

# *Candida albicans*'ın Salgısal Asit Proteinaz Etkinliğinin Araştırılmasında In Vivo Model Olarak *Galleria mellonella* Larvanın Kullanılması<sup>§</sup>

Ali ALVANDIAN\*, Mohamad Hasan JAWADI\*\*, Zeynep Nur ALTINTAŞ\*\*, Naci YILDIZ\*\*, Meral KARAMAN\*

\*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

\*\*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dönem 2 Öğrenci Çalışma Modülü Grubu

## ÖZET

**Amaç:** Enfeksiyon hastalıklarının patogenezinin araştırılmasında, fare-sıçan modelleri uzun yıllardır kullanılmaktadır. Tıbbi öneme sahip birçok mikroorganizmanın model konakçısı olarak *Galleria mellonella* larva kullanımı literatürde kabul görmüştür. Bu çalışmada, *Candida albicans*'ın salgısal asit proteinaz (SAP) enzim aktivitesinin, konakçı modeli olarak *G. mellonella* larva üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Enfeksiyon modeli için, salgısal asit proteinaz (SAP) enzim aktivitesi sığır serum albümin agar yöntemi ile olumlu ve olumsuz olarak bulunan iki klinik *C. albicans* kökeni kullanıldı. Son larval evrede, 2-3 cm uzunluğunda, 250-300 mg ağırlığında, sağlıklı *G. mellonella* larvalar dört gruba ayrıldı; kontrol, "sham" (fosfat tampon), SAP olumlu ve SAP olumsuz ( $5 \times 10^5$  CFU/ml) *C. albicans* ile enfekte grup. İnokulasyon sonrası larvalar 37°C'de bekletildi. Doksan altı saat sonra sağlık durumları skorlandı, sakrifiye edildi ve fungal yük araştırıldı.

**Bulgular:** Larvalar aktivite, yaşamda kalma, melanizasyon ve fungal yük açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu saptandı. Kontrol ve "sham" gruplarında ölüm ve melanizasyon gözlenmezken, 96. saat sonunda patojen üremesi de saptanmadı. SAP olumlu ve olumsuz gruplar arasında fungal yük, melanizasyon ve toplam sağlık skoru açısından anlamlı farklılık bulundu ( $p < 0.05$ ).

**Sonuç:** Çalışmamızda, *C. albicans*'ın SAP enzim aktivitesinin virülans rol oynadığı *G. mellonella* larva modelinde gösterilmiştir. Fungal enfeksiyonların ve SAP gibi virülans faktörlerinin konak hücreye etkilerinin araştırılmasında *G. mellonella* larva modelinin güvenilir, uygulaması kolay ve ucuz bir model olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Larva modelinin, memeli modellerine alternatif olarak yaygınlaşması etik kaygıların azalmasına da katkıda bulunacaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Candida albicans*, *Galleria mellonella*, salgısal asit proteinaz

## SUMMARY

**Using *Galleria mellonella* Larvae as the in Vivo Model in Investigating the Secretory Acid Proteinase Activity of *Candida albicans***

**Aim:** Mouse-rat models have been used for many years in studying the pathogenesis of infectious diseases. Using *Galleria mellonella* larvae was accepted in the literature as a model host for many microorganisms that are important for medical research. In this study, the secretory acid proteinase (SAP) enzyme activity of *Candida albicans* was investigated on the *G. mellonella* larvae as a model host.

**Material and Method:** Two clinical *C. albicans* strains were used for the infection model, which had positive and negative SAP enzyme activity determined by bovine serum albumin agar method. Healthy *G. mellonella* larvae of 2-3 cm length and 250-300 mg weight in the last larval stage, were divided into four groups; control, sham (phosphate buffer), SAP positive and SAP negative ( $10^5$  CFU/ml) *C. albicans*-infected group. Larvae were left at 37°C. Their health conditions were scored after 96 hours and they were sacrificed. Fungal burden was studied.

**Results:** A significant difference was found between the groups when evaluated in terms of activity, survival, melanization and fungal load of larvae. The control and sham groups showed no death and melanization, no pathogen growth was detected at the end of 96 hours. Fungal burden, melanization and total health score showed significant difference between the SAP positive and SAP negative groups ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** In our study, the role of the SAP enzyme activity of *C. albicans* on the virulence was demonstrated in *G. mellonella* larvae in vivo model. *G. mellonella* larvae model can be used as a reliable, easily applicable and an inexpensive method in investigating the effects of fungal infections and virulence factors such as SAP on host cells. Widespread use of the larvae model as an alternative to mammalian models will also contribute to reducing ethical concerns.

**Key words:** *Candida albicans*, *Galleria mellonella*, secretory acid proteinase

**Alındığı tarih:** 17.06.2016

**Kabul tarihi:** 23.07.2016

**Yazışma adresi:** Meral Karaman, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balçova / İzmir

**Tel:** (0232) 412 45 17

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

<sup>§</sup> Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi IX. Özel Çalışma Modülü Sempozyumunda (30 Eylül 2015, İzmir) sunulmuştur.

## GİRİŞ

Sağlıklı insan mikrobiyomunun bir üyesi olan *Candida albicans* aynı zamanda klinik örneklerden en sık soyutlanan maya türü olarak karşımıza çıkmaktadır. Akut veya kronik lokalize mukokutanöz enfeksiyonlardan yaşamı tehdit eden sistemik hastalıklara kadar geniş bir yelpazede klinik tabloya neden olabilmektedir<sup>(1,2)</sup>. Kolonizasyon ve ardından enfeksiyona giden süreçte, konakçıya ait faktörlerin yanı sıra *C. albicans*'ın sahip olduğu türe özgü virülans faktörlerinin de önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bilindiği gibi; hormonal değişiklikler, uzun süreli ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, invazif cerrahi girişimler, immün yetmezliğe yol açan kanser, AIDS gibi hastalıklar ve immün sistemi baskılayan ajanlar kandida enfeksiyonlarına yatkınlığı artırmaktadır<sup>(2,3)</sup>. *C. albicans* için önemli virülans faktörleri arasında germ tüp oluşumu, biyofilm aktivitesi, salgısal asit proteinaz (SAP), fosfolipaz ve esteraz gibi hidrolitik enzimlerin varlığı sayılabilir<sup>(4,5)</sup>.

SAP, karboksil ya da asit proteinaz olarak da adlandırılan aspartik proteazlardır. SAP enzimi lezyon bölgelerinde bulunan albümin, hemoglobin, keratin, kollajen, müsin ve salgısal IgA (sIgA) gibi birçok proteini parçalayabilme özelliğine sahiptir. sIgA'ların mikroorganizmalara karşı mukozal savunmada önemli mekanizmalardan biri olduğu düşünüldüğünde bu maddelerin kandida proteinazlarca kolayca parçalanmasının fungal adheransa yol açabileceği ileri sürülmüştür<sup>(6)</sup>.

Enfeksiyon hastalıklarının patogenezinin ve etkili tedavi protokollerinin araştırılmasında, hayvan modelleri uzun yıllardır önemli katkılarda bulunmaktadır. Kemirgenler, özellikle de 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<sup>(7)</sup>. Ancak son yıllarda laboratuvar alt yapı ve donanımlarının yetersizliği, maliyet açısından etkin olmaması, ahlaki açıdan daha ciddi sorgulanması bu çalışmalarda kısıtlamayı getirmiştir. Alternatif bir yaklaşım olarak aslında uzun yıllardır kullanılmakta olan *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila melanogaster* gibi omurgasız modelleri gündeme gelmekle birlikte, bu modeller arasında büyük balmumu güvesi (The Greater Wax Moth) olarak da bilinen *Galleria mellonella* larvaları ön plana çıkmıştır.

Bu noktada *G. mellonella* larvaların diğer omurgasızlara göre sahip olduğu bazı üstünlükler dikkati çekmektedir. Diğer böceklerde olduğu gibi hızlı bir üreme döngüsüne sahip olmanın yanı sıra yetiştirmenin kolay ve ucuz olması, büyük boyutları (~2-4 cm) nedeniyle enfeksiyon etkenlerinin ya da antimikrobiklerin yineleyen enjeksiyonlarına uygun olması, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin memeliler ile yapısal ve fonksiyonel açıdan benzerlik göstermesi sayılabilir<sup>(8-10)</sup>. Enfeksiyon patogenezi açısından en önemli üstünlüğü ise 15-37°C'da yaşayabilme yeteneğidir. Tıbbi öneme sahip birçok patojen için virülans faktörlerinin ekspresyonu 37°C'da gerçekleştiğinden patogenezi çalışmaları bu oldukça önemli bir parametredir<sup>(11)</sup>.

Bu çalışmada *C. albicans*'ın SAP enzim aktivitesinin, konakçı modeli olarak *G. mellonella* larva üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### *C. albicans*, SAP etkinliği ve inokulumun hazırlanması

Çalışmamızda, solunum yolu örneklerinden hastalık etkeni olarak soyutlanan ve çimlenme borusu testi, mısır unu tween 80 agar besiyerindeki görünümü, karbonhidrat fermentasyonu ve Vitek otomatize sistem kullanılarak *C. albicans*

olarak tanımlanan, SAP aktivitesi olumlu ve olumsuz saptanan iki suş kullanıldı. Suşların SAP enzim aktivitesi sığır serum albümin agar (SSAA) yöntemi ile belirlendi<sup>(12)</sup>. Enfeksiyon modeli için suşlar 9 mm çaplı plaklara dökülmüş SDA (Sabouraud's Dextrose Agar, Conda, Fransa)'ya ekim yapılarak 24 saat süreyle 35°C'de inkübe edildi. Ertesi gün oluşan koloniler steril öze ile toplanarak YPD sıvı besiyerinde (Yeast Peptone Dextrose broth; 1% yeast extract, 2% peptone and 2% dextrose, Conda, Fransa) 30°C'de bir gece bekletildi. Süspansiyon

**Tablo 1.** Larvaların sağlık durumlarını değerlendirme kriterleri<sup>(14)</sup>.

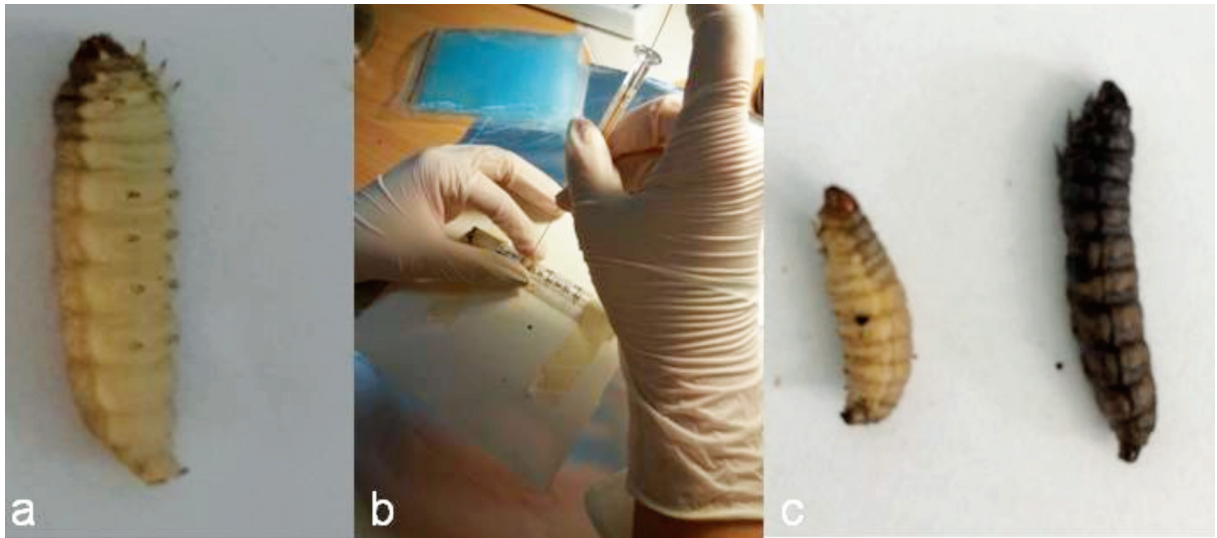
Kriter	Tanımlama	Puan
Aktivite	Aktivite yok	0
	Uyarı ile az aktif	1
	Uyarı ile belirgin aktif	2
	Aktif	3
Koza formasyonu	Koza yok	0
	Kısmi koza	0,5
	Tamamen koza	1
Melanizasyon	Tamamen melanize	0
	Kahverengi larvada siyah noktalar	0
	Bej larvada ≥3 siyah nokta	2
	Bej larvada <3 siyah nokta	3
Melanizasyon yok	4	
Yaşamda kalma	Ölü	0
	Yaşiyor	2

PBS (Phosphate Buffered Saline) ile üç kez yıkandıktan sonra  $5 \times 10^5$  CFU/ml yoğunlukta hazırlandı<sup>(13)</sup>.

### *G. mellonella* larvalar ve enfeksiyon modeli

Çalışma için Kocaeli Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden alınarak Anabilim dalımız laboratuvarlarında üretilen *G. mellonella* larvalar kullanıldı. Son larval evrede yaklaşık ~2-3 cm uzunluğunda 250-300 mg ağırlığında, sağlıklı (görsel olarak açık renkli) (Resim 1a) 40 adet *G. mellonella* larva steril petri kutularına alındı. Larvalar; Grup 1 (n=10); sağlıklı kontrol grubu, grup 2 (n=10); "sham" grubu, grup 3 (n=10); SAP olumlu *C. albicans* ile enfekte grup ve grup 4 (n=10); SAP olumsuz *C. albicans* ile enfekte grup olmak üzere dört gruba ayrıldı.

*Candida albicans* inokulasyonu için larvalar %70 alkol ile ve steril eküvyon aracılığı ile silindi.  $5 \times 10^5$  CFU/ml yoğunlukta maya süspansiyonundan 5 µL larvaların sol en son bacaklarına (proleg) Hamilton enjektörü (26's gauge, Fisher) ile doğrudan enjekte edildi (Resim 1b). "Sham" grubuna aynı miktarda steril PBS verilirken, kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmadı.



**Resim (1a)** Sağlıklı larva; **(1b)** *G. mellonella*; enjektör yöntemiyle enfeksiyon modeli; **(1c)** Enfekte larvada melanizasyon odakları ve 96 saat sonunda melanize larva.

Larvalar içinde besin bulunan ve ağızları kapatılan petri kutuları içinde, 37°C’de bekletildi.

### Sağlık puanlaması

Larvalar 24 saat aralıklar ile gözlemlendi ve 96 saat sonra sağlık durumları literatür önerileri doğrultusunda; aktivite, koza formasyonu, melanizasyon ve hayatta kalma açısından skorlandı<sup>(14)</sup> (Tablo 1).

### Fungal yükün saptanması

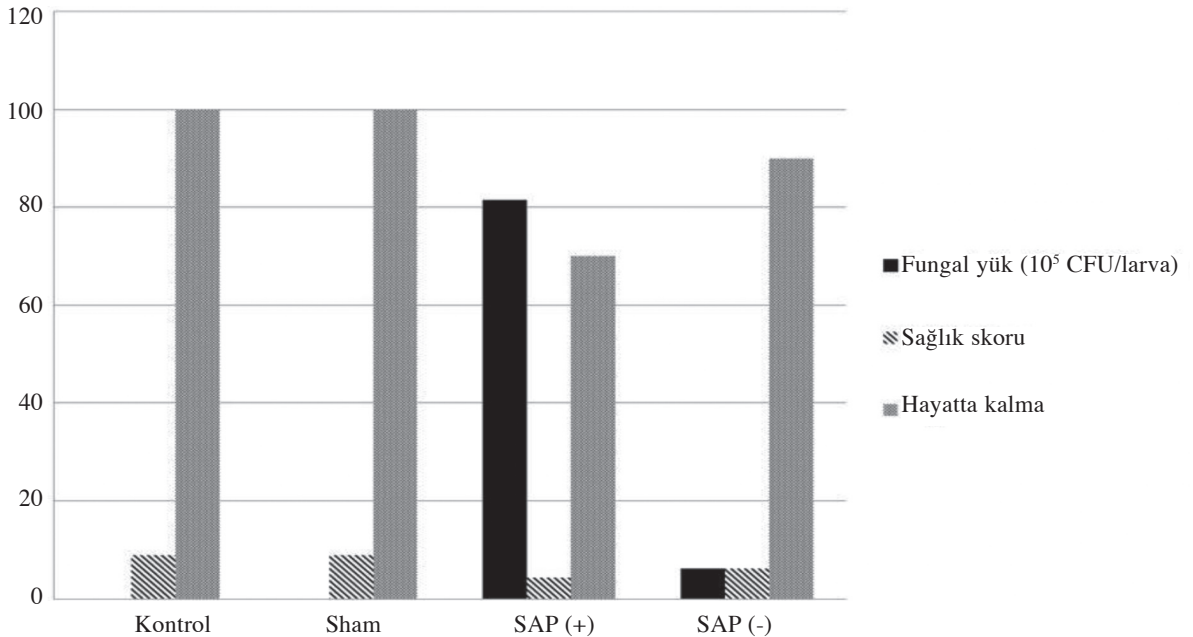
Doksan altı saat sonunda soğuk şok ile öldürülen larvalar %70 alkol ile temizlendi. Larvalar 1 ml PBS ve 5 mm çapında steril paslanmaz çelik boncuk içeren ependorflara alındı. Ependorflar TissueLyser LT raklarına alınıp TissueLyser (Qiagen-Almanya) doku homojenizasyon cihazına yerleştirildi. Frekans 50, zaman 5 dakikaya ayarlandı. Homojenizasyon işleminin ardından SDA’ya kantitatif ekim yapılarak plaklar 37°C’de 48 saat inkübe edildi. Fungal yük larva başına düşen koloni oluşturan ünite (Colony Forming Unit; CFU/Larva) olarak hesaplandı.

### İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel işlemler SPSS 15.0 istatistik programında yapıldı. İkili grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0.05$  alındı.

### BULGULAR

Larvalar ilk 24 saat sonunda değerlendirildiğinde grup 3 (SAP olumlu) hariç tüm gruplarda koza formasyonu, melanizasyon ya da ölüm gözlenmezken, grup 3 larvalarda diğerlerinden farklı olarak yaklaşık 0.5 mm çapında siyah noktalar (melanizasyon odakları) belirlendi. Bu odakların aynı grupta 48. saatte belirginleştiği ve sayıca arttığı, 96. saat sonunda ise tüm larvaların tamamen melanize olduğu gözlemlendi (Resim 1c). İnokulasyon sonrası 96. saat sonunda kontrol ve “sham” gruplarında ölüm ve melanizasyon gözlenmezken, SAP olumsuz grupta (grup 4) melanizasyon sınırlıydı. SAP olumlu ve olumsuz gruplar arasında tek başına yaşamda kalma oranlarına bakıldığında fark gözlenmekle birlikte



Şekil 1. İnokulasyon sonrası 96. saat sonunda gruplara göre sağlık skoru ve fungal yük sonuçları.

**Tablo 2.** İnokulasyon sonrası 96. saatte fungal yük, sağlık skoru ve yaşamda kalma oranları (SAP: Salgısal Asit Proteinaz).

Gruplar (n=10)	Fungal yük (x10 <sup>5</sup> CFU/ml)	Sağlık skoru	Hayatta kalma (%)
Kontrol	-	9.00±0.00	10/10 (100)
“Sham”	-	9.00±0.00	10/10 (100)
SAP (+)	81.57±65.74	4.28±0.75	10/3 (70)
SAP (-)	6.14±8.83	6.14±0.69	10/1 (90)

bu fark anlamlı değildi. Toplam sağlık skoru açısından ise farklılık anlamlı bulundu (p<0.05). (Şekil 1, Tablo 2).

Sakrifikasyon sonrası yapılan kantitatif ekimler sonucunda fungal yük açısından değerlendirildiğinde ise, kontrol ve sham gruplarında herhangi bir patojen üremesi saptanmazken, Grup 3'te üreme anlamlı olarak yoğundu (p<0.05; Şekil 1, Tablo 2).

## TARTIŞMA

Fırsatçı bir mantar olan *C. albicans*'ın enfeksiyon oluşturabilmesi için konağın savunma sistemini aşabilecek bazı virülans faktörlerine sahip olması gerekmektedir. SAP, fosfolipaz, esteraz gibi hidrolitik enzimlerin salınımı ve slime aktivitesi bu faktörler arasında sayılabilir. Hidrolitik enzimler, antimikrobiyal aktiviteye karşı koymak ve immün sistemden kaçmak için konakçı hücrelerine saldırı yeteneğindedir. *C. albicans*, SAP enzim aktivitesi ile; keratin, albümin, hemogloblin, kazein, kollajen gibi proteinleri parçalayarak epitelyum hücrelerine girmekte ve derin dokulara yayılabilmektedir. SAP enzim ailesinin; laktoferrin, çeşitli immünoglobulinler (özellikle salgısal IgA), laktoperoksidaz, katepsin D, proenflamatuar sitokin IL-1b,  $\alpha$ 2 makroglobulin gibi çeşitli proteinleri parçalama yeteneği ve diğer virülans faktörleri ile etkileşim halinde olması *C. albicans*'ın fırsatçı bir patojen olmasında rol oynamaktadır<sup>(6,15)</sup>. Bu çalışmada, *C. albicans*'ın SAP enzim aktivitesinin etkilerinin araştırılmasında in vivo model olarak

*G. mellonella* larva kullanılmıştır.

Son yıllarda bazı yayınlarda SAP aktivitesinin epitelyum hücrelerine invazyon için gerekli olmadığı<sup>(16)</sup> bildirilmekle birlikte, canlı konakçı olarak *G. mellonella* larva kullandığımız çalışmamızda hem sağlık skorlaması hem de fungal yük açısından elde edilen veriler bu enzimin varlığının önemini ortaya koymaktadır. SAP olumlu *C. albicans* ile enfekte larvalar inokulasyon sonrası immün yanıtın güçlü bir şekilde uyarılması sonucunda ilerleyici melanizasyon göstermişler ve yaşamda kalma oranları düşük bulunmuştur. Ayrıca SAP olumlu suşlarla enfekte grupta fungal yük anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Verilerimiz *C. albicans* türlerinde, proteinaz üretimi ile konak dokuya adhere olabilmek yeteneği arasındaki ilişkiye vurgu yapan ve proteinaz üretmeyen kökenlerin üretene oranla virülanslarının düşük olduğu, zayıf patojen oldukları ya da patojen olmadıklarını bildiren yayınlarla paralellik göstermektedir<sup>(17-20)</sup>.

Günümüzde fungal patogenezi, özellikle kolonizasyondan enfeksiyona uzanan süreçte konakçı fungus etkileşimini daha iyi anlayabilmek, yeni ve etkili tedavi yöntemlerini geliştirebilmek için hayvan deneyleri kaçınılmazdır. Fungal patogenezin araştırılmasında memeli modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Fareler birçok avantaja sahip olmasına rağmen, altın standart olarak kabul edilen bu model aynı zamanda dezavantajlara da sahiptir. Fare deneylerinin maliyet, zaman, laboratuvar alt yapı ve donanımı açısından aşırı yük getirmesinin yanısıra etik açıdan oldukça hassas bir konu olması başlıca noktalar dır. Deneylerde memeli kullanımının kısıtlanmasına yönelik artan baskılar omurgasız hayvan modellerini ön plana çıkarmıştır. Tıbbi öneme sahip birçok mikroorganizmanın model konakçısı olarak *G. mellonella* larva kullanımı literatürde oldukça kabul görmüştür<sup>(11,21,22)</sup>. Fungal virülans ve antifungal ilaç etkinliği çalışmalarında omurgasız tür *G. mellonella* larva kullanımı



son on yılda giderek artmıştır<sup>(23-27)</sup>. Ülkemizde ise konakçı modeli olarak larva kullanımında hareketlilik dikkati çekmektedir<sup>(22,28)</sup>.

*Galleria mellonella* larva modelinin ön plana çıkmasında hemolenf ile ilgili bilinmeyenlerin azalması ve larvanın doğuştan gelen bağışıklık sisteminin memeliler ile yapısal ve fonksiyonel açıdan benzerliklerinin belirlenmesi gösterilebilir<sup>(9,10)</sup>. Enfeksiyon patogenezi çalışmalarında ise, 15-37°C'da yaşayabilme yeteneği, diğer omurgasızlara göre büyük boyutları (2-4 cm) nedeniyle uygulamaların kolay olması ve modelleme sonrası çok miktarda (~20-50 µL) hemolenf eldesiyle fagositoz benzeri immünite ile ilişkili olayların izlenmesinin, patojenlerin izolasyonunun olası olması ön plana çıkmaktadır<sup>(11,24,25)</sup>. Bu üstünlükleri *G. mellonella* larvayı fungal patogeneze ve antifungal ilaç etkinliği çalışmalarında tercih edilir bir model hâline getirmiştir.

Ancak, bu avantajların yanısıra örneğin kandida enfeksiyonlarına immün yanıtta hangi hemosit türünün baskın olduğu ya da hangi mantar ligandların hangi hemosit reseptörü ile bağlantılı olduğu gibi bazı açıklanmayan noktalar eksiktir<sup>(29)</sup>. Bu bilinmeyenlere yanıt için, hücresel ve moleküler düzeyde farklı çalışmaların artırılmasına ve *G. mellonella* genomunun tamamının bilinmesine gereksinim duyulmaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda *C. albicans*'ın SAP enzim aktivitesinin virülans rol oynadığı canlı konakçı olarak *G. mellonella* larvada gösterilmiştir. Sonuçlarımız fungal enfeksiyonların ve SAP gibi virülans faktörlerinin konak hücreye etkilerinin araştırılmasında *G. mellonella* larva modelinin güvenilir, ucuz ve uygulaması kolay bir model olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Larva modelinin, memeli modellerine alternatif bir model olarak yaygınlaşmasının etik kaygıların azalmasına da katkıda bulunacağı düşüncesindeyiz.

## Teşekkür

Kocaeli Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Fevzi Uçkan ve ekibine *G. mellonella* larvaları temin ettikleri, üretim ve yetiştirme konusunda bilgi ve becerilerini paylaştıkları için teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Falagas ME, Apostolou KE, Pappas VD. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25:419-25. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-006-0159-2>
2. Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med* 2009; 37:1612-8. <http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819efac0>
3. Edwards JE. *Candida* Species. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, eds. Principles and Practice of Infectious Disease. Vol 2. New York, Churchill Livingstone 1995.
4. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* 2001; 9:591-6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02237-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02237-5)
5. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9:327-35. [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7)
6. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67:400-28. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003>
7. 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.
8. Ellis JD, Graham JR, Mortensen A. Standard methods for wax moth research. *J Apic Res* 2013; 52:1-17. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.10>
9. Lionakis MS. Drosophila and Galleria insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence* 2011; 2:521-7. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.2.6.18520>
10. 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)
11. Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. *Virulence* 2012; 3:474-6. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.22493>
12. Ray TL, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* 1990;

- 58:508-14.
13. **Li DD, Deng L, Hu GH, et al.** Using *Galleria mellonella*-*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biol Pharm Bull* 2013; 36:1482-7.  
<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b13-00270>
  14. **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>
  15. **Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B.** Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005; 48:365-7.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x>
  16. **Lermann U, Morschhäuser J.** Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. *Microbiology* 2008; 154:3281-95.  
<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2008/022525-0>
  17. **Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good C, Magee PT.** Genetic evidence of role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1985; 49:571-6.
  18. **Kuştimur S.** Kandida patogenezinde rol oynayan faktörler. *Mikrobiyol Bul* 1994; 28:175-81.
  19. **Pichová I, Pavlicková L, Dostál J, et al.** Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*; Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem* 2001; 268:2669-77.  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02152.x>
  20. **De Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, et al.** Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun* 1996; 64:466-71.
  21. **Mukherjee K, Domann E, Hain T.** The Greater Wax Moth *Galleria mellonella* as an Alternative Model Host for Human Pathogens. In: Vilcinskas A, eds. *Insect Biotechnology*. London: Springer; 2011; 3-12.  
[http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-9641-8\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-9641-8_1)
  22. **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>
  23. **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>
  24. **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](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-539-8_33)
  25. **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>
  26. **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>
  27. **Favre-Godal Q, Dorsaz S, Queiroz EF, et al.** Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of in vivo activity with the *Galleria mellonella* model. *Phytochemistry* 2014; 105:68-78.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.06.004>
  28. **Karaman M, Alvandian A, Bahar İH.** *Galleria mellonella* larva modelinde *Candida albicans* biyofilm formasyonunun etkilerinin değerlendirilmesi. KLİMİK 2015, XVII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 25-29 Mart 2015, Antalya. Kongre kitabı, 2015; (P10-02) 268.
  29. **Lionakis MS, Fischer BG, Lim JK, et al.** Chemokine receptor Ccr1 drives neutrophil-mediated kidney immunopathology and mortality in invasive candidiasis. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002865.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002865>