

In Vivo Enfeksiyon Modellerinin Yükselen Yıldızı: *Galleria mellonella* Larvası

Meral KARAMAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Enfeksiyon hastalıklarının patogenezinin araştırılmasında memeli modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Memelilerin kullanımına ilişkin etik kaygılar, donanım ve maddi sıkıntılar alternatif konakçı olarak omurgasız hayvanları gündeme getirmektedir. Meyve sineği *Drosophila melanogaster*, nematod *Caenorhabditis elegans* gibi omurgasız hayvan modelleri alternatif olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda ise, konakçı modeli olarak *Galleria mellonella* larvası dikkati çekmektedir. Büyük balmumu güvesi (*The Greater Wax Moth*) olarak da bilinen *G. mellonella* larvası, enfeksiyon patogenezi çalışmalarında diğer omurgasız hayvanlara göre çeşitli üstünlüklere sahiptir. Büyük boyutları (2-4 cm) nedeniyle uygulama kolaylığı sağlayan larvalar, 15-37°C'de yaşayabilme yeteneği ile tıbbi açıdan önemli birçok mikroorganizmanın virülans faktörlerinin test edilmesinde kullanılmaktadır. Yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, *G. mellonella* larvasının mikrobiyal virülans faktörlerinin karakterizasyonu ve identifikasyonunda, antimikrobiyal peptidlerin etkinliğinin test edilmesinde güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Bu derleme makalede, son on yılda özellikle enfeksiyon patogenezi çalışmalarında yıldızı parlayan *G. mellonella* larvasının öne çıkan özelliklerinden söz edilmektedir.

Anahtar kelimeler: Enfeksiyon modeli, *Galleria mellonella* larvası, *in vivo*

SUMMARY

The Rising Star of In-Vivo Infection Models: Galleria mellonella Larvae

Mammalian models have been frequently used in investigating the pathogenesis of infectious diseases. Ethical concerns about the use of mammals as well as difficulties related to hardware and financial problems bring invertebrates into agenda as alternative hosts. Invertebrate models such as the fruit fly *Drosophila melanogaster* and the nematode *Caenorhabditis elegans* are used as alternatives. In recent years, however, *Galleria mellonella* larva attracts attention as a host model. *Galleria mellonella* larva, also known as the Greater Wax Moth, has several advantages compared to the other invertebrates, in investigations on pathogenesis of infection. Larvae, providing easy handling due to their large size (2-4 cm), and having the ability to survive at 15-37°C, are used for testing virulence factors of various medically important microorganisms. Comparative studies have demonstrated that *Galleria mellonella* larvae can be safely used in the characterization and identification of microbial virulence factors and in testing the effectiveness of antimicrobial peptides. In this review article we have discussed the prominent features of *Galleria mellonella* larvae, the shining star of the last decade, especially in the studies on the pathogenesis of infection.

Key words: *In vivo*, infection model, *Galleria mellonella* larvae

GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıklarının patogenezinin ve etkili tedavi protokollerinin araştırılmasında, *in vitro* modeller her zaman tatmin edici sonuçlar vermemekte, konakçı olarak canlı bir organizmaya gereksinim duyulmaktadır. Hayvan modelleri, *in vitro* çalışmalardan kliniğe uzanan süreçte yol gösterici bir basamak olarak kullanılmaktadır. Rodentler (genellikle fare ve sıçanlar) insandaki enfeksiyon sürecini taklit etmek için

uygun bir anatomik ve biyolojik model olması, enfeksiyon ajanlarına duyarlılık ve immün yanıt açısından benzerlik göstermesi nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir⁽¹⁾. Ancak son yıllarda özellikle memeli modelleri konusunda etik kaygıların giderek artması, altyapı donanımı ve teçhizat açısından kapsamlı laboratuvarlara, tecrübeli bakıcı-tekniğe elemanlara gereksinim duyulması bu modeller konusunda alternatif arayışlarını doğurmuştur^(2,3). Omurgasız hayvanlar filogenetik olarak alt sınıflarda yer almaları nedeniyle

Alındığı tarih: 16.01.2015

Kabul tarihi: 12.04.2016

Yazışma adresi: Meral Karaman, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova / İZMİR

e-posta: meral.karaman@deu.edu.tr

etik kaygıların daha az duyulduğu modeller arasında yer almaktadır. Bu anlayış, ilk olarak 1959 yılında Russel ve Burch tarafından gündeme getirilen ve hayvan çalışmalarının etik dayanaklarını oluşturan 3R kuralı; Replacement (alternatif modellerin kullanılması), Reducement (en az sayıda hayvan kullanılması) ve Refinement (hayvan refahının iyileştirilmesi) ile paralellik göstermektedir⁽⁴⁾. Alternatifler arasında sayılabilecek omurgasız hayvan modelleri; *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* ve *Bombyx mori* uzun yıllardır başarılı modeller olarak kullanılmaktadır^(5,6).

Omurgasız hayvanlar arasında bir Lepidopteran türü olan "*Galleria mellonella*", özellikle enfeksiyon patogenezi çalışmalarında son on yılın yükselen yıldızları arasında yerini almıştır^(7,8). Büyük bal mumu güvesi (The Greater Wax Moth) olarak da bilinen ve arıcılık sektörünün ekonomik zararlıları arasında yer alan *G. mellonella* (Takım: Lepidoptera, Aile: Pyralidae) tüm dünyada, alçak ılıman iklim bölgelerinde yaygın olarak bulunan bir kelebek türüdür. *G. mellonella* larvası ile enfeksiyon modelleri konusundaki çalışmaların sayısında gözlenen artışta, larvanın diğer omurgasız hayvanlara göre sahip olduğu çeşitli avantajlar rol oynamaktadır.

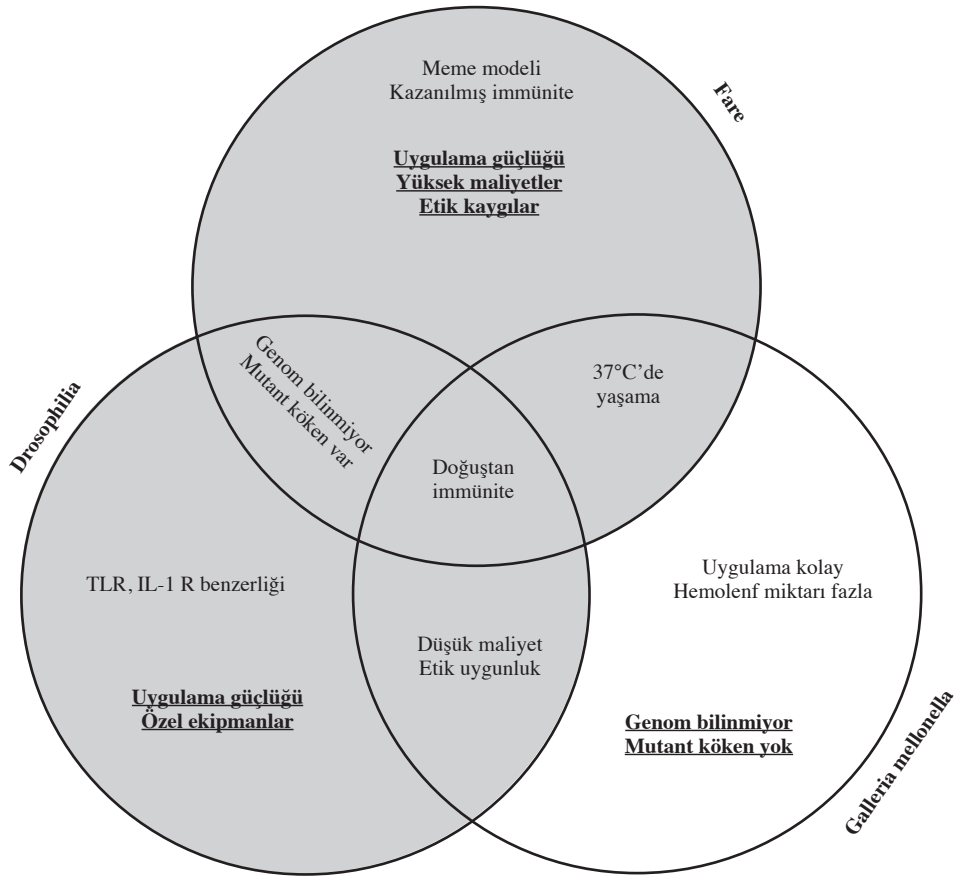
Tıbbi öneme sahip birçok mikroorganizmanın model konakçısı olarak *G. mellonella* larvasının kullanımı literatürde oldukça kabul görmüştür. Diğer böceklerde olduğu gibi hızlı bir üreme döngüsüne sahiptir. *Galleria*'nın gelişimi yumurta, larva, pupa ve kelebek dönemlerinden oluşmaktadır. Yaşam döngüsü, ısı değişikliklerine ve besin durumuna göre 6 hafta ile 6 ay arasında değişmektedir⁽⁹⁾. Enfeksiyon patogenezi çalışmalarında sıklıkla tercih edilen formu son larval evre (6. gelişim evresi) olup, bu evrede yaklaşık 2-4 cm uzunluğunda, 0.2-0.4 g ağırlığında, mat beyaz renkli görünümdedir⁽¹⁰⁾ (Resim 1). Laboratuvarda, oda ısısında, özel barındırma

sistemlerine gereksinim duymayan, petri kaplarında saklanabilen larvalar ucuz olması, kolay temin edilmesi ve yetiştirilmesi nedeniyle tercih edilmektedir. Yetiştirme için doğal kepek, gliserol ve bal karışımından oluşan besin içeren cam kavanozlar kullanılmaktadır. Çalışma için kullanılacak enfeksiyöz etkenin biyogüvenlik risk grubuna göre önlemler alınması yeterlidir.

***Galleria mellonella* Modelinin Avantajları**

Sıçan ya da farelerle yapılan enfeksiyon modeli çalışmalarında karşılaşılabilecek olan enfeksiyöz etkenin yetiştirme kolonisine ya da diğer laboratuvar hayvanlarına bulaşması gibi bir risk söz konusu değildir. Büyük boyutları (2-4 cm) etken patojenlerin ya da antimikrobiyal peptidlerin yeterli miktarlarını ve yineleyen dozlarını, enjektörle kolayca uygulama olanağı sağlamaktadır. Diğer böcek modellerine göre büyük miktarlarda (~20-50 μ L) hemolenf sıvısı elde edilebilmektedir. Enfeksiyonun kontrolü için hemolenf sıvısından etken izolasyonu yapılabilir. Ayrıca hemolenfi oluşturan hemositler (plazmatosit, granülosit vb.) aracılığı ile gerçekleşen fagositoz gibi hücresel bağışıklık yanıtları değerlendirilebilir^(11,12). En önemli avantajı ise 15-37°C'de yaşayabilme yeteneğidir. Tıbbi öneme sahip birçok patojen için virülans faktörlerinin ekspresyonu 37°C'de gerçekleştiğinden patogenezi çalışmalarında bu oldukça önemli bir parametredir⁽¹³⁾. Diğer taraftan tüm genom çalışmalarının tamamlanmamış ve henüz transgenetik teknolojinin gelişmemiş olması modellemenin dezavantajları arasında sayılmaktadır⁽⁸⁾ (Şekil 1).

Galleria mellonella larvası aslında uzun yıllardır tarımsal zararlılara karşı biyolojik mücadelede konakçı modeli olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda kullanım alanının hücre biyolojisi, fungal ve bakteriyel patogenezi çalışmalarına kaymasında ilerleyen moleküler tekniklerle birlikte, larval hemolenfin fonksiyonlarının anlaşılması



Şekil 1. Fare, *Drosophila* ve *Galleria mellonella* modellerinin avantaj ve dezavantajları.

yatmaktadır. Bu nedenle modellemeler sonucunda elde edilen verilerin larvanın immün sistem bileşenleri ve özellikleri ile birlikte tartışılması, yorumlanması önem taşımaktadır.

***Galleria mellonella* İmmün Sistemi**

Bilindiği gibi omurgalı hayvanlar hem doğal, hem de edinsel bağışıklık sistemine sahiptir. Böcekler ve diğer omurgasızlar ise yalnızca doğal bağışıklık sistemine sahip olup, spesifik antijenlerin tanınması ve onlara karşı immünojenik bir bellek geliştirerek antikor yanıtı oluşturmaya yönelik yetenekleri bulunmamaktadır⁽¹⁴⁾. Böceklerde ve açık dolaşım sistemine sahip diğer hayvanlarda, omurgalılarda olduğu gibi kan ve lenfatik sıvı ayrımı yoktur. Vücut sıvıları “hemolenf”, hemolenf dolaşımında yer alan hücreler ise “hemosit” olarak adlandırılır.

Yapılan çalışmalar, *G. mellonella* larvasının doğal immün sisteminin yapısal ve fonksiyonel açıdan vertebralılar ile homoloji gösterdiğini ortaya koymuştur. Enfeksiyöz etkenlerle karşılaşmaya bağlı olarak, humoral bağışıklık yanıtlarının yanı sıra hemositlerin morfolojik ve yapısal değişiklikleri sonucunda hücresel bağışıklık yanıtlarının da aktive olduğu gösterilmiştir^(15,16).

Memelilerde olduğu gibi böceklerde de enfeksiyon hastalığının gelişim süreci içinde patojenin adezyonu, ardından konak hücreye girişi, toksin üretimi, konak savunma sistemi hücrelerinden kaçış basamakları paralellik göstermektedir⁽¹⁷⁾. Mikroorganizmanın adezyonu ve invazyonuna karşı ilk savunma sistemi memelilerde epidermis iken böceklerde kütikül tabakasıdır. Memeli epidermisi ve böcek kütikülü temel protein kom-

ponentleri açısından benzerlik göstermekle birlikte, epidermal tabakanın kitin içermemesi önemli farklılıklardan biri olarak dikkati çekmektedir. Enfeksiyon süresince patojenler tarafından sekrete edilen proteazlar memeli epidermisi ya da böcek kütikül protein komponentlerini yıkıma uğratarak etkenin yayılmasını kolaylaştırmaktadır. Kütikül bir taraftan fiziksel bariyer görevi görürken, diğer yandan kütikül hasarı ile humoral immün yanıt uyarılmaktadır. Bu uyarım ile kütikülde antimikrobiyal peptid ve ısı şok proteinlerinin sentezi, fenoloksidaz ve Ca^{+2} bağımlı transglutaminaz etkisi ile hemolenfin pıhtılaşması ve melanizasyon süreci izlenmektedir⁽¹⁸⁾. Melanizasyon süreci hemositlerde sentezlenip kütikülde aktif formuna dönüşen

profenoloksidaz (PPO) enzimi ile gerçekleşmekte, aktive olmuş fenoloksidazlar hemolenfde bulunan fenolik substratlardan kinonları oluşturmaktadır. Kinonlar melanin oluşumunu sağlamanın yanı sıra hemolenfin pıhtılaşması sonucu hareketsizleşen mikroorganizmalara karşı güçlü sitotoksik etki gösterirler^(19,20). Melanizasyon, PPO enzim aktivitesinin kantitatif olarak saptanması ya da larvanın vücudunda gözle görülebilen siyah renk değişimleri ile değerlendirilebilmektedir (Resim 2). Enfeksiyon patogenezi çalışmalarında oldukça değerli bir veri olarak kullanılmaktadır^(21,22).

Patojenlerin toksinlerine karşı memelilerin ve böceklerin duyarlılığında da paralellikler bildi-



Resim 1. *Galleria mellonella* gelişim evreleri ve yetiştirme ortamı (Fotoğraflar çalışmalarımızdan alınmıştır.)



Resim 2. *Galleria mellonella* larvasında enjeksiyon bölgesi, sağlıklı ve enfekte larva (Fotoğraflar çalışmalarımızdan alınmıştır.)

rilmiştir. Memelilerin bağırsaklarında ve böceklerin orta bağırsaklarında mikrovillusların yüzeyinde mikrobiyal toksinler için glikokonjugat reseptörler bulunmaktadır. Bir diğer benzerlik ise doğal immün sisteme sahip olan böceklerin, tıpkı memeliler gibi, konak hücreye yabancı maddeleri fagosite etme yeteneği göstermeleridir. Memelilerde makrofajlar aracılığı ile yürütülen bu süreç böceklerde hemolenf içinde dolaşan granülosit ve plazmatositler aracılığı ile yapılmaktadır⁽¹⁷⁾.

Böcekler, memelilerin kazanılmış bağışıklık tepkisine benzer bir bağışıklık sistemine, antikor yanıtına sahip olmamakla birlikte, benzer bazı yapılar taşırlar⁽²³⁾. Hücre adezyonu, antimikrobiyal peptidlere direnç, doku degradasyonu ve oksidatif strese adaptasyon gibi bakteriyel enfeksiyon süreci için temel komponentler larva ve memelilerde önemli oranda benzerlik göstermektedir^(18,24).

***Galleria mellonella* Larvasında Enfeksiyon Modeli**

Bilindiği gibi ülkemizde hayvan deneyi yapabilmek için TC. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kurs Programı” na dair 2007/11 genelgesi kapsamında B Kategorisi sertifika sahibi olmak zorunludur. Larva çalışmaları için ise henüz böyle bir zorunluluk bulunmamaktadır.

Enfeksiyon modeli için larvaya etkenin inokulasyonunda, oral, topikal ve enjeksiyon olmak üzere üç farklı yöntem kullanılabilir^(25,26). Oral uygulamada etken beslenme materyali ile karıştırılıp, sindirim yoluyla alınması sağlanırken inokulum miktarı tam olarak bilinemediğinden değerlendirme görecelidir. İnokulumun doğrudan ağızdan insülin enjektörü ile verildiği durumlarda ise inokulumun taşması ile aynı zamanda topikal uygulama da yapılmış olur.

Topikal uygulamada ise; inokulum larvanın kütikül bölümüne uygulanır, etken penetrasyon yoluyla geçer. Ancak bazı enfeksiyöz etkenlerin (özellikle mayalar) geçişinde ve inokulum dozunda sıkıntılar bildirilmiştir. Bu nedenle enjeksiyon yöntemi en çok tercih edilen ve en güvenilir yöntem olarak bildirilmektedir. Bu yöntemde inokulum doğrudan hemosel içine ince uçlu bir iğne ile verilir (Resim 2). Enjeksiyon sırttan hemosel içine yapılabilmeyle birlikte literatürde sıklıkla son ön bacağın kullanıldığı görülmektedir. Yineleyen enjeksiyonların farklı bacaklara yapılması önerilmektedir. Enjeksiyon yönteminin en önemli dezavantajı ise kullanılan iğne nedeniyle kontaminasyon ya da travmadır. Kontrol grupları bu sorunu dışlamak açısından yardımcı olmaktadır. İnokulasyon öncesi 15°C’de saklanabilen larvalar, etkenin verilmesinden sonra 37°C’de barındırılmaktadır. Çalışma süresince larvaların beslenip beslenmeleri konusunda farklı görüşler bulunmaktadır. Ancak açlık nedeniyle bazı enfeksiyöz etkenlere (Örneğin, *Candida albicans*) duyarlılığın arttığı, immün yanıtlarının zayıfladığı, bazı antimikrobiyal peptidlerin (lipokalin) ve bazı serum proteinlerinin (ferritin, transferin vb.) ekspresyonunun azaldığı bildirildiğinden genel eğilim beslenmeleri yönündedir⁽²⁷⁾.

Larva modeli, inokulasyon sonrası dönemde enfeksiyon parametrelerini izlemek, konakçı yanıtını değerlendirmek açısından oldukça elverişlidir. Larval aktivite, melanizasyon, koza formasyonu ve hayatta kalma kriterlerinin değerlendirildiği sağlık puanlaması kantitatif veriler sağlamaktadır⁽²²⁾. Büyük miktarlarda elde edilebilen hemolenf bakteriyel ya da fungal yük ve antimikrobiyal peptidlerin etkinliğinin değerlendirilmesinde, immün yanıtın ölçülmesinde kullanılabilir. Larva vücudundan elde edilen doku kesitlerinin histopatolojik değerlendirmeleri ile memeli modellerinde olduğu gibi hastalığın patogenezi ve doku düzeyindeki yanıtları konusunda verilere ulaşılabilmektedir.

Son on yılda hem bakteriyel hem de fungal patojenlerle yapılan çeşitli çalışmalar larva enfeksiyon modellerinin fare benzeri memeli modelleriyle korelasyon gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar arasında, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. albicans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* gibi tıbbi açıdan önemli etkenler yer almaktadır⁽²⁸⁻³⁰⁾. Gerek bakteriyel gerekse fungal patojenez çalışmalarında *G. mellonella*'nın güvenilir bir model olduğu vurgulanmaktadır^(25,31). Park ve ark.⁽³²⁾, *Eenterococcus faecalis*'in salgıladığı ekstrasellüler jelatinaz (GelE) enziminin insan serumunda kompleman komponenti C3a'yı doğrudan hidrolize ettiğini ve sekropin benzeri antimikrobiyal peptidleri yıkıma uğrattığını göstermişlerdir. Benzer şekilde GelE'nin *G. mellonella* hemolenfinde bulunan sekropini de yıkıma uğrattığını saptamışlardır. *Burkholderia*'da ise memeli enfeksiyonları ile ilişkili çeşitli virülans genlerinin delesyonunun *Galleria*'da yaşamda kalma oranlarını artırdığı bildirilmiştir⁽³³⁾. *G. mellonella* larvasında *Burkholderia cenocepacia* complex (BCC) ile ilgili in vivo faj terapisi çalışmalarında *B. cenocepacia* K56-2 enfeksiyonunun ölümcül etkilerinin, BCC faj KS12'nin tek doz enjeksiyonu ile engellendiği bildirilmiştir⁽³⁴⁾. Günümüzde enfeksiyon etkenleri ile özellikle de çoklu dirençli ajanlarla, mücadelede faj terapisinden beklentiler oldukça yüksektir. Bu çalışma *Galleria* enfeksiyon modellerinin faj çalışmalarında da kullanılabilmesini göstermektedir.

Ülkemizde henüz enfeksiyon modeli çalışmalarında *G. mellonella* larvasının kullanımı kısıtlıdır. Ancak son yıllarda ulusal düzeyde yapılan bilimsel toplantılara bakıldığında bu konuda bir hareketlilik dikkati çekmektedir^(35,36). Kalkancı ve ark.⁽³⁵⁾, bazı bakteri ve mantarlar ile *G. mellonella* larvalarını enfekte ederek yaşamda kalma oranlarına baktıkları çalışmaları sonucunda memeli modellerinin yerine omurgasız modellerin kullanılmaya başlaması konusunda farkındalık yaratılması gerektiğini vurgulamışlardır.

Bütün bu veriler *G. mellonella* larvasının enfeksiyon patogenezi çalışmalarında, mikrobiyal virülans faktörlerinin karakterizasyonu ve identifikasyonunda, antimikrobiyal peptidlerin etkinliğinin test edilmesinde tıpkı memeliler gibi güvenle kullanılabilmesini göstermektedir. *G. mellonella* larvasının enfeksiyon patogenezi çalışmalarında memeli modellerine alternatif olarak kullanılması, ekonomik avantajlarının yanı sıra etik kayguların azalmasına da katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Beynen AC, Hau J.** Animal models. In: Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, eds. Principles of Laboratory Animal Science. Revised Ed. Amsterdam: Elsevier; 2001:197-205.
2. **Vilcinskis A.** Insects emerge as valuable model hosts to explore virulence. *Virulence* 2011; 2:376-8. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.2.5.18289>
3. **Mylonakis E, Casadevall A, Ausubel FM.** Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog* 2007; 3:e101. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030101>
4. **Russell WMS, Burch RL.** The Principles of Replacement. In: Russell WMS, Burch RL, eds. The principles of humane experimental technique. Chapter 5. London: Methuen. 1959.
5. **Desalermos A, Fuchs BB, Mylonakis E.** Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002451. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002451>
6. **Hanaoka N, Takano Y, Shibuya K, Fugo H, Uehara Y, Niimi M.** Identification of the putative protein phosphatase gene PTC1 as avirulence-related gene using a silkworm model of *Candida albicans* infection. *Eukaryot Cell* 2008; 7:1640-8. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00129-08>
7. **Cook SM, McArthur JD.** Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 2013; 4:350-3. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.25240>
8. **Mukherjee K, Domann E, Hain T.** The greater wax moth *Galleria mellonella* as an alternative model host for human pathogens. In: Vilcinskis A. eds. Insect Biotechnology. London: Springer; 2011: 3-12. http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-9641-8_1
9. **Charriere JD, Imdorf A.** Protection of honey combs from wax moth damage. *Am Bee J* 1999; 139:627-30.
10. **Ellis JD, Graham JR, Mortensen A.** Standard methods for wax moth research. *J Apicult Res* 2013; 52:1-17. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.10>
11. **Cotter G, Doyle S, Kavanagh K.** Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;

- 27:163-9.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01427.x>
12. **Fallon J, Kelly J, Kavanagh K.** *Galleria mellonella* as a model for fungal pathogenicity testing. *Methods Mol Biol* 2012; 845:469-85.
http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-539-8_33
13. **Mylonakis E, Frederick MA, Michael G, Arturo C.** Of model hosts and man: Using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as Model Hosts for Infectious Disease Research. In: Justin GB, Maged M, Mylonakis E, eds. Recent Advances on Model Hosts. Springer: London; 2012:11-9.
<http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-5638-5>
14. **Strand MR, Pech LL.** Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu Rev Entomol* 1995; 40:31-56.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.40.010195.000335>
15. **Hoffmann JA.** Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:4-10.
[http://dx.doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80022-0](http://dx.doi.org/10.1016/0952-7915(95)80022-0)
16. **Krautz R, Arefin B, Theopold U.** Damage signals in the insect immune response. *Front Plant Sci* 2014; 5:342.
<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00342>
17. **Scully LR, Bidochka MJ.** Developing insect models for the study of current and emerging human pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 263:1-9.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00388.x>
18. **Kavanagh K, Reeves EP.** Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28:101-12.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.002>
19. **Vilmos P, Kurucz E.** Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol Lett* 1998; 62:59-66.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2478\(98\)00023-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2478(98)00023-6)
20. **Söderhäll K, Cerenius L.** Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:23-8.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80026-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80026-5)
21. **Insua JL, Llobet E, Moranta D, et al.** Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. *Infect Immun* 2013; 81:3552-65.
<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00391-13>
22. **Loh JM, Adenwalla N, Wiles S, Proft T.** *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* 2013; 4:419-28.
<http://dx.doi.org/10.4161/viru.24930>
23. **Fallon JP, Troy N, Kavanagh K.** Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence* 2011; 2:413-21.
<http://dx.doi.org/10.4161/viru.2.5.17811>
24. **Lemaitre B, Hoffmann J.** The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:697-743.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
25. **Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E.** Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 2010; 1:475-82.
<http://dx.doi.org/10.4161/viru.1.6.12985>
26. **Scully LR, Bidochka MJ.** Serial passage of the opportunistic pathogen *Aspergillus flavus* through an insect host yields decreased saprobic capacity. *Can J Microbiol* 2005; 51:185-9.
<http://dx.doi.org/10.1139/w04-124>
27. **Banville N, Browne N, Kavanagh K.** Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence* 2012; 3:497-503.
<http://dx.doi.org/10.4161/viru.21972>
28. **Jander G, Rahme LG, Ausubel FM.** Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* 2000; 182:3843-5.
<http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.13.3843-3845.2000>
29. **Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K.** Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34:153-7.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2002.tb00617.x>
30. **Salamitou S, Ramisse F, Brehélin M, et al.** The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology* 2000; 146:2825-32.
<http://dx.doi.org/10.1099/00221287-146-11-2825>
31. **Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D.** The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp* 2012; 70:e4392.
<http://dx.doi.org/10.3791/4392>
32. **Park SY, Kim KM, Lee JH, Seo SJ, Lee IH.** Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect Immun* 2007; 75:1861-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01473-06>
33. **Seed KD, Dennis JJ.** Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. *Infect Immun* 2008; 76:1267-75.
<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01249-07>
34. **Seed KD, Dennis JJ.** Experimental bacteriophage therapy increases survival of *Galleria mellonella* larvae infected with clinically relevant strains of the *Burkholderia cepacia* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:2205-8.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01166-08>
35. **Kalkancı A, Fouad AA, Erdoğan M, et al.** Bazı bakteri ve mantarların virülansının araştırılmasında *Galleria mellonella*'nın in vivo model olarak kullanılması. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:366-76.
<http://dx.doi.org/10.5578/mb.9701>
36. **Karaman M, Alvandian A, Bahar İH.** *Galleria mellonella* larva modelinde *Candida albicans* biyofilm formasyonunun etkilerinin değerlendirilmesi. KLİMİK 2015, XVII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre kitabı, Antalya, 2015:P10-02.