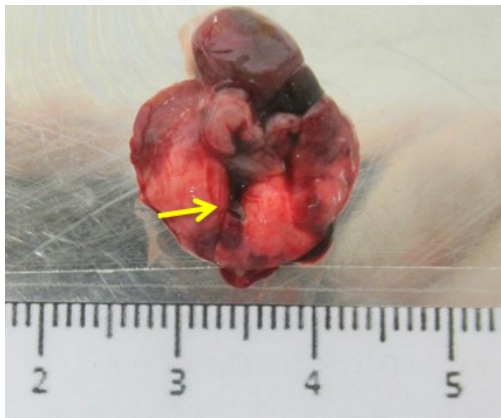


Рис. 6 – Эвисцерированные лёгкие и сердце: отёк, гиперемия и кровоизлияния в лёгких. Стрелкой указано кровоизлияние.



Рис. 7 – Место введения (брюшина и брюшная полость): спайка между брюшиной и придатком семенника.

У животных, которые погибали до окончания эксперимента, чаще всего регистрировали полнокровие органов и тканей. Зарегистрированные изменения внутренних органов у павших животных в совокупности со смертельным исходом сопоставимы с описанием гибели из-за развития септического шока в литературных данных [10, 11]. У большинства животных регистрировали отек и полнокровие внутренних органов (рис. 6) во время внеплановой некропии. Данные призна-

ки, предположительно, связаны с внезапным сердечнососудистым коллапсом, который развился на фоне септического шока. У планово эвтаназированных животных, выборочно подвергнутых процедуре некропии, также обнаруживали отек и кровенаполненность сосудов легких и головного мозга (рис. 6). Макроскопические изменения, такие как спайки, локализованные абсцессы, увеличенные лимфоузлы, обнаруженные в органах (рис. 7-9) у животных, которых заражали



Рис. 8 – Эвисцерированная печень: абсцесс на диафрагмальной поверхности средней доли.

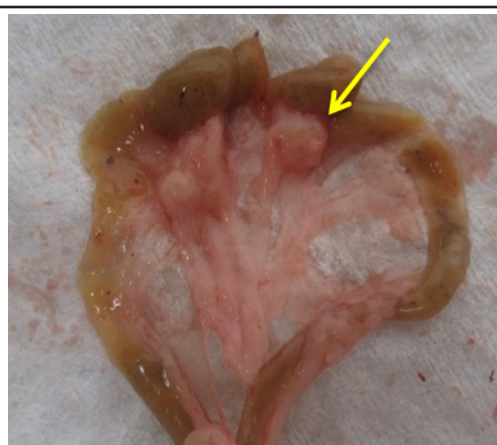


Рис. 9 – Эвисцерированный тонкий кишечник: брыжеечные лимфатические узлы увеличены.

Таблица 2

Сравнение данных LD₅₀ бактериальных штаммов, полученных у мышей и личинок большой восковой моли

Штамм	Личинка восковой моли [7]	Мыши
	LD ₅₀ , КОЕ/кг	
<i>Str. pneumoniae</i> ATCC 6303	$5,6 \times 10^7$	$2,5 \times 10^5 - 2,5 \times 10^6$
<i>Str. pneumoniae</i> 1068 19A	$3,56 \times 10^6$	$2,5 \times 10^9 - 2,5 \times 10^{10}$
<i>E. coli</i> ATCC 922	$2,48 \times 10^8$	$2,5 \times 10^9 - 2,5 \times 10^{10}$
<i>E. coli</i> ENV 194	$< 10^7$	$2,5 \times 10^9 - 2,5 \times 10^{10}$
<i>St. aureus</i> ATCC 29213	$8,8 \times 10^9$	$> 2,5 \times 10^{10}$
<i>St. aureus</i> SA 0077	$1,92 \times 10^9$	$> 2,5 \times 10^{10}$

суспензиями штаммов, являются признаками воспалительного процесса в брюшной полости.

Сравнение данных двух исследований В таблице 2 представлены результаты расчета LD₅₀ выбранных штаммов. Наибольшей вирулентностью при тестировании на личинках обладал штамм *Str. pneumoniae* 1068 19A, в то время как этот же штамм оказался маловирулентным на мышях. Самым вирулентным для мышей был штамм *Str. pneumoniae* ATCC 6303. Также был проведен корреляционный

анализ между полученными полулетальными дозами с такими же из исследования на личинках [7]. Для этого количество КОЕ/кг было преобразовано в десятичный логарифм. После полученные данные были проанализированы методом ранговой корреляции Спирмена (r). Исходя из полученных данных корреляционного анализа установлено, что коэффициент ранговой корреляции статистически не значим и ранговая корреляционная связь между данными по двум экспериментами незначимая ($r=0,678$; $p=0,113$).

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Результаты проведенного исследования позволили установить вирулентные свойства некоторых грамположительных штаммов (*Str. pneumoniae* ATCC 6303, *Str. pneumoniae* 1068 19 A, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* SA 0077) и грамотрицательных штаммов (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ENV 194) при однократном внутрибрюшинном введении бактериальной суспензии мышам линии ICR CD-1. Из вышеперечисленных штаммов наибольшей вирулентностью обладал штамм *Str. pneumoniae* ATCC 6303. Проведенный анализ позволяет сделать выводы об отсутствии четкой корреляции между данными полученными в двух экспериментах.

Расхождение в результатах экспериментов, проведенных на разных моделях, не редкость. Иногда воспроизводимость страдает даже при использовании одной и той же модели. В случае с большой восковой молью это может произойти по ряду причин. Как уже говорилось ранее использование личинок восковой моли в исследовательских целях это перспективная альтернатива традиционным моделям, основанным на использовании млекопитающих. Однако, она находится на ранних этапах развития. Для того чтобы сделать *G. melonella* полноценной тест-системой для доклинических исследований исследователям необходимо будет решить ряд проблем. Основным препятствием является отсутствие лицензированных центров выращивания личинок. Многие исследователи закупают личинок восковой моли в рыболовных магазинах, где используют антибиотики и другие препараты для увеличения срока жизни личинок, которые влияют на метаболизм и восприимчивость к заражению различными бактериями [12]. Использование разных методик содержания также может повлиять на результаты исследования. Были опубликованы данные заявляющие, что увеличение температуры в помещении содержания личинок увеличивает экспрессию антимикробных протеинов, в то время как воздействие низких температур снижает количество гемоцитов и кон-

центрацию белков, влияющих на восприимчивость личинок к микроорганизмам [13, 14]. Тест-системе восковой моли не хватает того генетического разнообразия, которое есть на данный момент в других моделях. Большое количество стандартизированных линий помогло бы ученым расширить знания о взаимодействии патогена и организма.

Таким образом, для улучшения модели личинки большой восковой моли необходимо стандартизировать условия разведения и содержания, чтобы позволить воспроизводить эксперименты с минимальной неопределенностью. Исследования, направленные на сопоставление данных, стандартизацию методов и распространение этой информации будут способствовать дальнейшему повышению качества модели *G. melonella*. Без этих мер исследования с использованием личинок большой восковой моли будут ограничены отдельными экспериментами.

COMPARISON OF THE VIRULENCE OF SOME MICROORGANISM STRAINS IN A WAX MOTH LARVAE MODEL AND A MOUSE MODEL. IS A REPLACEMENT POSSIBLE?

Taraskin A.O. * – junior researcher (ORCID 0000-0003-4039-9266); **Kryshen K.L.** – head of the department of specific toxicology and microbiology (ORCID 0000-0003-1451-7716).

RMC «HOME OF PHARMACY»

*taraskin.ao@doclinika.ru

ABSTRACT

To date, conducting experiments involving animals is difficult due to the high cost, the complexity of reproducibility, as well as the ethical standards of modern society. The 3R concept developed in the last century encourages the development of alternative test systems. Among other alternative test systems, the wax moth larva occupies a special place. The use of larvae of the great wax moth (*Galleria melonella*) as a test system for determining the virulent properties of microorganisms is a promising direction and makes it possible to reduce the cost of research. However, not in all experiments,

researchers could register the same semi-lethal doses for selected strains when comparing the *Galleria mellonella* test system and mammals. Previously, a study was conducted, where, among other things, the semi-lethal doses of some strains were determined using the *Galleria mellonella* test system. The aim of this study was to compare the semi-lethal doses of selected strains when administered to *G. mellonella* and mice. For the experiment, the animals were injected intraperitoneally with suspensions of reference strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 (VKPM B - 8076), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303 and clinical isolates of *Escherichia coli* ENV 194, *Staphylococcus aureus* SA 0077 (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* 1068 19 A. After infection, the animals were observed daily throughout the experiment. During daily clinical observation, visually noted (if any) clinical signs indicating the development of an infectious process, and also recorded body weight. After determining the LD₅₀, the results were compared with the data obtained in the experiment with the larvae of the great wax moth. As a result of comparing the semi-lethal doses of the selected strains, it can be concluded that there is no clear correlation between the data obtained in the two experiments.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. MacArthur Clark, Judy. "The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement." *The British journal of nutrition* vol. 120, s1 (2018): S1-S7
2. Макарова М.Н., Матичин А.А., Матичина А.А., Макаров В.Г. Принципы выбора животных для научных исследований. Сообщение 1. Выбор модельных организмов на основании филогенетических связей. Лабораторные животные для научных исследований. 2022; 2.
3. Desbois, Andrew P, and Peter J Coote. "Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antimicrobial chemotherapy." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* vol. 66, 8 (2011): 1785-90.

4. Sheehan, Gerard et al. "Immune priming: the secret weapon of the insect world." *Virulence* vol. 11, 1 (2020): 238-246. doi:10.1080/21505594.2020.1731137
5. Randall J Olsen et al. "Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae)." *Virulence* vol. 2, 2 (2011): 111-9.
6. Jacobs, Anna C et al. "AB5075, a Highly Virulent Isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a Model Strain for the Evaluation of Pathogenesis and Antimicrobial Treatments." *mBio* vol. 5, 3 e01076-14. 27 May. 2014, doi:10.1128/mBio.01076-14
7. Салмова Ю.В., Никифорова Л.П., и Боровкова К.Е.. "Разработка модели бактериальной инфекции личинок *Galleria mellonella* (большая восковая моль)" Лабораторные животные для научных исследований, no. 3, 2022, pp. 40-49.
8. Селезнева АИ, Макарова МН, Рыбакова АВ. Методы рандомизации животных в эксперименте. *Международный вестник ветеринарии*. 2014;(2):84-9..
9. Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб, 2012. – 48 с.
10. Garofalo AM, Lorente-Ros M, Gonzalez G, et al. Histopathological changes of organ dysfunction in sepsis. *Intensive Care Med* Exp. 2019;7(Suppl 1):45. 2019 Jul 25.
11. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*. 2009;119(10):2868-2878.
12. Buyukguzel, E.; Kalender, Y. Penicillin-induced oxidative stress: Effects on antioxidant response of midgut tissues in instars of *Galleria mellonella*. *J. Econ. Entomol.* 2007, 100, 1533–1541.
13. Browne N, Surlis C, Maher A et al. Prolonged pre-incubation increases the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to bacterial and fungal infection. *Virulence*. 2015;6:458–65.

REFERENCES

1. MacArthur Clark, Judy. "The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement." *The British*

- journal of nutrition vol. 120,s1 (2018): S1-S7
2. Makarova M.N. , Matichin A.A., Matichina A.A., Makarov V.G. Principles for selecting animals for scientific research. Message 1. Selection of model organisms based on phylogenetic relationships. Laboratory animals for scientific research. 2022; 2. [in Russ.]
3. Desbois, Andrew P, and Peter J Coote. "Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* vol. 66,8 (2011): 1785-90.
4. Sheehan, Gerard et al. "Immune priming: the secret weapon of the insect world." *Virulence* vol. 11,1 (2020): 238-246. doi:10.1080/21505594.2020.1731137.
5. Randall J Olsen et al. "Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae)." *Virulence* vol. 2,2 (2011): 111-9.
6. Jacobs, Anna C et al. "AB5075, a Highly Virulent Isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a Model Strain for the Evaluation of Pathogenesis and Antimicrobial Treatments." *mBio* vol. 5,3 e01076-14. 27 May. 2014, doi:10.1128/mBio.01076-14
7. Salmova Yu.V., Nikiforova L.R., and Borovkova K.E.. "Development of a model of bacterial infection of the larvae of *Galleria mellonella* (large wax moth)" *Laboratory animals for scientific research*, no. 3, 2022, pp. 40-49. [in Russ.]
8. Selezneva AI, Makarova MN, Rybakova AV. Methods of randomization of animals in the experiment. *International Veterinary Bulletin*. 2014;(2):84–9. [in Russ.]
9. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes. St. Petersburg, 2012. – 48 p. [in Russ.]
10. Garofalo AM, Lorente-Ros M, Gonzalez G, et al. Histopathological changes of organ dysfunction in sepsis. *Intensive Care Med* Exp. 2019;7(Suppl 1):45. 2019 Jul 25.
11. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*. 2009;119(10):2868-2878.
12. Buyukguzel, E.; Kalender, Y. Penicillin-induced oxidative stress: Effects on antioxidant response of midgut tissues in instars of *Galleria mellonella*. *J. Econ. Entomol*. 2007, 100, 1533–1541.
13. Browne N, Surlis C, Maher A et al. Prolonged pre-incubation increases the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to bacterial and fungal infection. *Virulence*. 2015;6:458–65.