

Ewa Mikulak¹, Aleksandra Gliniewicz¹, Marta Przygodzka¹, Jolanta Solecka²

GALLERIA MELLONELLA L. AS MODEL ORGANISM USED IN BIOMEDICAL AND OTHER STUDIES

GALLERIA MELLONELLA L. - ORGANIZM MODELOWY STOSOWANY W BADANIACH BIOMEDYCZNYCH I INNYCH

National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene in Warsaw,

¹Department of Parasitology and Vector-borne Diseases,

²Department of Environmental Health and Safety

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie,

¹Zakład Parazytologii i Chorób Przenoszonych przez Wektory,

²Zakład Bezpieczeństwa Zdrowotnego Środowiska

ABSTRACT

Comparative of studies of genomes of invertebrates and humans shows that in invertebrates including insects there are numerous homologues of human's genes coding proteins involved in recognition pathogens or transduction of the expression signal. Thanks this features, insects such as *Drosophila melanogaster* M., *Blattella germanica* L., *Culex quinquefasciatus* S., *Bombyx mori* L. and *Galleria mellonella* L. are used in studies on virulence, host resistance or in assessing the *in vivo* efficacy of antibiotics, fungicides and other biologically active substances. *G. mellonella* (greater wax moth) are rapid growth, high fertility, size and short life cycle insects- these are features that should be met by good model organisms; therefore the number of researches with larvae of wax moth as the model organism for pathogens assays grows from year to year. This is showing by number of scientific publications about infection's model of *G. mellonella*. An obstacle in the wide use of *G. mellonella* caterpillars as a model in biomedical research is the lack of standardized breeding of these insects, which would guarantee the reproducibility of the obtained results and lack of procedures and standards according to which biomedical research will be carried out. Despite this, the *G. mellonella* model can be used in the initial analysis before conventional *in vivo* tests and to reduce the number of tests performed on mammals.

Key words: *Galleria mellonella*, model organism, virulence

STRESZCZENIE

Badania porównawcze genomów bezkręgowców i ludzi wykazują, że u bezkręgowców w tym również owadów znajdują się liczne homologi ludzkich genów kodujących białka zaangażowane w rozpoznanie patogenów lub transdukcję sygnału ekspresji. Dzięki tym cechom, owady takie jak *Drosophila melanogaster* M., *Blattella germanica* L., *Culex quinquefasciatus* S., *Bombyx mori* L. a także *Galleria mellonella* L. są wykorzystywane w badaniach wirulencji mikroorganizmów, odporności gospodarza lub też w ocenie skuteczności *in vivo* antybiotyków, fungicydów i innych substancji biologicznie czynnych. Barciaki większe *G. mellonella* to owady, które charakteryzuje: szybki wzrost, duża płodność, rozmiar oraz stosunkowo krótki cykl życiowy - są to cechy, jakie powinien spełniać dobry organizm modelowy, dlatego liczba badań z zastosowaniem larw barciaka większego, jako organizmu modelowego dla patogenów, wzrasta z roku na rok. Obrazuje to liczba naukowych artykułów na temat modeli zakażenia *G. mellonella*.

Przeszkodą w szerokim stosowaniu gąsienic *G. mellonella*, jako modelu w badaniach biomedycznych, jest brak wystandaryzowanych hodowli tych owadów, które gwarantowałyby powtarzalność otrzymanych wyników oraz wystandaryzowanych procedur i norm, wg których prowadzone będą badania biomedyczne. Pomimo tego, model *G. mellonella* może być wykorzystywany w początkowej analizie, poprzedzającej konwencjonalne testy *in vivo* oraz w celu ograniczenia liczby testów wykonywanych na ssakach.

Słowa kluczowe: *Galleria mellonella*, organizm modelowy, zjadliwość

INTRODUCTION

A model organism chosen for studies on pathogenesis of viral, bacterial or fungal infections should provide the opportunity of creating a condition similar to the development of the disease in the human body. The following processes should be reconstructed - from the stage of colonization to the defense response of the organism. The most common model in biomedical research are vertebrates belonging to rodents and lagomorphs, such as: mice, rats, guinea pigs or rabbits, due to their anatomical and immunological similarity to humans. Using a large number of these mammals in experiments is difficult for logistic, economic and ethical reasons, therefore invertebrates can be used as alternatives to vertebrates in many areas of research, testing and education (1, 2).

Comparative studies of genomes show that in invertebrates, including insects, there are numerous homologues of human genes coding proteins involved in pathogen recognition or signal transduction (1). Thanks to these traits insects such as: *Drosophila melanogaster* M., *Blattella germanica* L., *Galleria mellonella* L., *Culex quinquefasciatus* S., *Bombyx mori* L. are used in studies of virulence of microorganisms, host immunity or in assessing the *in vivo* efficacy of antibiotics, fungicides and other biologically active substances.

THE GREATER WAX MOTH *GALLERIA MELLONELLA*

Greater wax moths *G. mellonella*, are insects that in natural conditions inhabit beehives. Their larvae feed on beeswax, honey and bee pollen. At high density they cause damage to bee breeding - they destroy brood comb. They pollute beehives with their feces, which is a good base for development of fungi; they change thermal balance in the beehive, adversely affecting development of bee colonies - so they are treated as apiary pests. The insects are easy to grow in artificial breeding.

G. mellonella can be bred on natural honeycomb or on culture media (for example, according to Sehna), which most often include: honey, sugar, glycerin, wheat bran, wheat germs, wheat flour and corn flour, powdered milk, yeast. There are reports on the influence of nutrients on the modification of some of the physiological characteristics of these insects. An example is the work of Shaik et al. (3), in which it was found that replacing powdered milk with silk derived from: *G. mellonella* (from larvae or cocoons), *B. mori* silkworms or silk thread proteins

WSTĘP

Organizm modelowy wybrany do badań nad patogenezami infekcji wirusowych, bakteryjnych czy grzybiczych powinien stwarzać możliwość uzyskania stanu przypominającego rozwój choroby w ludzkim organizmie. Odtworzone powinny być kolejne procesy - od etapu kolonizacji aż do reakcji obronnej organizmu. Najczęściej model w badaniach biomedycznych stanowią kręgowce należące do gryzoni i zajęczaków, takich jak: myszy, szczury, świnki morskie lub króliki, ze względu na ich podobieństwo anatomiczne i immunologiczne do człowieka. Wykorzystanie dużej liczby tych ssaków w doświadczeniach jest trudne z powodów logistycznych, ekonomicznych oraz etycznych, dlatego bezkręgowce mogą służyć jako alternatywne zamienniki dla kręgowców i być wykorzystywane w wielu obszarach badań, testów i edukacji (1, 2).

Badania porównawcze genomów wykazują, że u bezkręgowców, w tym również owadów, znajdują się liczne homologi ludzkich genów kodujących białka zaangażowane w rozpoznanie patogenów lub transdukcję sygnału (1). Dzięki tym cechom, owady, takie jak: *Drosophila melanogaster* M., *Blattella germanica* L., *Galleria mellonella* L., *Culex quinquefasciatus* S., *Bombyx mori* L. są wykorzystywane w badaniach wirulencji mikroorganizmów, odporności gospodarza lub też w ocenie skuteczności *in vivo* antybiotyków, fungicydów i innych substancji biologicznie czynnych.

BARCIAK WIĘKSZY *GALLERIA MELLONELLA*

Barciaki większe *G. mellonella* zwane również molami woskowymi to owady, które w naturalnych warunkach zasiedlają pszczele ule. Ich larwy odżywiają się woskiem pszczelim, miodem i pierzgą. Przy dużym zagęszczeniu powodują szkody w hodowlach pszczół - niszczą w ulach plastry z czerwiem; zanieczyszczają ule swoimi odchodami, które są dobrym podłożem do rozwoju grzybów; zmieniają bilans termiczny w ulu wpływając niekorzystnie na rozwój kolonii pszczelich - są więc traktowane jako szkodniki pasiek.

Owady te są łatwe w hodowli w warunkach sztucznych. Barciaki mogą być prowadzone na naturalnych plastrach woskowych lub na sztucznych pożywkach (np. wg Sehna), w skład których wchodzi najczęściej: miód, cukier, gliceryna, otręby pszenne, zarodki pszenne, mąka pszenna razowa i kukurydziana, mleko w proszku, drożdże. Istnieją doniesienia o wpływie składników pokarmowych na modyfikację niektórych cech fizjologicznych tych owadów. Przykładem jest praca Shaik i wsp. (3), w której stwierdzono, że zastąpienie mleka w proszku w pożywkę jedwabiem pochodzących od: *G. mellonella* (z larw lub kokonów), jedwabników *Bombyx mori* lub białkami nici jedwab-

of insects: with sericin and fibroin reduces food intake, resulting from more difficult digestibility of silk, with simultaneous increase in production of silk thread necessary to form cocoons (3). In our own experiments, it was observed that larvae of wax moths fed with natural honeycombs were in better condition (larger and more viable) than those given medium based on melted wax with additives or that with bran (unpublished authors' observations).

The female greater wax moth is able to deposit 1500 eggs. The development cycle of *G. mellonella* is closely related to the ambient temperature and lasts from 4-5 weeks to 6 months, in optimal conditions on average 6 weeks.

G. mellonella larvae, in contrast to many other alternative models e.g. *B. mori* can grow in a wide temperature range (18 - 37°C). This feature is particularly important and useful in research conducted using human pathogens, which in most cases require incubation at 37°C. Another advantage of this model is the large size of the larvae of these insects compared to, for example, *D. melanogaster*. *G. mellonella* larvae reach from 12 to 25 mm in length, which facilitates insect manipulation, easy application of the studied pathogen or active substance tested in a precise dose. Their size also allows collection of more samples such as: hemolymph, insect fat body and other tissues for testing. Additional advantage is the ability to obtain results in a short time, even within 24-48 hours. The results of the experiments are easy to observe, usually visible as physical changes (color change - melanization, larva shape, slower movement) in comparison with insects from control.

The features of *G. mellonella* described above correspond to the features that should be possessed by model organism (rapid growth, high fertility, size and relatively short life cycle). *G. mellonella* larvae are used for research in the last stages of development.

Research on innate immunity of mammals showed similarities to the immune system of invertebrates, including insects (4). Insects, unlike people, have not developed so-called acquired immunity, based on specific antibodies produced by lymphocytes that specifically and efficiently recognize the pathogen. In response to infection, insects are able to synthesise and secrete a series of proteins to hemolymph. The so-called immune peptides give unspecific resistance to a number of microorganisms (5). The humoral immune response of insects is manifested by melanization and coagulation of the hemolymph. The *G. mellonella* cell-mediated immunity system is associated with 6 types of hemocytes responsible for phagocytosis, nodulation and encapsulation (1, 6). Two of the six types of hemocytes use reactive oxygen species

ných: serycyną i fibroiną pochodzenia owadziego powoduje zmniejszenie spożycia pokarmu, wynikające z trudniejszej strawności jedwabiu, przy jednoczesnym wzroście produkcji jedwabnej nici niezbędnej do tworzenia kokonów (3). W doświadczeniach własnych zaobserwowano, że larwy barciaków karmione naturalnymi plastrami pszczelimi były w lepszej kondycji (były większe i bardziej żywotne), niż osobniki, którym podawano pożywkę opartą na przetopionym wosku z dodatkami lub tę z udziałem otrębów (obserwacje własne niepublikowane).

Samica barciaka większego jest zdolna do złożenia 1500 jaj. Cykl rozwojowy *G. mellonella* jest ściśle uzależniony od temperatury otoczenia i trwa od 4-5 tygodni do 6 miesięcy, w optymalnych warunkach średnio 6 tygodni.

Larwy *G. mellonella*, w przeciwieństwie do wielu innych alternatywnych modeli, np. *B. mori*, mogą się rozwijać w szerokim zakresie temperatur 18 – 37°C. Cecha ta jest szczególnie ważna i przydatna w czasie badań prowadzonych z wykorzystaniem ludzkich patogenów, które w większości wymagają inkubacji w temperaturze 37°C. Kolejną zaletą tego modelu jest duży rozmiar larw tych owadów w porównaniu do np. *D. melanogaster*. Larwy barciaka osiągają od 12 do 25 mm długości, co ułatwia manipulowanie owadem, umożliwia łatwą aplikację badanego patogenu lub badanej substancji czynnej w precyzyjnej dawce, ich wielkość pozwala na pobór większej ilości próbek np.: hemolimfy, ciała tłuszczowego i innych tkanek do badań. Ponadto dodatkową zaletą jest możliwość uzyskania wyników w krótkim czasie, nawet w ciągu 24–48 godzin. Wyniki założonych eksperymentów są łatwe w obserwacji, najczęściej widoczne jako zmiany fizyczne (zmiana koloru - melanizacja, kształtu larwy, spowolniony ruch) w porównywaniu z owadami z kontroli.

Przedstawione powyżej cechy barciaka większego odpowiadają jak najbardziej cechom, jakie powinien posiadać organizm modelowy (szybki wzrost, duża płodność, rozmiar oraz stosunkowo krótki cykl życiowy).

Do badań wykorzystuje się larwy *G. mellonella* będące w ostatnich stadiach rozwojowych.

Badania nad wrodzoną odpornością ssaków wykazały podobieństwa do układu odpornościowego bezkręgowców, w tym owadów (4). Chociaż owady nie wykształciły tzw. odporności nabytej, jaką posiadają ludzie, opartej na swoistych przeciwciałach produkowanych przez limfocyty (specyficznie i sprawnie rozpoznających patogen), to owady w odpowiedzi na zakażenie są zdolne do syntetyzowania i wydzielania do hemolimfy serii białek, tzw. peptydów odpornościowych, które nadają niespecyficzną odporność na szereg mikroorganizmów (5). Humoralna reakcja od-

and lytic enzymes to eliminate microorganisms in a manner similar to human neutrophils (6). Studies carried out in recent years have shown that despite lack of antibodies, insects have immunological memory. It means that insects that previously overcome infection caused by a given microorganism become more resistant to another. Moreover, increased resistance can be passed on to subsequent generations (7).

Due to the features mentioned and described above, *G. mellonella* larvae are used in studies on pathogenesis of microorganisms which are a source of human infections and on effectiveness of therapeutic substances. Growing popularity of this model of infection is illustrated by scientific articles about the model of *G. mellonella* infection. More than 1,000 of them appeared in the medical search engine PubMed, of which more than 200 were published in 2014-2015 (6).

GALLERIA MELLONELLA AS A SOURCE OF PEPTIDE

There are various proteins and peptides in the hemolymph of insects that have antimicrobial properties. That is why hemolymph is a source of searching for substances that can be alternative to antibiotics and antifungal agents.

The main place of synthesis of antimicrobial peptides is the insect's fat body and to a lesser extent hemocytes and epithelial cells (8). Peptides are isolated from the hemolymph of *G. mellonella* caterpillars previously immunized with a suspension of microorganisms. The larvae may be infected with pathogens through different routes: topical, parenteral and injection. The most effective and the most commonly used technique for immunizing larvae with microorganisms is injecting a suspension of microbial cells directly into the hemocoel. Caterpillars chosen for the experiment should be in the last larval stage and weigh 250-350 mg (1, 9, 10, 11, 12, 13, 14).

According to the *Antimicrobial Peptides Database* 17 peptides were isolated from *G. mellonella* caterpillars until January 2018 (Table I).

pornościowa owadów objawia się melanizacją i krzepnięciem hemolimfy. System odporności komórkowej *G. mellonella* związany jest z występowaniem 6 typów hemocytów odpowiedzialnych za fagocytozę, nodulację oraz inkapsulację (1, 6). Dwa z sześciu typów hemocytów wykorzystują reaktywne formy tlenu i enzymy lityczne w celu eliminacji mikroorganizmów w sposób podobny do ludzkich neutrofilów (6). Badania wykonane w przeciągu ostatnich lat wykazały, że mimo braku przeciwciał owady posiadają pamięć immunologiczną, co oznacza, że owady, które wcześniej pokonały infekcję wywołaną danym mikroorganizmem stają się bardziej odporne na kolejną, co więcej zwiększona odporność może być przekazana kolejnym pokoleniom (7).

Z powodu cech wymienionych i opisanych powyżej larwy *G. mellonella* są coraz częściej stosowane w badaniach nad patogenezą drobnoustrojów będących źródłem zakażeń u człowieka oraz skutecznością substancji terapeutycznych. Rosnącą popularnością tego modelu infekcji obrazują coraz liczniej ukazujące się artykuły naukowe na temat modelu zakażenia *G. mellonella*. W wyszukiwarce medycznej PubMed ukazało się ich ponad 1000, z których więcej niż 200 opublikowano w latach 2014-2015 (6).

GALLERIA MELLONELLA JAKO ŹRÓDŁO PEPTYDÓW

W hemolimfie owadów znajdują się różne białka i peptydy, które mają właściwości przeciwdrobnoustrojowe, dlatego jest ona źródłem poszukiwań substancji, które mogą być alternatywą dla antybiotyków i środków przeciwgrzybiczych.

Głównym miejscem syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych jest ciało tłuszczowe owadów, w mniejszym stopniu hemocyty i komórki nabłonkowe (8). Peptydy izolowane są z hemolimfy gąsienic *G. mellonella* wcześniej immunizowanych zawiesiną mikroorganizmów. Larwy mogą być infekowane patogenem różnymi drogami, obejmują one podawanie miejscowe, pozajelitowe i iniekcję. Najefektywniejszą i najczęściej stosowaną techniką immunizowania larw mikroorganizmami jest iniekcja zawiesiny komórek drobnoustrojów bezpośrednio do hemocelu. Gąsienice wybierane do doświadczenia powinny znajdować się w ostatnich stadiach larwalnych i ważyć 250-350 mg (1, 9, 10, 11, 12, 13, 14).

W bazie danych *Antimicrobial Peptides Database* do stycznia 2018 roku umieszczono informację o 17 peptydach wyizolowanych z gąsienic barciaka większego *G. mellonella* (Tabela I).

Table I. Antimicrobial peptides isolated from the hemolymph of the caterpillars *G. mellonella* (data from the Antimicrobial Peptides Database and the website www.uniprot.org)
 Tabela I. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe wyizolowane z hemolimfy gąsienic *G. mellonella* (dane pochodzą z bazy danych Antimicrobial Peptides Database i strony internetowej www.uniprot.org)

No./Lp	Name/ APD ID (identification number in Antimicrobial Peptides Database Nazwa/ APD ID (nr identyfikacyjny w bazie Antimicrobial Peptides Database Gm proline-rich antimicrobial peptide1 (AP00748)	Sequence/Sekwencja	Activity/Działanie	Source/Zródło
1		DIQIPGIKPKPTHR- DIIIPNWNPNVVR- TQPWQRFGGNKS	<p>- antibacterial against gram-positive bacterium <i>M.luteus</i> (MIC = 55,0 µM). It has no antibacterial activity against gram-positive bacteria <i>B.curculans</i> and <i>L. monocytogenes</i> and gram-negative bacteria <i>E. coli</i> D31 and <i>E. coli</i> ATCC 25922.</p> <p>- antifungal against <i>P. pastoris</i> (MIC = 16,5 µM), <i>Z. marxianus</i> (MIC = 16,5 uM), <i>S. pombe</i> (MIC = 11,0 uM) and <i>C.wickerhamii</i> (MIC = 16,5 uM), but it does not show antifungal activity against <i>A. niger</i> and <i>C. albidus</i>.</p> <p>- przeciwbakteryjne przeciwko bakterii Gram-dodatniej <i>M.luteus</i> (MIC = 55,0 µM). Nie wykazuje działania przeciwbakteryjnego wobec Gram-dodatnich bakterii <i>B. curculans</i> i <i>L. monocytogenes</i> oraz bakterii Gram-ujemnych <i>E. coli</i> D31 i <i>E. coli</i> ATCC 25922.</p> <p>- przeciwgrzybicze przeciwko <i>P. pastoris</i> (MIC = 16,5 µM), <i>Z. marxianus</i> (MIC = 16,5 uM), <i>S. pombe</i> (MIC = 11,0 uM) i <i>C.wickerhamii</i> (MIC = 16,5 uM), ale nie wykazuje działania przeciwgrzybiczego przeciwko <i>A. niger</i> i <i>C. albidus</i>.</p>	Mak P, Chmiel D, Gacek GJ.: Antibacterial peptides of the moth Galleria mellonella. Acta Biochim Pol 2001; 48: 1191-1195
2	Gm cecropin D-like peptide (AP00755)	ENFFKEIER- AGQRIRDAL- ISAAPAVETLAQA- QKIHKGGD	<p>- antibacterial against gram-positive bacteria <i>M. luteus</i> (MIC = 34,4 µM), <i>L. monocytogenes</i> (MIC = 34,4 µM) and <i>S. lutea</i> (MIC = 34,4 µM) and gram- negative bacterium <i>E. coli</i> D31 (MIC = 8,6 uM). It does not show antibacterial activity against gram-positive bacteria <i>B. ceculculans</i> and gram-negative bacteria <i>E. coli</i> ATCC 25922 and <i>S. typhimurium</i>.</p> <p>- antifungal against <i>A. niger</i>, but it does not show antifungal activity against <i>C. albicans</i>, <i>C. wickerhamii</i>, <i>F. oxysporum</i>, <i>P. pastoris</i>, <i>P. tannophilus</i>, <i>S. cerevisiae</i>, <i>T. harzianum</i> and <i>Z.marxianus</i>.</p> <p>- przeciwbakteryjne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim <i>M. luteus</i> (MIC = 34,4 µM), <i>L. monocytogenes</i> (MIC = 34,4 µM) i <i>S. lutea</i> (MIC = 34,4 µM) oraz bakteria Gram-ujemna <i>E. coli</i> D31 (MIC = 8,6 uM). Nie wykazuje działania przeciwbakteryjnego przeciwko Gram-dodatnim bakteriom <i>B. ceculculans</i> i bakteriom Gram-ujemnym <i>E.coli</i> ATCC 25922 i <i>S. typhimurium</i>.</p> <p>- przeciwgrzybicze przeciwko <i>A. niger</i>, ale nie wykazuje działania przeciwgrzybiczego przeciw <i>C. albicans</i>, <i>C. wickerhamii</i>, <i>F. oxysporum</i>, <i>P. pastoris</i>, <i>P. tannophilus</i>, <i>S. cerevisiae</i>, <i>T. harzianum</i> i <i>Z. marxianus</i>.</p>	

3	Gm anionic peptide 1 (Lebocin-like anionic peptide 1) (AP00749)	EADPEPLWLY-KGDNIERAPT-TADHPILPSIID-DVKLDPNRRYA	<p>- antibacterial against gram-positive bacteria <i>M. luteus</i> (MIC = 22.7 µM) and <i>L. monocytogenes</i> (MIC = 90,9 µM). Lacking antibacterial activity against <i>B. circulans</i>, <i>S. aureus</i> and <i>S. lutea</i> and gram-negative bacteria <i>E. coli</i> D31, <i>E. coli</i> ATCC 25922 and <i>S. typhimurium</i>.</p> <p>- antifungal against <i>A. niger</i> (MIC = 90,9 µM) and <i>T. harzianum</i> (MIC = 90,9 µM), but it has no activity against <i>S. cerevisiae</i>, <i>P. pastoris</i>, <i>Z. marxianus</i>, <i>C. albicans</i>, <i>C. fructus</i>, <i>F. oxysporum</i>.</p> <p>- przeciwbakteryjne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim <i>M. luteus</i> (MIC = 22.7 µM) i <i>L. monocytogenes</i> (MIC = 90,9 µM). Brakuje aktywności przeciwbakteryjnej przeciwko Gram-dodatnim bakteriom <i>B. circulans</i>, <i>S. aureus</i> i <i>S. lutea</i> oraz bakteriom Gram-ujemnym <i>E. coli</i> D31, <i>E. coli</i> ATCC 25922 i <i>S. typhimurium</i>.</p> <p>- przeciwgrzybicze przeciwko <i>A. niger</i> (MIC = 90,9 µM) i <i>T. harzianum</i> (MIC = 90,9 µM), ale nie wykazuje działania przeciwgrzybiczego przeciw <i>S. cerevisiae</i>, <i>P. pastoris</i>, <i>Z. marxianus</i>, <i>C. albicans</i>, <i>C. fructus</i>, <i>F. oxysporum</i>.</p>	Cytyńska M, Mak P, Zdybicka-Barabas A, Suder P, Jakubowicz T.: Purification and characterization of eight peptides from <i>Galleria mellonella</i> immune hemolymph. Peptides 2007; 28: 533-546
4	Gm proline-rich peptide 2 (AP00750)	EIRLPEPFR-FPSTVPKPIDID-PILPHPWSPRQTY-PIARRS	<p>- antibacterial</p> <p>- przeciwbakteryjne</p>	
5	Gm defensin-like peptide (AP00752)	DKLIGSCVWGAT-NY T S D C N A E C - K R R G Y K G G H C - G S F W N V N C W C E E	<p>- antibacterial activity against gram-positive bacterium <i>S. lutea</i> (MIC = 1,9 µM). It has no antibacterial activity against gram-positive bacteria <i>L. monocytogenes</i> and <i>M. luteus</i> and gram-negative bacteria <i>E. coli</i> D31, <i>E. coli</i> ATCC 25922 and <i>S. typhimurium</i>.</p> <p>- antifungal against <i>A. niger</i> (MIC = 2,9 µM), <i>C. albicans</i> (MIC = 2,9 µM), <i>C. fructus</i> (MIC = 2,9 µM), <i>C. wickerhamii</i> (MIC = 2,9 µM), <i>P. pastoris</i> (MIC = 2,9 µM), <i>P. stiptis</i> (MIC = 2,9 µM), <i>P. tannophilus</i> (MIC = 2,9 µM), <i>T. harzianum</i> (MIC = 2,9 µM) and <i>Z. marxianus</i> (MIC = 2,9 µM), but no antifungal activity against <i>C. albidus</i>, <i>F. oxysporum</i> and <i>S. cerevisiae</i>.</p> <p>- przeciwbakteryjnie przeciwko bakterii Gram-dodatniej <i>S. lutea</i> (MIC = 1,9 µM). Nie wykazuje działania przeciwbakteryjnego wobec Gram-dodatnich bakterii <i>L. monocytogenes</i> i <i>M. luteus</i> oraz bakterii Gram-ujemnych <i>E. coli</i> D31, <i>E. coli</i> ATCC 25922 i <i>S. typhimurium</i>.</p> <p>- przeciwgrzybicze przeciwko <i>A. niger</i> (MIC = 2,9 µM), <i>C. albicans</i> (MIC = 2,9 µM), <i>C. fructus</i> (MIC = 2,9 µM), <i>C. wickerhamii</i> (MIC = 2,9 µM), <i>P. pastoris</i> (MIC = 2,9 µM), <i>P. stiptis</i> (MIC = 2,9 µM), <i>P. tannophilus</i> (MIC = 2,9 µM), <i>T. harzianum</i> (MIC = 2,9 µM) i <i>Z. marxianus</i> (MIC = 2,9 µM), ale brak aktywności przeciwgrzybiczej przeciwko <i>C. albidus</i>, <i>F. oxysporum</i> i <i>S. cerevisiae</i>.</p>	

6	Gm apolipophorin (AP00753)	VQETQKLAK- TVGANLEETNK- KLAPQIKSAYD- DFVKQAQEVQK- KLHEAASKQ	- antibacterial against Gram – positive bacteria - przeciwbakteryjne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim	
7	Gm anionic antimicrobial peptide 2 (AP00754)	ETESTPDYLK- NIQQLEEYTKN- FNTQVQNAFSD- KIKSEVNNFIESLG- KILNTEKKEAPK .	- antibacterial against Gram – positive bacteria <i>M. luteus</i> (MIC = 86,6 µM), <i>L. monocytogenes</i> (MIC = 86,6 µM) and <i>S. lutea</i> (MIC = 86,6 µM). Lacking activity against gram-positive bacteria: <i>B. circulans</i> and <i>S. aureus</i> and gram-negative bacteria: <i>E. coli</i> D31, <i>E. coli</i> ATCC 25922 and <i>S. typhimurium</i> . - antifungal against <i>P. pastoris</i> (MIC = 86,6 µM) and <i>P. stipitis</i> (MIC = 90,9 µM), but it does not show antifungal activity against <i>A. niger</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. fructus</i> , <i>C. wickerhamii</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , <i>T. harzianum</i> and <i>Z. marxianus</i> - przeciwbakteryjne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim <i>M. luteus</i> (MIC = 86,6 µM), <i>L. monocytogenes</i> (MIC = 86,6 µM) i <i>S. lutea</i> (MIC = 86,6 µM). Brakuje aktywności przeciwbakteryjnej przeciwko Gram-dodatnim bakteriom <i>B. circulans</i> i <i>S. aureus</i> oraz bakteriom Gram-ujemnym <i>E. coli</i> D31, <i>E. coli</i> ATCC 25922 i <i>S. typhimurium</i> . - przeciwgrzybicze przeciwko <i>P. pastoris</i> (MIC = 86,6 µM) i <i>P. stipitis</i> (MIC = 90,9 µM), ale nie wykazuje działania przeciwgrzybiczego przeciwko <i>A. niger</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. fructus</i> , <i>C. wickerhamii</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , <i>T. harzianum</i> i <i>Z. marxianus</i>	
8	Galleria defensin (AP00751)	DTLIGSCVWGAI- NYTSDCNAEC- KRRGYKGGHCGS- FLNVNCWCE	- antifungal - przeciwgrzybicze	Lee YS, Yun EK, Jang WS, Kim I, Lee JH, Park SY, Ryu KS, Seo SJ, Kim CH, Lee IH.: Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, <i>Galleria mellonella</i> . Insect Mol Biol 2004; 13: 65-72

9	G. mellonella moricin-like peptide A (AP00834)	KVNANAIAIKKGG- KAIGKGFKVISA- ASTAHDVYEHK- NRRH	- antibacterial - przeciwbakteryjne - antifungal - przeciwgrzybicze
10	G. mellonella moricin-like peptide B (AP00835)	GKIPVKAIKKG- GQIIGKALRGINIA- STAHDIIISQFKPKK- KKNH	- antibacterial - przeciwbakteryjne - antifungal - przeciwgrzybicze
11	G. mellonella moricin-like peptide C1 (AP00836)	KVPIGAIAIKKGG- KIIKKGLGVIGA- AGTAHEVYS- HVKNRH	- antibacterial - przeciwbakteryjne - antifungal - przeciwgrzybicze
12	G. mellonella moricin-like peptide C2 (AP00837)	KVPIGAIAIKKGG- KIIKKGLGVLGA- AGTAHEVYNHVR- NRQ	- antibacterial - przeciwbakteryjne - antifungal - przeciwgrzybicze
13	G. mellonella moricin-like peptide C3 (AP00838)	KVPIGAIAIKKGG- KIIKKGLGVIGA- AGTAHEVYS- HVKNRQ	- antibacterial - przeciwbakteryjne - antifungal - przeciwgrzybicze
14	G. mellonella moricin-like peptide C4/C5 (AP00839)	KVPVGAIAIKKGG- KAIKTGLGVVGA- AGTAHEVYSHIR- NRH	- antifungal - przeciwgrzybicze - antifungal - przeciwgrzybicze
15	G. mellonella moricin-like peptide D (AP00840)	KGIGSALIKKGG- KIIKGGGLGAL- GAIGTQQQVY- EHVQNRQ	- antifungal - przeciwgrzybicze

Brown SE,
Howard A,
Kasprzak AB,
Gordon KH,
East PD.: The
discovery and
analysis of a
diverged family
of novel antifun-
gal moricin-like
peptides in the
wax moth Galle-
ria mellonella.
Insect Biochem
Mol Biol 2008;
38: 201-212

16	Gallerimycin (AP01371)	GVTTTVKPPFP- GCVFYECIANCR- SRGYKNGGYCTIN- GCQCLR	- antifungal - przeciwigrzybicze	Schuhmann B, Seitz V, Vilcinskas A, Podsiadlowski L.: Cloning and expression of gallerimycin, an antifun- gal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, Galleria mellonella. Arch Insect Biochem Physiol. 2003 Jul;53(3):125- 133
17	Galleria mellonella Lysozyme (AP02339)	KTFTRCCELVQALR- RQGFDEAKLR- DWVCLVENESR- GRTDIVGKPNKN- GSRDYGLFQIND- KYWCSNTSKAG- KDCNITCSQLLTD- DITVASKCAKKVY- KRHNFMAWY- GWRNHCQNKPLP- DISKC	- antifungal - przeciwigrzybicze	Sowa-Jasilek A, Zdybic- ka-Barabas A, Stączek S, Wydrych J, Mak P, Jakubowicz T, Cytryńska M.: Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: Galleria mello- nella anionic peptide 2 and lysozyme. Peptides, 25 Jan 2014, 53:194- 201

GALLERIA MELLONELLA - A MODEL IN MICROBIOLOGICAL TESTS

G. mellonella is sensitive to a number of microorganisms pathogenic for humans, which is why it is used in studies of microbial virulence factors and their pathogenesis. *G. mellonella* larvae are infected with selected microorganisms during the tests. After infection and incubation, the condition of caterpillars is described and evaluated basing on the following criteria (eg. according to Loh et al.): activity (lack of activity, minimal activity after stimulation, activity without stimulation)

- ability to form cocoons (no cocoon, partial cocoon, whole cocoon)
- melanization (total melanization (black larva), dark dots or brown color of larva, more than 3 dark spots on a beige larva, less than 3 dark spots on a beige larva, no melanization)
- survival (alive, dead) (15).

In the last few decades, *G. mellonella* larvae have been used in studies of many groups and species of microorganisms, including: pathogenic Gram-negative and Gram-positive bacteria and fungi. Positive correlation between virulence and host response was found in both *Galleria mellonella* and mammalian insect models for a number of microorganisms (16-26).

In the studies of Jacobs et al. (16) several *Acinetobacter baumannii* strains were compared and significant differences were found in their virulence on *G. mellonella* and mouse models. The AB5075 strain was shown to be the most virulent of all, as was the model of mouse lung infection (16). In the work of Gaddy et al. (17), comparative studies performed on *A. baumannii* strain ATCC19606T based on three models: mouse, *G. mellonella* and human (lung epithelial cells) showed similar results - impaired production of BasD which induced indirect virulence phenotype compared to the phenotype of the parent strain and BauA mutant (17). In the work Aperis et al. (18) similarity in reduction of survival of organisms in the event of delayed administration of antibiotics, such as streptomycin, in the mouse model infected with *Francisella tularensis* and the model of larvae infected with live *F. tularensis* cells (18) was demonstrated. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in model systems of mammals and insects was also compared. The results showed that this insect model could be used as a new tool of identification and characterization of virulence factors of microorganisms involved in causing diseases in mammals (19,20).

In studies on group A streptococcal virulence (GAS, *Streptococcus pyogenes*), the virulence of GAS in wax moles was strongly correlated with data obtained from vertebrate models (mice and monkeys)

GALLERIA MELLONELLA - MODEL W BADANIACH MIKROBIOLOGICZNYCH

Barciak większy jest wrażliwy na szereg mikroorganizmów patogennych dla człowieka, dlatego jest wykorzystywany w badaniach czynników wirulencji drobnoustrojów i w ich patogenezie. Larwy *G. mellonella* w trakcie badań zakaża się wybranymi drobnoustrojami. Po infekcji i inkubacji opisuje się i ocenia kondycję gąsienic biorąc pod uwagę następujące kryteria (np. wg Loh i wsp.).

- aktywność (brak aktywności, minimalna aktywność po stymulacji, aktywność bez stymulacji),
- zdolność tworzenia kokonów (brak kokonu, częściowy kokon, cały kokon),
- melanizację (całkowita melanizacja (czarna larwa), ciemne kropki lub brązowy kolor larwy, 3 i powyżej ciemne kropki na beżowej larwie, mniej niż 3 ciemne kropki na beżowej larwie, brak melanizacji)
- przeżywalność (żyje, nie żyje) (15).

W ciągu kilkadziesiąt ostatnich lat larwy *G. mellonella* zostały wykorzystane w badaniach wielu grup i gatunków drobnoustrojów, w tym: patogennych bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich i grzybów. Pozytywną korelację między wirulencją a reakcją gospodarza stwierdzono zarówno w modelach owadzych *Galleria mellonella*, jak i ssaczych dla szeregu mikroorganizmów (16-26)

W badaniach Jacobs i wsp. (16) porównano kilka szczepów *Acinetobacter baumannii*, wykryto znaczące różnice w ich zjadliwości na modelach *G. mellonella* i mysich. Wykazano, że szczep AB5075 był najbardziej wirulentny ze wszystkich wziętych do doświadczeń w stosunku do owadów, jak i modelu mysiego zakażenia płuc (16). Z kolei w pracy Gaddy i wsp. (17) badania porównawcze wykonane dla szczepu ATCC19606T *A. baumannii* oparte na trzech modelach: mysim, *G. mellonella* i ludzkim (komórka nabłonka płuc) wykazały podobne wyniki - upośledzenie produkcji BasD, który wywołuje pośredni fenotyp wirulencji w porównaniu z fenotypem szczepu rodzicielskiego i mutantu BauA (17). W pracy Aperis i wsp. (18) wykazano podobieństwo w obniżeniu przeżywalności organizmów w przypadku opóźnienia podania antybiotyków, takich jak streptomycyna w modelu mysim zakażonym *Francisella tularensis*, a systemie larw zakażonych żywymi komórkami *F. tularensis* (18). Porównywano również wirulencję mutantów bakterii *Pseudomonas aeruginosa* w układach modelowych ssaków i owadów. Wyniki wykazały, że ten owadzi model może być używany jako nowe narzędzie do identyfikacji i charakteryzowania czynników wirulencji drobnoustrojów zaangażowanych w wywoływanie chorób u ssaków (19, 20).

W badaniach prowadzonych nad wirulencją paciorkowców grupy A (GAS, *Streptococcus pyogenes*) stwierdzono, że zjadliwość GAS u larw moli woskowych silnie koreluje z danymi uzyskanymi w modelach kręgowców (myszy i mała), a zatem larwy *G. mellonella*

and therefore *G. mellonella* larvae may be useful for GAS pathogenesis testing (21). In addition to OMZ175 and B14 *Streptococcus mutans* strains it has been shown that three other strains: NCTC11060, LM7 and OM50E of less common serotypes e and f attack primary human coronary endothelial cells (HCAECs). Invasive strains have also been much more virulent than non-invasive strains in *G. mellonella* model (22). The Δ slyA mutants of three different strains of *Enterococcus faecalis* were more virulent than the starting strains in *G. mellonella* model. It has also been shown that the immune response of *G. mellonella* has many structural and functional similarities to the innate immune response in mammals. Greater wax moth larvae were a perfect infection model to assess contribution of *E. faecalis* pathogenic factors (Fsr, GelE and Ace) to virulence (23).

In infected mice, *Candida albicans* and *Candida tropicalis* were found to be highly virulent, while other *Candida* species such as *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* did not cause mortality. Comparison of virulence potential of different species of *Candida spp.* was carried out using *G. mellonella* model confirming that *C. albicans* and *C. tropicalis* are the most virulent species. In addition, these studies revealed a significant potential for the virulence of *C. parapsilosis* in *G. mellonella* leading to significant mortality of infected larvae. *C. parapsilosis* infection was fatal to *G. mellonella* larvae but not to mice (24). The work of Mylonakis et al. (25) is the first in which *Cryptococcus neoformans* strains have been shown to be more virulent for *G. mellonella* larvae at 37°C than at 30°C. *C. neoformans* H99 turned out to be the most virulent of all subjects and killed larvae at inocula of 20 CFU/larva. It has also been demonstrated that the *C. neoformans* polysaccharide capsule and the GPA1, PKA1 and RAS1 genes are responsible for the virulence of mammals and also of larvae. The correlation between the virulence in *G. mellonella* and mammalian models suggests that the *G. mellonella*-*C. neoformans* model can be used to identify new genes in *C. neoformans* involved in virulence as well as to evaluate *in vivo* new antifungal agents (25).

In the study of *Aspergillus fumigatus* fungus mutants using large larvae, the sidC and sidD deletion mutants showed attenuated virulence in insects, whereas the *A. fumigatus* cpcA, sidA, sidF and paba deletion mutants were avirulent. These results were comparable to those obtained from mammalian models such as mice (26).

G. mellonella - virus model has not been shown to be suitable for studies of human viral pathogens. The literature describes research on cellular immune response of greater wax moth larvae infected with BHSV-1 bovine herpes virus (27).

la mogą być użytecznym organizmem do badania patogenezы GAS (21). Oprócz szczepów OMZ175 i B14 *Streptococcus mutans*, wykazano, że jeszcze trzy inne szczepy, takie jak: NCTC11060, LM7 i OM50E mniej rozpowszechnionych serotypów e i f atakują pierwotne ludzkie komórki śródbłonna naczyń wieńcowych (HCAEC). Szczepy inwazyjne były również znacznie bardziej zjadliwe niż nieinwazyjne szczepy w modelu *G. mellonella* (22). Mutanty Δ slyA trzech różnych szczepów *Enterococcus faecalis* były bardziej zjadliwe niż szczepy wyjściowe w modelu *G. mellonella*. Wykazano także, że odpowiedź immunologiczna *G. mellonella* ma wiele strukturalnych i funkcjonalnych podobieństw do wrodzonej odpowiedzi immunologicznej u ssaków. Larwy barciaka większego były doskonałym modelem infekcji do oceny udziału czynników patogennych *E. faecalis* (Fsr, GelE i Ace) w wirulencji (23).

U myszy zakażonych grzybami z rodzaju *Candida*, stwierdzono, że *Candida albicans* i *Candida tropicalis* są wysoce wirulentne, podczas gdy inne gatunki *Candida*, takie jak *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* i *Candida krusei*, nie wywoływały śmiertelności. Porównanie potencjału wirulencji różnych gatunków *Candida spp.* przeprowadzono z wykorzystaniem modelu *G. mellonella*, potwierdzając, że *C. albicans* i *C. tropicalis* to najbardziej zjadliwe gatunki. Ponadto badania te ujawniły znaczny potencjał wirulencji *C. parapsilosis* w *G. mellonella* prowadzący do znacznej śmiertelności zakażonych larw. Infekcja *C. parapsilosis* była śmiertelna dla larw *G. mellonella*, ale nie dla myszy (24). Praca Mylonakis i wsp. (25) jest pierwszą, w której wykazano, że szczepy grzyba *Cryptococcus neoformans* były bardziej zjadliwe dla larw *G. mellonella* w temperaturze 37°C niż w 30°C. *C. neoformans* H99 okazał się być najbardziej wirulentny ze wszystkich badanych, zabijał larwy przy innokulum 20 CFU/larwę. Dowiedziono również, że otoczka polisacharydowa *C. neoformans* i geny GPA1, PKA1 i RAS1 są odpowiedzialne za wirulencję ssaków i także larw. Korelacja między wirulencją w *G. mellonella* i modelach ssaków sugeruje, że model *G. mellonella*-*C. neoformans* może być stosowany do identyfikacji nowych genów u *C. neoformans* zaangażowanych w zjadliwość, jak również do oceny *in vivo* nowych środków przeciwgrzybiczych (25).

W badaniu mutantów grzyba *Aspergillus fumigatus* z wykorzystaniem larw barciaka większego wykazano, że mutanty delecyjne sidC i sidD wykazywały atenuowaną zjadliwość w owadach, natomiast mutanty delecyjne *A. fumigatus* cpcA, sidA, sidF i paba były niezjadliwe. Wyniki te były porównywalne z danymi uzyskanymi z ocen wykonanych w modelach ssaczycy, takich jak myszy (26).

Model *G. mellonella* - wirus do tej pory nie okazał się odpowiedni do badań nad wirusowymi patogenami ludzi. W literaturze dostępna jest pozycja opisująca badania nad komórkową odpowiedzią immunologiczną larw barciaka zakażonych bydłym wirusem opryszczki BHSV-1 (27).

GALLERIA MELLONELLA - MODEL IN TESTS
OF ACTIVE ANTIBACTERIAL, ANTIFUNGAL,
ANTICANCER SUBSTANCE

Galleria mellonella may also play a key role in studies on toxicity and efficacy of antibiotics, antifungal agents already existing and new pharmaceuticals for human and animal diseases, thus saving vertebrates in preliminary studies. Antimicrobial agents can be injected directly into the larvae hemocoel by proleg (injection method). In majority of studies single doses of test substances were used and administered 30 minutes to 2 hours after infecting the larvae with the pathogen. In some cases the substances were administered immediately after infection with microorganisms, or even before infection.

In order to study the *in vivo* activity of antibiotics, such as: gentamycin, cefotaxime and tetracycline, and meropenem, which *in vitro* inhibited the investigated organisms effectively, infection model of *G. mellonella* larvae with *A. baumannii* strains of various virulence was used (28). Caterpillars of wax moles were infected with a clinical strain of *A. baumannii* (A9844) sensitive to meropenem and gentamicin, but resistant to tetracycline and cefotaxime. Infected insects were treated with a single dose of gentamicin (6 mg/kg), cefotaxime (150 mg/kg), tetracycline (50 mg/kg) and meropenem (60 mg/kg). Antibiotics used acted therapeutically on the wax moth larvae infected with strain A9844. Comparative *G. mellonella* larvae infected with the carbapenem-resistant strain *A. baumannii* (A3587) were not sensitive to the given meropenem (below 12% survival). The data obtained by Pelega et al. (28) showed that *G. mellonella* infection model - *A. baumannii* can be used to test the effectiveness of antimicrobial agents and can provide a more simplified system than mammalian models (28). In the work Desbois et al. (29) showed that clinically approved antibiotics are effective in this model and prevent infections caused by Gram-positive bacteria, in particular *Staphylococcus aureus* and MRSA. In addition, daptomycin and vancomycin are effective in a model of wax moth larvae in doses similar to those recommended for use in humans with *S. aureus* or MRSA infections. Both antibiotics increased the survival of the larvae when they were administered prior to bacterial infection. It was also found that effective dose of penicillin G given to *G. mellonella* larvae infected with penicillin-susceptible Newman strain does not differ from the dose administered to humans and is about 30-60 mg/kg/day. These findings confirm that *G. mellonella* model may be useful for assessing the *in vivo* efficacy of new agents against *S. aureus* and MRSA (29). Combinations of antibiotics were used in some of the works and the synergy

GALLERIA MELLONELLA
- MODEL W BADANIACH SUBSTANCJI
CZYNNYCH – PRZECIWBAKTERYJNYCH,
PRZECIWGRZYBICZYCH,
PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Barciaki większe mogą odgrywać również kluczową rolę w badaniach toksyczności i skuteczności antybiotyków, środków przeciwwgrzybiczych już istniejących i nowych farmaceutyków na choroby ludzi i zwierząt, oszczędzając w ten sposób kręgowce we wstępnych badaniach.

Środki przeciwdrobnoustrojowe można wstrzykiwać larwom bezpośrednio do hemocoelu poprzez posuwki (metoda iniekcyjna). W większości badań stosowano pojedyncze dawki badanych substancji, podawane 30 minut do 2 godzin po zakażeniu larw badanych patogenem. W niektórych przypadkach substancje podawano natychmiast po infekcji drobnoustrojami, lub jeszcze przed zakażeniem.

W celu zbadania aktywności *in vivo* antybiotyków, takich jak: gentamycyna, cefotaksym i tetracyklina oraz meropenem, które w warunkach *in vitro* hamowały skutecznie badane drobnoustroje zastosowano model infekcji larw *G. mellonella* szczepami *A. baumannii* o różnej zjadliwości (28). Gąsienice moli woskowych zakażono klinicznym szczepem *A. baumannii* (A9844), który był wrażliwy na meropenem i gentamycynę, ale oporny na tetracyklinę i cefotaksym. Zakażone owady traktowano pojedynczą dawką gentamycyny (6 mg/kg), cefotaksymu (150 mg/kg), tetracykliny (50 mg/kg) i meropenemu (60 mg/kg). Zastosowane antybiotyki działały leczniczo na larwy barciaka większego zainfekowane szczepem A9844. Dla porównania, larwy *G. mellonella* zakażone opornym na karbapenem szczepem *A. baumannii* (A3587) nie były wrażliwe na podany meropenem (przeżyło mniej niż 12%). Dane otrzymane przez Pelega i wsp. (28) wykazały, że model zakażenia *G. mellonella* - *A. baumannii* może być stosowany do badania skuteczności środków przeciwbakteryjnych i może zapewniać bardziej uproszczony system niż modele ssaków (28). Z kolei w pracy Desbois i wsp. (29) wykazano, że antybiotyki zatwierdzone klinicznie są skuteczne w tym modelu i zapobiegają infekcjom wywoływanym przez bakterie Gram-dodatnie, w szczególności *Staphylococcus aureus* i MRSA. Ponadto daptomycyna i wankomycyna są skuteczne w modelu larw barciaka większego w dawkach podobnych do tych zalecanych do stosowania u ludzi z zakażeniami *S. aureus* lub MRSA. Oba antybiotyki zwiększały przeżywalność larw, gdy były podawane przed zakażeniem bakteriami. Stwierdzono również, że skuteczna dawka penicyliny G podana larwom *G. mellonella* zakażonym podatnym na penicylinę szczepem Newmana nie różni się od dawki podawanej ludziom i wynosi około 30-60 mg/kg m.c./dobę. Odkrycia te potwierdzają, że model *G. mellonella* może okazać się przydatny do oceny skuteczności *in vivo* nowych środków przeciwko *S. aureus* i MRSA (29).

of the substances given together was quite often demonstrated. In a study conducted by Luther et al. (30) synergism of gentamicin and daptomycin injected one hour after infection with vancomycin-sensitive *E. faecalis* and vancomycin-resistant *E. faecium* (30) was demonstrated. Krezdorn et al. (31) tested many single, double and triple combinations of antibiotics against multi-drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC13437. They showed synergistic effects for several combinations of antibiotics, such as cefotaxime and piperacillin, amikacin and meropenem; or a triple combination of piperacillin, amikacin and meropenem (31). In the study of the most commonly used antifungal agents used to treat infection of *C. neoformans* a single dose of amphotericin B (1.5 mg/kg), fluconazole (14 mg/kg) and flucytosine (20 mg/kg) was used alone and in combination 48 hours after inoculation of *G. mellonella* caterpillars with *C. neoformans* strain H99 (1.2 x 10³CFU). Monotherapy with amphotericin B or flucytosine prolonged the survival of *G. mellonella* caterpillars (mortality of larvae in the control group was after 6 days, in the group of amphotericin B and flucytosine 9 after days). The combination of amphotericin B with flucytosine (the most common combination for treatment of severe human cryptococcosis) was much more effective than amphotericin B alone and was as effective as triple therapy (amphotericin B, flucytosine and fluconazole), in both cases the average mortality was after 16 days (25).

With the emergence of new resistant microbial strains, scientists are looking for new antibacterial and antifungal compounds from new groups of compounds with a new mechanism of action and low toxicity.

Staniszewska et al. (32) conducted research on the activity of the new tetrazole derivative - (6a). Single doses of compound (6a) administered 30 minutes and 1 hour before *C. albicans* inoculation significantly improved the survival of the larvae. Their ability to survive also increased in the test treated groups 30 minutes and 1 hour after inoculation of the caterpillar with *C. albicans* suspension. The new tetrazole derivative - (6a) effectively inhibited the infection and increased survival of the larvae up to 18 hours. Each larva was evaluated according to the criteria of Loh et al. (15, 32).

Januszanis et al. (33) presented studies on the influence of hemolymph of non-immunized and immunized *G. mellonella* larvae on tumor cells of the T98G human glioblastoma multiforme line. It has been proven that hemolymph, as well as its alcohol extracts, contain compounds that induce apoptosis and / or necrosis of human glioblastoma brain cells (33).

W niektórych pracach stosowano kombinacje antybiotyków i dość często wykazywano synergizm działania podawanych razem substancji. W badaniach prowadzonych przez Luther i wsp. (30) wykazano synergizm gentamycyny i daptomycyny wstrzykniętych godzinę po zakażeniu wrażliwymi na wankomycynę *E. faecalis* i opornymi na wankomycynę *E. faecium* (30). Krezdorn i wsp. (31) przetestowali wiele pojedynczych, podwójnych i potrójnych kombinacji antybiotyków przeciwko wielolekoopornym szczepom *Pseudomonas aeruginosa* NCTC13437. Wykazali oni efekty synergistyczne dla kilku kombinacji antybiotyków, takich jak cefotaksym i piperacylina, amikacyna i meropenem, lub potrójna kombinacja piperacyliny, amikacyny i meropenemu (31). W badaniu najczęściej używanych środków przeciwgrzybiczych, stosowanych w leczeniu zakażeń *C. neoformans* użyto pojedynczej dawki amfoterycyny B (1,5 mg/kg), flukonazolu (14 mg/kg) i flucytozyny (20 mg/kg), samodzielnie oraz w połączeniu 48 godzin po inokulacji gąsienic *G. mellonella* grzybem *C. neoformans* szczep H99 (1,2 x 10³CFU). Monoterapia amfoterycyną B lub flucytozyną przedłużyła przeżycie gąsienic *G. mellonella* (śmiertelność larw w grupie kontrolnej zaobserwowano po 6 dniach, w grupie amfoterycyny B i flucytozyny po 9 dniach). Kombinacja amfoterycyny B z flucytozyną (najczęściej stosowana kombinacja do leczenia ciężkiej ludzkiej kryptokokozy) była znacznie skuteczniejsza niż sama amfoterycyna B i była tak samo skuteczna jak terapia potrójna (amfoterycyna B, flucytozyna i flukonazol), w obu przypadkach śmiertelność obserwowano średnio po 16 dniach (25).

Wraz z pojawianiem się co raz to nowych, opornych szczepów drobnoustrojów naukowcy poszukują nowych związków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych spośród nowych grup związków i o nowym mechanizmie działania oraz o niskiej toksyczności.

Staniszewska i wsp. (32) przeprowadzili badania nad aktywnością nowej pochodnej tetrazolu – (6a). Pojedyncze dawki związku (6a) podawane 30 minut i 1 godzinę przed inokulacją *C. albicans* znacząco poprawiały przeżywalność larw. Ich zdolność do przeżycia wzrosła również w grupach traktowanych badaną substancją po 30 minutach i 1 godzinie po inokulacji gąsienic zawieszoną *C. albicans*. Nowa pochodna tetrazolu - (6a) skutecznie hamowała infekcję i zwiększała przeżycie larw do 18 h. Każda larwa została poddana ocenie według kryteriów Loh i wsp. (15, 32).

W pracy Januszanis i wsp. (33) przedstawiono badania wpływu hemolimfy nieimmunizowanych i immunizowanych larw *G. mellonella* na komórki nowotworowe linii ludzkiego glejaka wielopostaciowego T98G. Dowiedziono, że hemolimfa, jak również jej alkoholowe ekstrakty, zawierają związki indukujące apoptozę i /lub nekrozę komórek glejaka ludzkiego wielopostaciowego mózgu (33).

GALLERIA MELLONELLA – RESEARCH
ORGANISM IN STUDIES
OTHER THAN BIOMEDIC

Greater wax moth larvae are also used in the study of new substances and biological agents that show insecticidal activity. There are several reports on the use of *G. mellonella* in studies on insect-pathogenic viruses such as iridescent viruses: TIV (*Tipula Iridescent Virus*), *Invertebrate iridescent virus 6*, *Iridovirus* and others such as *Nodamura virus* (34).

Research is conducted on the effects of metabolites isolated from various species of entomopathogenic fungi, i.e. *Conidiobolus coronatus*, *Beauveria bassiana* and bacteria, such as: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus turingiensis* using *Galleria mellonella* larvae (35). It has been reported that larvae of some insects are likely to be involved in rapid biodegradation of PE polyethylene which decomposes slowly in the environment. Currently, several works are available on the issue of biodegradation of plastics caused by insects themselves, as well as microorganisms isolated from their intestines. In 2017, Bombelli et al. (36) found rapid biodegradation of PE by *G. mellonella* larvae but they did not isolate any bacterial strains from them. The loss of foil weight was observed after 12 hours. These larvae not only shredded the foil but ate and digested it. The product of digesting PE was ethylene glycol. It is probable that the enzymes are responsible for rapid biodegradation of polyethylene (research in progress) (36).

SUMMARY

Invertebrates, insects among them, have been used since the end of the 19th century in biological research, and for several decades also in molecular studies of pathogenesis of microorganisms: viruses, bacteria and fungi and their interaction with the host and in testing of active substances and drugs. According to data published by Susan E. Wilson-Sanders (2) 16 scientific articles concerning research using invertebrate animals were published between 1923-1943. From 1943 to 1963 the number of publications increased to almost 14,000. It was estimated that in 1963-1973 more than 40,000 works on invertebrate research appeared. In the 21st century the importance of invertebrates in biological and biomedical research has increased: in 2008-2010 there were 44,000 works in PubMed medical search engine, which describe research using selected invertebrate species as models for genetic and disease research and drug development and testing (2).

An obstacle in the wide use of *G. mellonella* caterpillars as a model in biomedical research is the use of insects from non-referential breeding studies, which

GALLERIA MELLONELLA
– ORGANIZM TESTOWY W BADANIACH
INNYCH NIŻ BIOMEDYCZNE

Larwy barciaka większego są wykorzystywane także w badaniach nowych substancji i czynników biologicznych, wykazujących działanie owadobójcze.

Istnieje kilka doniesień o zastosowaniu *G. mellonella* w badaniach nad wirusami patogennymi dla owadów, takich jak wirusy opalizujące: TIV (*Tipula Iridescent Virus*), *Invertebrate iridescent virus 6*, *Iridovirus* i inne np. *Nodamura virus* (34).

Prowadzone są badania nad działaniem metabolitów izolowanych z różnych gatunków grzybów entomopatogennych tj. *Conidiobolus coronatus*, *Beauveria bassiana* i bakterii, takich jak: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus turingiensis* z wykorzystaniem larw *Galleria mellonella* (35).

Istnieją doniesienia, że larwy niektórych owadów prawdopodobnie mogą brać udział w szybkiej biodegradacji polietylenu PE, który w środowisku ulega rozkładowi powoli. Aktualnie dostępnych jest kilka prac dotyczących zagadnienia związanego z biodegradacją tworzyw sztucznych powodowanych przez same owady, jak i mikroorganizmy izolowane z ich jelit. W 2017 Bombelli i wsp. (36) stwierdzili szybką biodegradację PE przez larwy *G. mellonella*, jednak nie izolowali z nich żadnych szczepów bakteryjnych. Ubytek masy folii był obserwowany po 12 h. Larwy te nie tylko rozdrabniały folię, ale zjadały ją i trawiły. Produktem trawienia PE był glikol etylenowy. Prawdopodobnie, za szybką biodegradację polietylenu odpowiedzialny są enzymy (badania w toku) (36).

PODSUMOWANIE

Bezkęgowce, a wśród nich owady, były wykorzystywane od końca XIX wieku w badaniach biologicznych, a od kilku dziesięcioleci również w badaniach molekularnych podstaw patogenezy drobnoustrojów: wirusów, bakterii i grzybów i ich interakcji z gospodarzem oraz w testowaniu substancji czynnych i leków. Zgodnie z danymi opublikowanymi przez Wilson-Sanders (2) w okresie 1923-1943 opublikowano 16 artykułów naukowych, dotyczących badań z wykorzystaniem zwierząt bezkręgowych, w okresie 1943-1963 liczba publikacji wzrosła już do prawie 14 000. Oszacowano, że w latach 1963-1973 pojawiło się ponad 40 000 prac dotyczących badań na bezkręgowcach. W XXI wieku wzrosło znaczenie bezkręgowców w badaniach biologicznych i biomedycznych: w latach 2008-2010 w wyszukiwarce medycznej PubMed można było odnaleźć 44 000 prac, w których opisano badania wykorzystujące wybrane gatunki bezkręgowców jako modeli do badań genetyki i chorób oraz do opracowywania i testowania leków (2).

non repetitive results. In many works commercial larvae, intended as feed for reptiles and birds and as a fishing lure, were used. In such cases, when the organisms for research came from an unknown source, there is no certainty as to the reliability and repeatability of results (37).

There is a need to conduct standardized *G. mellonella* laboratory cultures which will be the source of larvae for research and to standardize procedures and standards according to which biomedical research will be carried out. Research procedures must strictly determine testing conditions. In Pelega et al. (38) it was observed that the death of *G. mellonella* larvae by *A. baumannii* (ATCC 17978) depended on the incubation temperature after infection. Survival of infected larvae incubated at 30°C was greater than that found at 37°C. Using a suspension of *A. baumannii* with density of 3.7×10^5 CFU based on the incubation of larvae at 30°C mortality among infected *G. mellonella* caterpillars was less than 50%, and the mortality among infected larvae incubated at 37°C was 80%. There was no difference in the *A. baumannii* growth kinetics at these temperatures. The data suggest that *A. baumannii* has temperature-sensitive virulence traits or that *G. mellonella* caterpillars are less susceptible to infection at lower temperatures (38). Similar observations have been made in other works on other microorganisms such as *S. aureus* (29).

Examples of standardized larvae are individuals from the TruLarv breeding line produced by Biosystems Technology Ltd. The producer declares that insects are kept in strictly defined conditions, they are free from hormones and bactericidal substances, and the results are repeatable (39).

G. mellonella larvae do not completely replace vertebrates in biomedical research despite the similarities in the innate immune response of mammals and insects. Complete genome sequence of *G. mellonella* is not known, but research is ongoing. The insect model can certainly be and will be used for preliminary in vivo tests. The use of insects to analyze large numbers of pathogens or potential therapeutics in a short time is much less costly and laborious than research using vertebrates. The *G. mellonella* model should be used as standard in the initial analysis preceding conventional in vivo tests and to reduce the number of routine tests in mammals.

Przeszkodą w szerokim stosowaniu gąsienic *G. mellonella* jako modelu w badaniach biomedycznych jest wykorzystywanie owadów do badań z hodowli niereferencyjnych, co sprawia, że wyniki nie są powtarzalne. W wielu pracach używano larw dostępnych w handlu przeznaczonych docelowo jako karma dla gadów i ptaków oraz jako przynęta wędkarska. W takich przypadkach, kiedy organizmy do badań pochodziły z niewiadomego źródła nie ma pewności, co do rzetelności i powtarzalności wyników (37).

Istnieje potrzeba prowadzenia wystandaryzowanych hodowli laboratoryjnych *G. mellonella* będących źródłem larw do badań oraz wystandaryzowania procedur i norm, wg których prowadzone będą badania biomedyczne. Procedury badawcze muszą ściśle określać warunki prowadzenia badań. W pracy Pelega i wsp. (38) zaobserwowano, że zabicie larw *G. mellonella* przez *A. baumannii* (ATCC 17978) było zależne od temperatury inkubacji po infekcji. Przeżywalność zakażonych larw inkubowanych w 30°C była większa niż tych, które znajdowały się w temperaturze 37°C. Przy zastosowaniu zawiesiny *A. baumannii* o gęstości $3,7 \times 10^5$ CFU w przeliczeniu na larwę podczas inkubacji w temperaturze 30°C śmiertelność wśród zainfekowanych gąsienic *G. mellonella* była mniejsza niż 50%, natomiast śmiertelność wśród zakażonych larw inkubowanych w 37°C wyniosła 80%. Nie zaobserwowano żadnej różnicy w kinetyce wzrostu *A. baumannii* w tych temperaturach. Dane te sugerują, że *A. baumannii* ma wrażliwe na temperaturę cechy wirulencji lub że gąsienice *G. mellonella* są mniej podatne na infekcje w niższych temperaturach (38). Podobne obserwacje poczyniono w innych pracach, dotyczących innych drobnoustrojów, np. *S. aureus* (29).

Przykładem wystandaryzowanych larw, są osobniki pochodzące z linii hodowlanej TruLarv produkowane przez Biosystems Technology Ltd. Producent deklaruje, że owady są utrzymywane w ściśle określonych warunkach, są wolne od hormonów i substancji bakteriobójczych, a wyniki są powtarzalne (39).

Larwy *G. mellonella* nie zastąpią zupełnie kręgowców w badaniach biomedycznych pomimo podobieństw we wrodzonej reakcji układu immunologicznego ssaków i owadów. Nie jest znana kompletna sekwencja genomu *G. mellonella*, ale badania nad nim trwają.

Owadzi model na pewno może być i będzie wykorzystywany do wstępnych testów *in vivo*. Wykorzystanie owadów do analizy dużej liczby patogenów lub potencjalnych terapeutyków w krótkim czasie jest o wiele mniej kosztowne i pracochłonne w porównaniu do badań z wykorzystaniem kręgowców. Model *G. mellonella* powinien być standardowo używany w początkowej analizie poprzedzającej konwencjonalne testy *in vivo* oraz dla zmniejszenia liczby rutynowych testów na ssakach.

REFERENCES

1. Niedźwiecka K, Dyląg M. Owady - jako organizmy modelowe w badaniach nad patogenezą infekcji grzybiczych i w ocenie potencjalnych antymikotyków. *Med Dośw Mikrobiol* 2015;67:133–139,
2. Wilson-Sanders SE. Invertebrate Models for Biomedical Research, Testing, and Education. *ILAR J* 2011;52(2):126-152,
3. Shaik HA, Mishra A, Sehnal F. Silk recycling in larvae of the wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Eur J Entomol* 2017;114:61–65,
4. Salzet M. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol* 2001;22(6):285-288,
5. Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 2004;28:101–112,
6. Tsai CJ, Loh JM, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 2016;7(3):214-229,
7. Faulhaber L., Karp R. A diphasic immune response against bacteria in the american cockroach. *Immunology* 1992;5,378-381,
8. Wojda I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science* 2017;24:342–357,
9. Mak P, Chmiel D, Gacek GJ. Antibacterial peptides of the moth *Galleria mellonella*. *Acta Biochim Pol* 2001;48:1191-1195,
10. Cytryńska M, Mak P, Zdybicka-Barabas A, et al. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides* 2007;28:533-546,
11. Lee YS, Yun EK, Jang WS, et al. Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Insect Mol Biol* 2004;13:65-72,
12. Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, et al.. The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem Mol Biol* 2008;38:201-212,
13. Schuhmann B, Seitz V, Vilcinskis A, et al. Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol* 2003;53(3):25-33,
14. Sowa-Jasilek A, Zdybicka-Barabas A, Stączek S, et al. Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme. *Peptides* 2014;53:194-201,
15. Loh JM, Adenwalla N, Wiles S, et al. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence* 2013;4:419-428,
16. Jacobs AC, Thompson MG, Black CC, et al. AB5075, a Highly Virulent Isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a Model Strain for the Evaluation of Pathogenesis and Antimicrobial Treatments. *MBio* 2014;5(3):e01076-14,
17. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, et al. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect Immun* 2012; 80:1015–1024,
18. Aperis G, Fuchs BB, Anderson CA, Warner JE, et al. *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infect* 2007;9:729–734,
19. Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* 2000; 182:3843–3845,
20. Miyata S, Casey M, Frank DW, et al. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* 2003; 71:2404–13,
21. Olsen RJ, Watkins ME, Cantu CC, et al. Virulence of serotype M3 Group A Streptococcus strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). *Virulence* 2011;2:111–119,
22. Abranches J, Miller JH, Martinez AR, et al. The collagen-binding protein Cnm is required for Streptococcus mutans adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun* 2011;79:2277-2284,
23. Michaux C, Sanguinetti M, Reffuveille F, et al. SlyA is a transcriptional regulator involved in the virulence of *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2011;79:2638 –2645,
24. Jacobsen ID. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence*. 2014;5(2):237–239,
25. Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun* 2005; 73:3842–3850,
26. Slater JL, Gregson L, Denning DW, et al. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. *Med Mycol* 2011;49(1):107-113,
27. Büyükgüzel E, Tunaz H, Stanley D, et al. Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *J Insect Physiol* 2007;53(1):99-105,

28. Peleg AY, Jara S, Monga D, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(6):2605-2609,
29. Desbois AP, Coote PJ. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1785–1790,
30. Luther MK, Arvanitis M, Mylonakis E, et al. Activity of daptomycin or linezolid in combination with rifampin or gentamicin against biofilm-forming *Enterococcus faecalis* or *E. faecium* in an in vitro pharmacodynamic model using simulated endocardial vegetations and an in vivo survival assay using *Galleria mellonella* larvae. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:4612-4620,
31. Krezdorn J, Adams S, Coote PJ. A *Galleria mellonella* infection model reveals double and triple antibiotic combination therapies with enhanced efficacy versus a multidrug-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2014;63:945-955,
32. Staniszewska M, Gizińska M, Mikulak E, et al. New 1,5 and 2,5-disubstituted tetrazoles-dependent activity towards surface barrier of *Candida albicans*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2018;145:124-139,
33. Januszani B, Strączek S, Zdybicka-Barabas A, et al. The effect of *Galleria mellonella* hemolymph polypeptides on human brain glioblastoma multiforme cell line - a preliminary study. *Annales UMCS, Biologia* 2012;67(2):53–62,
34. Champion O, Wagley S, Titball R. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. *VIRULENCE* 2016;7:840–845,
35. Wojda I, Andrejko M, Cytryńska M, et al.. Przełamywanie mechanizmów oporności gąsienic *Galleria mellonella* przez entomopatogeny. W: Skrzecz I, Sierpińska A, red. Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce. Wyd 1. Sękocin Stary: Instytut Badawczy Leśnictwa; 2012:334-343,
36. Bombelli P, Howe ChJ, Bertocchini F. Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Current Biology* 2017;27(8):292–293,
37. Cook SM, McArthur JD. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 2013; 4(5):350–353,
38. Peleg AY, Jara S, Monga D, et al.. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(6):2605-2609,
39. www.biosystemstechnology.com

Received: 31.01.2018

Accepted for publication: 7.02.2018

Otrzymano: 31.01.2018 r.

Zaakceptowano do publikacji: 7.02.2018 r.

Address for correspondence:

Adres do korespondencji:

Ewa Mikulak

Department of Parasitology and Vector - borne Diseases

National Institute of Public Health

– National Institute of Hygiene

24, Chocimska St., 00-791 Warszawa

emikulak@pzh.gov.pl