

# Разработка модели бактериальной инфекции личинок *Galleria mellonella* (большая восковая моль)

Ю.В. Салмова\*, Л.Р. Никифорова, К.Е. Боровкова

АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Россия

\* E-mail: [salmova.uv@doclinika.ru](mailto:salmova.uv@doclinika.ru)

**Резюме.** В последние годы в качестве альтернативной модели для изучения бактериальных инфекций, а также для оценки эффективности антибактериальных препаратов широко используют *Galleria mellonella* — личинки большой восковой моли. Преимущества данной модельной системы — отсутствие биоэтических ограничений, возможности использования большого количества животных в эксперименте, короткий жизненный цикл. Личинки могут расти при широком температурном диапазоне (18–37 °С), что позволяет исследовать на данной модели патогены человека, которым в большинстве случаев необходима инкубация при 37 °С. Несмотря на отсутствие у насекомых приобретенного иммунитета, врожденный иммунитет восковой моли имеет значительное сходство с иммунным ответом позвоночных животных, в том числе и человека.

Цель работы — разработка модели бактериальной инфекции личинок большой восковой моли, включающая сравнительную оценку как эффективности заражения личинок эталонными штаммами микроорганизмов и их клиническими изолятами, так и применения препаратов Рифампицин (ПАО «Красфарма», Россия) и Ципрофлоксацин (Эльфа Лабораториз, Индия) на инфицированных личинках.

Данное исследование предусматривало три последовательных этапа, на I этапе проводили сравнительную оценку вирулентности эталонных штаммов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* и их клинических изолятов, а также определяли инфекционную дозу бактериальной суспензии для инъекции личинкам. Таким образом, было установлено, что исследуемые клинические изоляты *St. aureus*, *Str. pneumoniae* и *E. coli* оказались более вирулентными относительно эталонных штаммов микроорганизмов.

На II этапе исследования определяли минимально подавляющую концентрацию *in vitro* для каждого штамма микроорганизма, что позволяло определить чувствительность штаммов к исследуемым антибиотикам, а именно ципрофлоксацину и рифампицину.

На III этапе после заражения личинок инфекционной дозой была проведена антибактериальная терапия, при этом полученные результаты подтвердили данные II этапа *in vitro*. Наблюдали гибель личинок, зараженных резистентными штаммами *St. aureus* и *E. coli* к ципрофлоксацину и рифампицину соответственно.

Данная модель характеризовалась изменением общего состояния личинок (меланизация, подвижность, образование кокона) и гибелью животных в зависимости от концентрации микроорганизмов в инокулюме. Продемонстрировано, насколько данная модель применима для оценки чувствительности бактерий к антибиотикам на примере ципрофлоксацина и рифампицина.

**Ключевые слова:** антимикробная активность, альтернативные модели, вирулентность, антибиотикочувствительность

**Благодарности.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Для цитирования:** Салмова Ю.В., Никифорова Л.Р., Боровкова К.Е. Разработка модели бактериальной инфекции личинок *Galleria mellonella* (большая восковая моль). Лабораторные животные для научных исследований. 2022; 3. 40–49. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2022-03-05>.

# Development of a bacterial infection model of *Galleria mellonella* larvae (greater wax moth)

J.V. Salmova\*, L.R. Nikiforova, K.E. Borovkova

Research and manufacturing company «Home of Pharmacy», Leningrad oblast, Russia

\*E-mail: salmova.uv@doclinika.ru

**Abstract.** In recent years, *Galleria mellonella*, the larvae of a large wax moth, has been widely used as an alternative model for studying bacterial infections, as well as for evaluating the effectiveness of antibacterial drugs. The advantages of this model system are the absence of bioethical restrictions, the possibility of using a large number of animals in the experiment, as well as a short life cycle. The larvae can grow in a wide temperature range from 18 to 37 °C, allowing the study of human pathogens in this model, which in most cases require incubation at 37 °C. Despite the absence of acquired immunity in insects, the innate immunity of wax moths has significant similarities with the immune response of vertebrates, including humans.

The aim of the work was to develop a model of bacterial infection of larvae of large wax moths including comparative evaluation of the efficiency of larval infection with reference strains of microorganisms and their clinical isolates as well as evaluation of the effectiveness of Rifampicin (PJSC Krasfarma, Russia) and Ciprofloxacin (Elfa Laboratories, India) drugs on infected larvae.

This study included three consecutive stages; at the first stage, comparative assessment of the virulence of reference strains of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* and their clinical isolates was performed, and an infectious dose of bacterial suspension for injection in larvae was determined. Thus, it was found that the studied clinical isolates of *St. aureus*, *Str. pneumoniae* and *E. coli* were more virulent relative to the reference strains of microorganisms.

At the second stage of the study, *in vitro* minimum suppressive concentration (MSC) was determined for each microorganism strain, which allowed to determine the sensitivity of the strains to the studied antibiotics, namely Ciprofloxacin and Rifampicin.

At the third stage, after infecting the larvae with an infectious dose, antibiotic therapy was administered. The results obtained in the third stage confirmed the results of the second stage *in vitro*. The death of larvae infected with resistant strains of *St. aureus* and *E. coli* to Ciprofloxacin and Rifampicin, respectively.

This model was characterized by changes in the general state of larvae (melanization, motility, cocoon formation) and animal death depending on the concentration of microorganisms in the inoculum. The applicability of this model to assess the sensitivity of bacteria to antibiotics was demonstrated using Ciprofloxacin and Rifampicin as examples.

**Keywords:** antimicrobial activity, alternative models, virulence, antibiotic sensitivity

**Acknowledgements.** The study was performed without external funding.

**For citation:** Salmova J.V., Nikiforova L.R., Borovkova K.E. Development of a bacterial infection model of *Galleria mellonella* larvae (greater wax moth). *Laboratory Animals for Science*. 2022; 3. 40–49. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2022-03-05>.

## Введение

Доклинические исследования эффективности и безопасности лекарственных средств проводятся с использованием лабораторных животных, обеспечивающих возможность переносить полученные результаты на человека. В качестве таких тест-систем наиболее часто используют грызунов — мышей, крыс. Однако при проведении исследований на животных необходимо учитывать этические принципы и большую стоимость данных разработок.

Помимо стандартных моделей исследований с применением лабораторных грызунов существуют альтернативные модели, использующие в качестве тест-системы беспозвоночных животных. Данные модели не могут полностью заменить исследования на млекопитающих, но они применяются в качестве дополнительных для расширения знаний о бактериальном

патогенезе, изучения вирулентности микроорганизмов, а также открытия новых антибактериальных соединений.

Для изучения бактериальных инфекций, а также для оценки эффективности антибактериальных препаратов широко используются личинки большой восковой моли [1]. Большая восковая моль *Galleria mellonella* — один из традиционных объектов лабораторных исследований [2]. Отсутствие биоэтических ограничений и возможность применения большого количества личинок в эксперименте позволяют большой восковой моли быть модельным объектом в следующих тестах:

- 1) определение микробной вирулентности и патогенности микроорганизмов;
- 2) определение ЛД<sub>50</sub> (среднелетальная доза) вещества;
- 3) фармакокинетика;
- 4) тестирование эффективности противомикробных средств на зараженных личинках.

Несмотря на отсутствие у насекомых приобретенного иммунитета, врожденный иммунитет восковой моли имеет значительное сходство с иммунным ответом позвоночных животных, в том числе и человека [3]. Эти характеристики делают *G. mellonella* удобным объектом для оценки вирулентности бактерий, а также исследований на чувствительность к антибиотикам, в частности, штаммов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Escherichia coli* [4, 5].

Цель данного исследования — разработка модели бактериальной инфекции личинки большой восковой моли, включающая сравнительную оценку эффективности не только заражения личинок эталонными штаммами микроорганизмов и их клиническими изолятами, но и применения препаратов Рифампицин (ПАО «Красфарма», Россия) и Ципрофлоксацин (Эльфа Лабораториз, Индия) на инфицированных личинках.

## Материал и методы

### Личинки большой восковой моли

В качестве биологической тест-системы использовали личинки большой восковой моли *G. mellonella*. В исследование отбирали личинки в возрасте 5 нед, массой 200–300 мг. Личинки большой восковой моли до начала эксперимента содержали на искусственном субстрате (22% кукурузной муки, 22% зародышей пшеницы, 11% сухих дрожжей, 17,5% пчелиного воска, 11% меда и 11% глицерина) при температуре 2–8 °С в затемненных контейнерах для замедления созревания и перехода в стадию куколки [6]. После заражения личинки помещали в чашках Петри без субстрата, затем — в термостат при температуре 37 °С на 5 сут [7]. Распределение животных на группы по 10 личинок в каждой проводили методом слепой рандомизации [8]. Исследование выполняли в соответствии с принципами 3Rs, то есть осуществили замену лабораторных животных на альтернативную модель более низкой филогенетической группы. Проведение исследования было одобрено экспертной комиссией (ЭК) АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (протокол ЭК №8/21).

### Микроорганизмы

В качестве инфекционных агентов были выбраны эталонные штаммы микроорганизмов из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC): *E. coli* ATCC 25922 (ВКПМ В-8076), *St. aureus* ATCC 29213, *Str. pneumoniae* ATCC 6303, а также их клинические изоляты: *E. coli* ENV 194, *St. aureus* SA 0077 (MRSA), *Str. pneumoniae* 1068 19 А. Музейные тест-штаммы и клинические изоляты, используемые в исследовании перед началом эксперимента, были активированы высевом в гидролизат говяжьего мяса

ферментативного (ГМФ-бульон) с последующим пересевом на соответствующий питательный агар: ГМФ-агар, колумбийский агар.

### Определение инфекционной дозы

Заражение штаммами *E. coli*, *Str. pneumoniae*, *St. aureus* проводили в 1-й день эксперимента путем введения бактериального инокулята в гемоцель через последнюю левую ложноножку с помощью микрошприца Hamilton (Hamilton, США) 10 мкл [9]. Для удобства введения инокулята личинки были обездвижены путем помещения на 15 мин в холодильную камеру при температуре 2–8 °С. Для создания оптимальных условий развития патогена после заражения личинки содержали в термостате при температуре 37 °С [6, 9]. Инфекционная доза определялась как доза, вызывающая иммунный ответ, распознаваемый по потемнению кутикулы, а также 60–80% летальность [9].

### Регистрация показателей здоровья личинок

Для оценки заражения штаммами микроорганизмов проводили учет показателей здоровья личинок (в соответствии с табл. 1 и рис. 1). Было оценено состояние здоровья личинок путем присвоения баллов по 4 основным показателям: подвижность личинок, образование коконов, меланизация и выживаемость [7]. При оценке подвижности личинки использовали в качестве стимула стерильные одноразовые петли.

Личинки признавали мертвыми, если они не проявляли реакции (движений) на прикосновение. Оценку выживаемости проводили методом построения кривой Каплана–Мейера. Летальность и учет показателей здоровья личинок оценивали каждые 24 ч [6, 7, 10, 11].

### Определение

#### антимикробной активности *in vitro*

На данном этапе исследования определяли чувствительность используемых штаммов микроорганизмов к рифампицину и ципрофлоксацину *in vitro* для дальнейшего исследования эффективности лечения данными препаратами инфицированных личинок. Определение антимикробной активности исследуемых объектов проводили методом микроразведений в планшетах с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК). Для метода микроразведений грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов использовали бульон Мюллера–Хинтона [12], для микроорганизма *Str. pneumoniae* — бульон Мюллера–Хинтона с добавлением 5% лизированной бараньей крови [13, 14].

На данном этапе изучали тестируемые объекты ципрофлоксацин и рифампицин. Рифампицин активен в отношении грамположительных микроорганизмов *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus* spp., а также является стандартным средством лечения метициллинре-

**Таблица 1.**  
Система учета показателей (в баллах) здоровья личинок *Galleria mellonella*

Критерий	Описание	Оценка
Подвижность	Отсутствует	0
	Минимальная активность, вызванная стимуляцией	1
	Активность, вызванная стимулом	2
	Активность без стимуляции	3
Образование кокона	Не образует кокона	0
	Частичное образование кокона	0,5
	Полный кокон	1
Меланизация	Черные личинки	0
	Черные точки на коричневых личинках	1
Меланизация	Более 3 точек на личинке кремового цвета	2
	Менее 3 точек на личинке кремового цвета	3
	Меланизация отсутствует	4
Выживаемость	Погибшие	0
	Живые	2



**Рис. 1.** Стадии меланизации личинок и образования кокона.  
Цифры – баллы, присваиваемые при оценке показателей здоровья [9]

зистентного стафилококка (*S. aureus* MRSA). Однако по отношению к грамотрицательным микроорганизмам *E. coli* рифампицин менее активен. К ципрофлоксацину чувствительны грамотрицательные аэробные микроорганизмы *E. coli*, также он активен в отношении грамположительных микроорганизмов *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus* spp. Однако большинство стафилококков, устойчивых к метициллину (*S. aureus* MRSA), резистентны к ципрофлоксацину [15, 16].

Приготовление рабочих растворов исследуемых объектов осуществляли с использованием бульона Мюллера–Хинтона. Были изучены концентрации от 0,007 до 512 мкг/мл. Планшеты инкубировали при температуре 34–37 °С в течение 18±2 ч [12]. После инкубации визуально оценивали наличие или отсутствие роста микроорганизмов в лунках планшетов. МПК исследуемых объектов соответствовала лунка с наименьшей концентрацией исследуемых объектов без признаков видимого роста тест-микроорганизмов.

#### Антибактериальная терапия инфицированных личинок

Личинок большой восковой моли заражали инфекционной дозой, установленной на I этапе эксперимента в последнюю левую ложноножку, затем инкубировали в термостате при температуре 37 °С. Через 2 ч вводили тестируемые препараты в последнюю правую ложноножку и продолжали инкубацию.

Согласно инструкции по медицинскому применению (ИМП) препарата Рифампицин в виде лиофилизата для приготовления раствора для инфузий (150 мг) [15], максимальная суточная доза 600 мг, что при пересчете на 1 кг массы тела взрослого человека составляет:

$$\begin{aligned} \text{Терапевтическая доза} &= \\ &= 600 \text{ мг}/60 \text{ кг (средняя масса тела человека)} = \\ &= 10 \text{ мг}/\text{кг}. \end{aligned}$$

Терапевтическая доза (ТД) ципрофлоксацина, согласно инструкции по медицинскому применению, также равна 10 мг/кг [16].

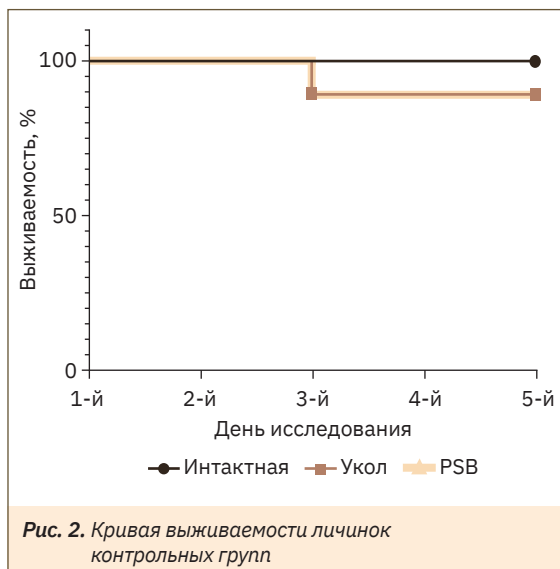


Рис. 2. Кривая выживаемости личинок контрольных групп

Расчет концентрации (С) инъекции антибиотика проводили по формуле:

$$C_{\text{инъекции}} = (C_{\text{in vivo}} \times V_{\text{личинки}}) / V_{\text{инъекции}}$$

где  $C_{\text{инъекции}}$  — концентрация тестируемого объекта в инъекции;  $C_{\text{in vivo}}$  — концентрация тестируемого объекта в личинке;  $V_{\text{личинки}}$  — объем личинки,  $V_{\text{личинки}} = 0,3$  мл;  $V_{\text{инъекции}}$  — объем инъекции,  $V_{\text{инъекции}} = 10$  мкл.

При перерасчете концентрации ципрофлоксацина на личинку с учетом отношения массы гемолимфы личинки к ее объему, приблизительно равному единице [17], соответствует:

$$10 \text{ мг/кг} = 10 \text{ мкг/г} = 10 \text{ мкг/мл} = C_{\text{in vivo}}$$

Концентрация вводимого препарата для личинки:

$$C_{\text{инъекции}} = (10 \text{ мкг/мл} \times 0,3 \text{ мл}) / 0,01 \text{ мл} = 300 \text{ мкг/мл}$$

Таким образом, было исследовано 3 дозы: 1/2 ТД; ТД; ТД×2.

В каждой исследуемой группе было по 10 личинок, причем в каждый первый день использовали 3 контрольные группы: интактную, травмированного контроля (нарушение целостности кутикулы, прокалывание иглой) и контрольную с введенным буфером (PBS). Также были добавлены контрольные группы для тестируемых препаратов, чтобы исключить токсическое влияние самих антибиотиков. На протяжении всего III этапа осуществляли регистрацию гибели ежедневно с балльной системой учета показателей здоровья (см. табл. 1).

#### Эвтаназия

Эвтаназию всех использованных в эксперименте личинок большой восковой моли проводили путем погружения в 70% раствор этилового спирта в последний, 5-й день эксперимента [18].

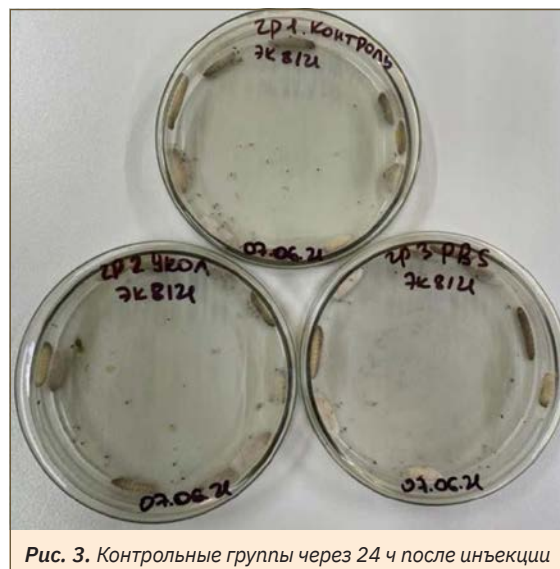


Рис. 3. Контрольные группы через 24 ч после инъекции

#### Анализ данных

Для данных, полученных на I этапе исследования, был применен анализ выживаемости методом Каплана–Мейера с последующей оценкой межгрупповых различий логранговым тестом Мантла–Кокса с построением кривой выживаемости.

Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Prism 9 (GraphPad Software, США).

Расчет летальных доз ( $LD_{50}$  и  $LD_{70}$ ) проводили с помощью пробит-анализа по Прозоровскому [19].

## Результаты и обсуждение

### I этап — моделирование патологии

На протяжении всего эксперимента (до заражения, в 1-й день и далее каждые 24 ч до эвтаназии) проводили учет показателей здоровья личинок (см. табл. 1).

До заражения у личинок всех экспериментальных групп наблюдали активное движение и способность к коконообразованию, меланизация отсутствовала.

При учете показателей здоровья через 24 часа после контрольного укола и введения индукторов патологии в интактной группе не установлено признаков угнетения личинок. Все личинки проявляли умеренную активность с возможностью коконообразования. Меланизация и гибель отсутствовали (рис. 2).

Во всех группах с нарушением целостности покровов регистрировали единичные случаи гибели личинок. В группах с контрольным проколом и с введенным фосфатно-солевым буфером регистрировали гибель одной личинки в каждой группе. Оставшиеся в живых личинки не отличались по своим жизненным показателям от интактных (рис. 3).

В группах, зараженных инокулюмом в более низких концентрациях, наблюдали гибель нескольких личинок (рис. 4). Выжившие личинки

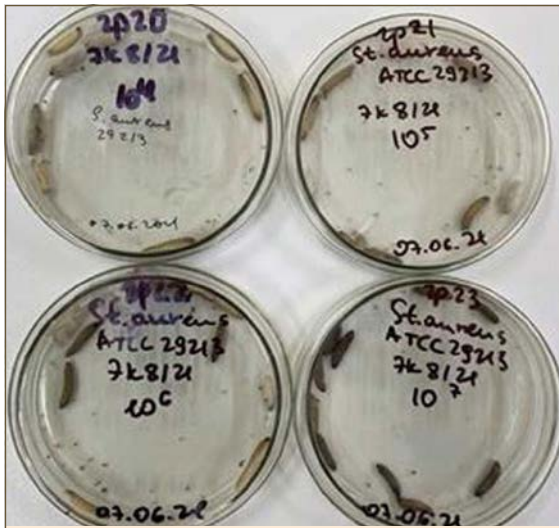


Рис. 4. Инфицированные группы через 24 ч после инъекции

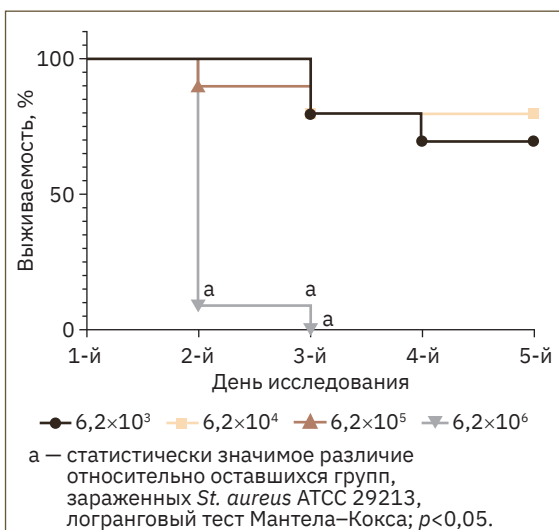


Рис. 5. Кривая выживаемости личинок экспериментальных групп, зараженных *St. aureus* ATCC 29213

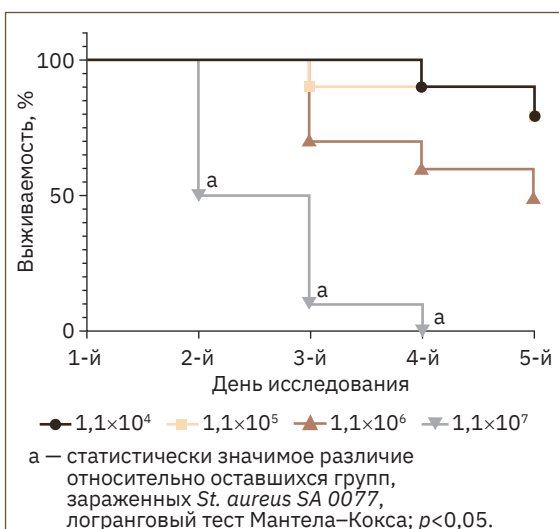


Рис. 6. Кривая выживаемости личинок экспериментальных групп, зараженных *St. aureus* SA 0077



Рис. 7. Почернение кожных покровов личинок (отсутствие активности, гибель). Стрелка — последняя стадия меланизации

Таблица 2.

Летальные дозы инокулята после однократного введения экспериментальным животным

Штамм	ЛД <sub>50</sub> , КОЕ/личинку	ЛД <sub>70</sub> , КОЕ/личинку
<i>St. aureus</i> ATCC 29213	2,2×10 <sup>6</sup>	2,2×10 <sup>6</sup> –6,2×10 <sup>6</sup> *
<i>St. aureus</i> SA 0077	4,8×10 <sup>5</sup>	2,6×10 <sup>6</sup>
<i>Str. pneumoniae</i> ATCC 6303	1,4×10 <sup>4</sup>	5,2×10 <sup>4</sup>
<i>Str. pneumoniae</i> 1068 19A	8,9×10 <sup>2</sup>	5,1×10 <sup>3</sup>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6,2×10 <sup>4</sup>	1,8×10 <sup>5</sup>
<i>E. coli</i> ENV 194	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>4</sup>

Примечание. \* Не удалось получить расчетным методом ЛД<sub>70</sub>, но по полученным данным был принят указанный диапазон доз; КОЕ — колониобразующие единицы.

были в основном активны, меланизация либо отсутствовала, либо была слабо выражена, способность к коконообразованию сохранилась. С увеличением концентрации инокулята, смертность в группах значительно возростала (рис. 5, 6). У оставшихся в живых личинок регистрировали снижение активности, потемнение кутикулы и угнетение способности коконообразования (см. рис. 4). У погибших личинок отмечалось полное почернение покровов тела (рис. 7).

Для оценки вирулентности штаммов было принято решение рассчитать летальные дозы с использованием пробит-анализа по Прозоровскому (табл. 2).

Исходя из полученных значений ЛД<sub>50</sub>, можно сделать заключение, что клинические изоляты являются более вирулентными относительно соответствующих эталонных штаммов.

Для заражения и дальнейшего лечения личинок большой восковой моли была установлена инфекционная доза. За инфекционную дозу бактерий приняли дозу, вызывающую 60–80% летальность. Исходя из расчетов летальной дозы (ЛД<sub>70</sub>), были выбраны дозы для инфицирования и дальнейшей антибактериальной терапии личинок на III этапе исследования.

### II этап — определение МПК

Через 18 ч после инкубации планшетов оценивали антимикробную активность рифампицина и ципрофлоксацина в отношении используемых штаммов микроорганизмов. Для под-

тверждения вносимого количества клеток микроорганизмов в лунки планшетов в день постановки теста проводили высеив содержимого лунки на чашки Петри. Контроль посевной дозы подтвердил необходимое количество клеток, вносимых в лунки планшетов, для бактерий в диапазоне  $2 \times 10^5$ – $8 \times 10^5$  КОЕ/мл [13].

Также вместе с контролями посевных доз проводили учет результатов с 96-луночных планшетов. Результаты учитывали визуально в проходящем свете. Данные оценки антимикробной активности сравнивали со значениями ECOFF (Epidemiological cut-off value, эпидемиологическое пороговое значение), представленными EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Европейский комитет по тестированию чувствительности к антимикробным препаратам), полученные сведения отображены в табл. 3.

При сравнении полученных значений МПК и ECOFF можно сделать выводы о чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Клинический изолят *S. aureus* SA0077 по спорту является метициллинрезистентным золотистым стафилококком (MRSA) соответственно, штамм оказался устойчивым к цiproфлоксацину и чувствительным к рифампицину. Эталонный штамм *S. aureus* ATCC 29213 также чувствителен к рифампицину и начал вырабатывать устойчивость к цiproфлоксацину. *Str. pneumoniae*, эталонный штамм и клинический изолят оказались оба чувствительными к исследуемым антибиотикам. *E. coli*, как и ожидалось, был чувствителен к цiproфлоксацину и устойчив к рифампицину.

### III этап — антибактериальная терапия

На III этапе исследования проверяли работу антибиотиков *in vivo*, заражали личинок большой восковой моли инфекционной дозой, а затем осуществляли антибактериальную терапию. При этом, как и на I этапе, проводили учет показателей здоровья личинок до заражения, в 1-й день и далее каждые 24 ч. До заражения

**Таблица 3.**

Сравнительная оценка антимикробной активности тестируемых объектов со значениями ECOFF

Штамм	Антибиотик	МПК, мкг/мл	ECOFF, мкг/мл	Тип
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Цiproфлоксацин	4	1	NWT
	Рифампицин	0,007	0,016	WT
<i>S. aureus</i> SA0077	Цiproфлоксацин	16	1	NWT
	Рифампицин	0,007	0,016	WT
<i>Str. pneumoniae</i> ATCC 6303	Цiproфлоксацин	0,5	4	WT
	Рифампицин	0,007	0,125	WT
<i>Str. pneumoniae</i> 1068 19A	Цiproфлоксацин	0,5	4	WT
	Рифампицин	0,03	0,125	WT
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Цiproфлоксацин	0,007	0,064	WT
	Рифампицин	32	—	—
<i>E. coli</i> ENV 194	Цiproфлоксацин	0,007	0,064	WT
	Рифампицин	32	—	—

Примечание. WT — дикий тип, NWT — недикий тип, — нет данных.

**Таблица 4.**

Концентрация инокулюма расчетная и фактически полученная

Штамм	Концентрация инокулюма, рассчитанная по ЛД <sub>70%</sub> , КОЕ/личинку	Концентрация инокулюма фактическая, КОЕ/личинку
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	$2,2 \times 10^6$ – $6,2 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$
<i>S. aureus</i> SA0077	$2,6 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
<i>Str. pneumoniae</i> ATCC 6303	$5,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
<i>Str. pneumoniae</i> 1068 19A	$5,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$
<i>E. coli</i> ATCC 25922	$1,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
<i>E. coli</i> ENV 194	$<10^4$	$1,3 \times 10^4$

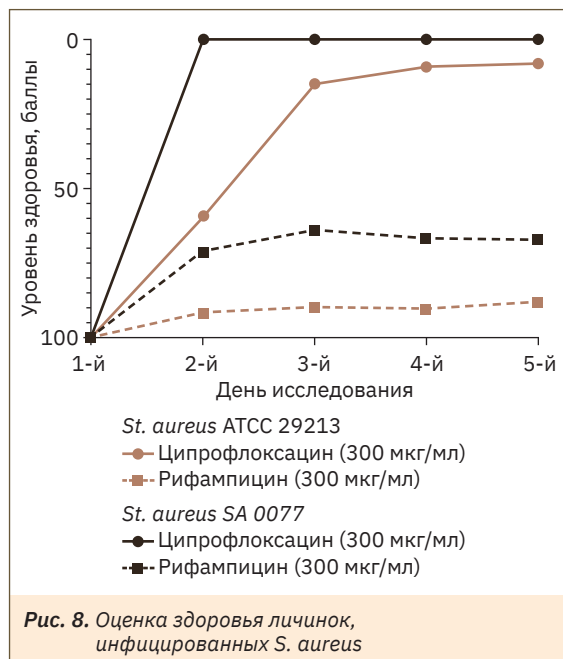


Рис. 8. Оценка здоровья личинок, инфицированных *S. aureus*

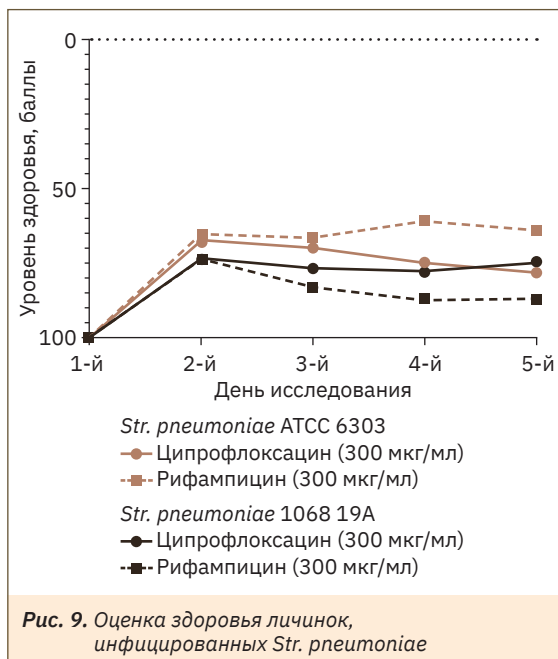


Рис. 9. Оценка здоровья личинок, инфицированных *Str. pneumoniae*

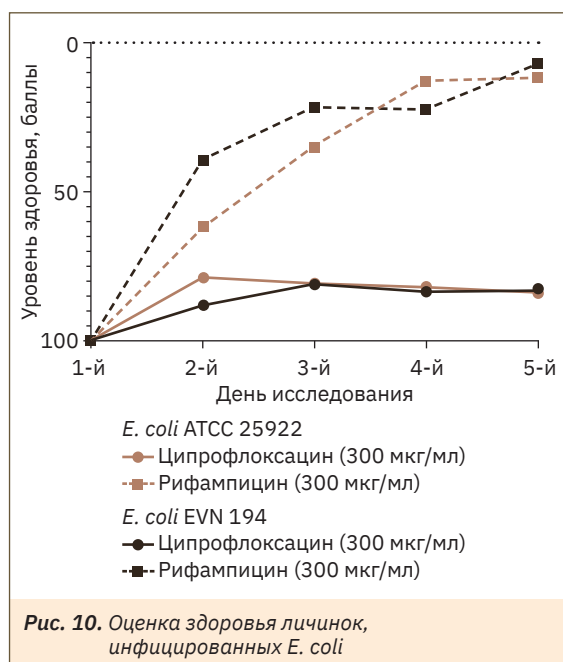


Рис. 10. Оценка здоровья личинок, инфицированных *E. coli*

все личинки были активны и способны к коконообразованию, меланизация отсутствовала.

В 1-й день эксперимента заражали личинок большой восковой моли соответствующими инфекционными дозами для каждого исследуемого штамма. Расчетные и фактически полученные концентрации инокулюмов представлены в табл. 4.

Концентрация инокулюма у штаммов *Str. pneumoniae* ATCC 6303, *Str. pneumoniae* 1068 19A, *E. coli* ENV 194 превысила расчетные концентрации на порядок, однако антибактериальная терапия все же оказалась эффективной относительно негативного контроля — инфицированных личинок без лечения.

При учете показателей здоровья через 24 ч после контрольного укола и введения индукто-

ров патологии в контрольных группах не установлено признаков угнетения личинок. Все личинки проявляли умеренную активность с возможностью коконообразования. Меланизация и гибель отсутствовали, за исключением гибели одной личинки в группе контрольного прокола. Сумма баллов при оценке показателей здоровья в течение 5 дней наблюдения не была ниже 87,5. Также в группах контроля токсичности антибиотика гибель не зарегистрирована, личинки чувствовали себя хорошо — сумма баллов здоровья не ниже 91 из 100. В негативном контроле (зараженные личинки без лечения) регистрировали значительную гибель, потемнение кутикулы и снижение активности.

Как и ожидалось по результатам исследования *in vitro*, ципрофлоксацин оказался неэффективным, а рифампицин был действенным во всех концентрациях относительно микроорганизма *St. aureus*. Рифампицин *in vivo* чуть лучше воздействовал на инфекцию, вызванную эталонным штаммом *St. aureus* ATCC 29213, чем клиническим изолятом SA 0077. Оценка (в баллах) здоровья личинок, получавших антибактериальную терапию рифампицином, была значительно выше, чем в негативном контроле, что подтверждает действие антибиотика по отношению к штамму *St. aureus* SA 0077 (рис. 8). Штаммы *Str. pneumoniae* оказались чувствительны по отношению к исследуемым антибиотикам во всех концентрациях. Установлено, что на уровень здоровья личинок эталонный штамм *Str. pneumoniae* ATCC 6303 и клинический изолят *Str. pneumoniae* 1068 19A влияли одинаково (рис. 9).

Из II этапа следует, что штамм *E. coli* устойчив по отношению к рифампицину, что можно увидеть на графике при оценке уровня здоровья (рис. 10), однако к ципрофлоксацину *E. coli* был чувствителен во всех концентрациях.



Таким образом, антибактериальная терапия во всех трех исследуемых дозах, рассчитанных исходя из терапевтических, оказалась эффективной. Как и ожидалось, *in vivo* наблюдали резистентность *S. aureus* по отношению к ципрофлоксацину, *E. coli* — к рифампицину.

## Заключение

В рамках проведенного эксперимента была разработана модель бактериальной инфекции личинок *Galleria mellonella* на примере эталонных штаммов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и их клинических изолятов. Модель характеризовалась изменением общего состояния личинок (меланизация, подвижность, образование кокона) и гибелью животных в зависимости от дозы микроорганизмов.

Было установлено, что исследуемые клинические изоляты *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Escherichia coli* оказались более вирулентными относительно эталонных штаммов микроорганизмов при инфицировании личинок *Galleria mellonella*. Штаммы микроорганизмов, оказавшиеся резистентными к антибиотикам в исследовании *in vitro*, приводили к гибели личинок на фоне антибактериальной терапии теми же антибиотиками.

Таким образом, совокупность полученных результатов продемонстрировала применимость в качестве модельного объекта личинок *Galleria mellonella* для оценки эффективности антибактериальных препаратов.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Cutuli M.A., Petronio G., Vergalito F. et al. *Galleria mellonella* as a consolidated *in vivo* model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing // *Virulence*. 2019. Vol. 10. N. 1. P. 527–541. doi: 10.1080/21505594.2019.1621649.
2. Ramarao N., Nielsen-Leroux C., Lereclus D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis // *Journal of Visualized Experiments*. 2012. Vol. 70. P. 1–7. doi: 10.3791/4392.
3. Tsai C.J. Y., Loh J.M., Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing // *Virulence*. 2016. Vol. 7. N. 3. P. 214–229. doi: 10.1080/21505594.2015.1135289.
4. Evans B.A., Rozen D.E.A. *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella* // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2012. Vol. 31. N. 10. P. 2653–2660. doi: 10.1007/s10096-012-1609-7.
5. Ignasiak K, Maxwell A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials // *BMC Res. Notes*. 2017. Vol. 10. N. 1. P. 428. doi: 10.1186/s13104-017-2757-8.
6. Peleg A.Y., Jara S., Monga D. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009. Vol. 53. N. 6. P. 2605–2609. doi: 10.1128/AAC.01533-08.
7. Гайдай Д.С., Гайдай Е.А., Макарова М.Н. Личинки большой восковой моли (*Galleria mellonella*) как модельный объект для исследования новых лекарственных средств // *Международный вестник ветеринарии*. 2017. № 2. С. 82–90 [Gaidai D.S., Gaidai E.A., Makarova M.N. Lichinki bol'shoi voskovoi moli (*Galleria mellonella*) kak model'nyi ob'ekt dlya issledovaniya novykh lekarstvennykh sredstv // *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii*. 2017. N. 2. P. 82–90 (In Russ)].
8. Селезнева А.И., Макарова М.Н., Рыбакова А.В. Методы рандомизации животных в эксперименте // *Международный вестник ветеринарии*. 2014. № 2. С. 84–89 [Selezneva A.I., Makarova M.N., Rybakova A.V. Metody randomizatsii zhivotnykh v eksperimente // *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii*. 2014. N. 2. P. 84–89. (In Russ)].
9. Harding C.R., Schroeder G.N., Collins J.W. et al. Use of *Galleria mellonella* as a model organism to study *Legionella pneumophila* infection // *Journal of visualized experiments*. 2013. N. 81. P. 1–10. doi: 10.3791/50964.
10. Desbois A.P., Coote P.J. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an *in vivo* model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011. Vol. 66. N. 8. P. 1785–1790. doi: 10.1093/jac/dkr198.
11. Mukherjee K., Altincicek B., Hain T. et al. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria pathogenesis* // *Applied And Environmental Microbiology*. 2010. Vol. 76. N. 1. P. 310–317. doi: 10.1128/AEM.01301-09.
12. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р ИСО 20776-1–2010 «Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни». URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200083430> (дата обращения: 10.2021) [Natsional'nyi standart RF GOST R ISO 20776-1–2010 «Klinicheskie laboratornye issledovaniya i diagnosticheskie test-sistemy *in vitro*. Issledovanie chuvstvitel'nosti infektsionnykh agentov i otsenka funktsional'nykh kharakteristik izdelii dlya issledovaniya chuvstvitel'nosti k antimikrobnym sredstvam. Chast' 1. Referentnyi metod laboratornogo issledovaniya aktivnosti antimikrobnnykh agentov protiv bystrorastushchikh aerobnykh bakterii, vyzyvayushchikh infektsionnye bolezni». URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200083430> (data obrashcheniya: 10.2021). (In Russ)].
13. МУК 4.2.1890–04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [МУК 4.2.1890–04 «Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam». (In Russ)].

14. Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method / Version 5.0. January 2017. P. 4–5.
15. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Рифампацин (Rifampicinum). URL: [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_216.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_216.htm) [Instrukciya po medicinskomu primeneniyu lekarstvennogo preparata Rifampicin (Rifampicinum). URL: [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_216.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_216.htm) (In Russ)].
16. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Ципрофлоксацин (Ciprofloxacin). URL: [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_3610.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_3610.htm). [Instrukciya po medicinskomu primeneniyu lekarstvennogo preparata Ciprofloksacin (Ciprofloxacin). URL: [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_3610.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_3610.htm) (In Russ)].
17. Andrea A., Krogfelt K.A., Jenssen H. Methods and Challenges of Using the Greater Wax Moth (*Galleria mellonella*) as a Model Organism in Antimicrobial Compound Discovery // *Microorganisms*. 2019. Vol. 7. N. 3. P. 85. doi: 10.3390/microorganisms7030085.
18. Голуб В.Б. и др. Энтомологические и фитопатологические коллекции, их составление и хранение. Воронеж: изд-во ВГУ. 1980. 228 с. [Golub V.B. et al. Entomologicheskie i fitopatologicheskie kolleksii, ikh sostavlenie i khranenie. Voronezh: izd-vo VGU. 1980. 228 p. (In Russ)].
19. Прозоровский В.Б. Использование методов наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности // *Фармакология и токсикология*. 1962. №1. С. 115–119 [Prozorovskii V.B. Ispol'zovanie metodov naimen'shikh kvadratov dlya probit-analiza krivyykh letal'nosti // *Farmakologiya i toksikologiya*. 1962. N. 1. P. 115–119. (In Russ)].

---

#### Информация об авторах

*Ю.В. Салмова*, научный сотрудник,  
salmova.uv@doclinika.ru,  
<https://orcid.org/0000-0001-9891-8634>

*Л.Р. Никифорова*, научный сотрудник,  
<https://orcid.org/0000-0001-8710-2023>

*К.Е. Боровкова*, руководитель  
лаборатории микробиологии,  
<https://orcid.org/0000-0003-1571-6549>

АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,  
188663, Россия, Ленинградская обл.,  
Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский,  
ул. Заводская, д. 3, к. 245

#### Information about the authors

*J.V. Salmova*, microbiologist,  
salmova.uv@doclinika.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9891-8634>

*L.R. Nikiforova*, microbiologist,  
<https://orcid.org/0000-0001-8710-2023>

*K.E. Borovkova*, head of microbiological laboratory,  
<https://orcid.org/0000-0003-1571-6549>

Research and manufacturing company  
«Home of Pharmacy»,  
188663, Russia, Leningrad oblast,  
Vsevolozhskiy district, Kuzmolovskiy t.s.,  
Zavodskaya st. 3-245

---

#### Вклад авторов в написание статьи

**Ю.В. Салмова** — дизайн исследования, выполнение экспериментальной части, сбор и систематизация материала, анализ и статистическая обработка данных, написание текста статьи.

**Л.Р. Никифорова** — выполнение экспериментальной части, сбор и систематизация материала.

**К.Е. Боровкова** — концепция исследования, редактирование текста статьи.

#### Authors contribution

**J.V. Salmova** — research design, experimental part, collection and systematization of material, analysis and statistical processing of data, writing the text of the article.

**L.R. Nikiforova** — performing the experimental part, collecting and systematizing the material.

**K.E. Borovkova** — research concept, editing the text of the article.

---

#### Сведения о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Дата поступления рукописи  
в редакцию: 23.05.2022

Дата рецензии статьи: 21.06.2022

Дата принятия статьи к публикации: 01.09.2022

Received: 23 May 2022

Reviewed: 21 June 2022

Accepted for publication: 01 September 2022