



Antibacterial Activity of Muscid and Myiasis Flies Larval Secretions

Aykut ZERЕК¹ Mehmet YAMAN¹ Feyzullah GÜÇLÜ²

¹ Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Hatay, Turkey

² Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Konya, Turkey

Received: 05.07.2018

Accepted: 14.11.2018

ABSTRACT

Maggot therapy is a method based on the use of myiasis fly larvae also called maggot which affinity necrotic tissue in wound treatment. In this study, it was aimed to determine the antibacterial activity some muscid and myiasis flies larvae secretions in vitro. In this study, *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina* and *Musca domestica* flies caught and placed in the cage to provide feeding and laying. After disinfected the eggs was transferred to sterile medium including sheep blood agar (5 %) and incubated overnight at 25 °C. After hatched, larvae were kept in the medium for 2-3 days and disinfected, incubated overnight at 25 °C in steril bi-distilled water (ddH₂O). After incubation, the liquid which containing larval secretions, centrifuged and sterilized by filtration (0.2 µm) that bacteria could not pass through. *Staphylococcus aureus*, MRSA ATCC 43300, *E. coli* and *P. aeruginosa* the suspension of bacteria spreaded petri dishes including MHA sterile-medium. Secretions amount of 30 µl obtained from larvae was impregnated blank antibiotic discs and were placed in the MHA medium and then incubated overnight at 35 °C. When the results were examined, antibacterial activity were not detected against Gram-negative *E. coli* and *P. aeruginosa* bacterial strains at the larval secretions of muscid and myiasis flies, antibacterial activity was detected against Gram-positive *S. aureus* bacterial strain. While antibacterial activity was not detected against Gram-positive MRSA ATCC 43300 bacterial strain the larval secretion of muscid fly, antibacterial activity were detected the larval secretions of myiasis flies. In conclusion, the antibacterial activities of muscid and myiasis fly larval secretions were showed and it is suggested that studies regarding this field can be investigated by using different method and medium.

Keywords: Maggot therapy, Muscid and Myiasis, Larvae, Secretion, Antibacterial activity

öz

Muskid ve Miyaz Sinekleri Larva Salgılarının Antibakteriyel Etkileri

Maggot terapi, nekrotik dokulara affinite duyan maggot adı da verilen miyaz sinek larvalarının yara tedavisinde kullanımına dayalı bir metottur. Bu çalışmada, bazı muskid ve miyaz sinek larvalarından elde edilen salgıların in vitro ortamda antibakteriyel etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina* ve *Musca domestica* sinekleri yakalanarak beslenmeleri ve yumurtlamaları sağlanmak için kafes düzeneğine konuldu. Elde edilen yumurtalar dezenfekte edildikten sonra % 5 koyun kanlı agar steril besi ortamına aktarılarak bir gece boyunca 25 °C'de inkübe edildi. Yumurtadan çıktıktan sonra besi ortamında 2-3 gün bekletilen larvalar dezenfekte edilerek steril bidistile su (ddH₂O) içerisinde 25 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra larva salgılarını içeren sıvı santrifüj edilip bakterilerin geçemeyeceği 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. *Staphylococcus aureus*, Metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri süspansiyonları Mueller Hinton Agar (MHA) steril besi ortamı bulunan petri kutularına yayıldı. Boş antibiyotik disklerine 30 µl miktarında emdirilen larva salgıları MHA besiyerine konuldu ve 35 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar incelendiğinde muskid ve miyaz sinekleri larva salgılarında Gram-negatif *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri suşlarına karşı antibakteriyel etki tespit edilemezken, Gram-pozitif *S. aureus* bakteri suşuna karşı antibakteriyel etki tespit edildi. Gram-pozitif MRSA ATCC 43300 bakteri suşuna karşı ise miyaz sinekleri larva salgılarında antibakteriyel etki tespit edilirken, muskid sinek larva salgısında antibakteriyel etki tespit edilemedi. Sonuç olarak, muskid ve miyaz sinek larva salgılarının antibakteriyel etkileri gösterilmiş olup, konuyla ilgili çalışmaların farklı metot ve besiyerleri kullanılarak karşılaştırmalı çalışılmasında yarar görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Maggot terapi, Muskid ve Miyaz, Larva, Salgı, Antibakteriyel etki

GİRİŞ

Bazı miyaz sinek larvaları fakültatif parazitlik yaparlar. Hayvanlardaki yaralar üzerinde beslenirken irritasyona ve yangiya neden olurlar. Böylece hayvanlarda iştahsızlık, huzursuzluk, kilo kaybı, anemi gibi birçok sağlık problemi meydana getirirler (Zumpt 1965; Soulsby 1986; Kettle 1990).

Maggot adı da verilen miyaz larvaları zararlı etkilerinin dışında Adli Tıpta ölüm zamanı ve yerini belirlemede, insan hekimliğinde ise antibiyotiklere dirençli iyileşmeyen yaraların tedavisinde yaygın kullanılmaktadır (Sherman ve ark. 2000). Nekrotik dokulara affinite duyan miyaz larvalarının veya salgılarının kullanıldığı bu tedavi metoduna maggot terapi adı verilir (Sherman ve ark. 2013). Larva salgılarının antibakteriyel etkilerine dair in vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda çoğunlukla *Lucilia sericata* larva salgıları tercih edilmiştir (Bonn 2000; Kerridge ve ark. 2005; Jaklic ve ark. 2008; Polat ve Kutlubay 2014).

Bu çalışmada, Muscidae ailesinde yer alan *Musca domestica* ile Calliphoridae ailesinde yer alan *L. sericata*, *Chrysomya albiceps* ve *Calliphora vicina* larvalarından elde edilen salgıların *Staphylococcus aureus*, Metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteri suşlarına in vitro antibakteriyel etkileri araştırıldı.

MATERYAL ve METOT

Hatay'ın Antakya ilçesinde *L. sericata*, *Ch. albiceps*, *C. vicina* ve *M. domestica* sinekleri mezbaha ve balık pazarında yakalandıktan sonra 30x30x45 ebadında tülle kaplanmış kafeslere konuldu. Kafeslerin içerisine sineklerin beslenmeleri için % 20 şeker solüsyonu konuldu. Yumurtlamayı uyarmak amacıyla Calliphorid sinekler için sığır karaciğeri, *M. domestica* için kayısı, domates gibi çürümüş organik maddeler kullanıldı.

Kerridge ve ark. (2005) yapmış oldukları çalışma modifiye edilmek suretiyle planlanan çalışmada elde edilen yumurtalar % 5'lik formaldehit ile dezenfekte edildikten sonra % 5'lik koyun kanlı agar steril besi ortamına aktarıldı. Bir gece 25 °C'de inkübe edilerek larvaların yumurtadan çıkmaları sağlandı. Besi ortamında 2-3 gün bekletilerek üçüncü dönemin başına gelmiş larvalar elde edildi.

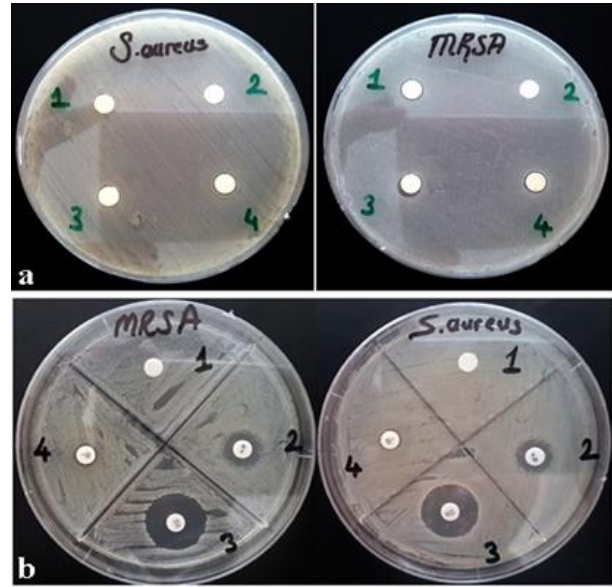
Dezenfeksiyonu yapılan 200 larva 10 ml steril bidistile su (ddH₂O) içerisine konularak salgılarını elde etmek amacıyla 25 °C'de bir gece bekletildi. Larva salgılarını içeren sıvı santrifüj edildikten sonra bakterilerin geçemeyeceği 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi.

Mueller Hinton Agar (MHA) steril besi ortamlarına *S. aureus*, Metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300, *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri süspansiyonları yayıldı. Larvalardan elde edilen salgılar boş antibiyotik disklerine 30 µl miktarında emdirilip MHA besiyerine konularak 35 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı (Kerridge ve ark. 2005).

Bir gece sonra inhibisyon zonlarının gözlemlendiği alanların çapları disk zonu çapı da dâhil olacak şekilde petri kutusunun tersinden cetvelle ölçülerek antibakteriyel etki belirlendi. Ayrıca inhibisyon zonu oluşan bakteri suşları için negatif ve pozitif kontrol testi yapıldı. Negatif kontrol için boş antibiyotik diskleri kullanılırken, pozitif kontrol için penisilin (10 µg, PV), vankomisin (30 µg, VA), oksitetrasiklin (1 µg, OT) antibiyotik diskleri kullanıldı (Şekil 1b).

BULGULAR

Muskid ve miyaz sineklerine ait larva salgılarında Gram-negatif *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri suşlarına karşı antibakteriyel etki tespit edilemezken, Gram-pozitif *S. aureus* ve Metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 bakteri suşlarına karşı antibakteriyel etki tespit edilerek (Şekil 1a) sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir.



Şekil 1. a) 1) *L. sericata*, 2) *M. domestica*, 3) *Ch. albiceps*, 4) *C. vicina* sinek larva salgılarının *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkilerinin MHA besiyerinde disk difüzyon yöntemiyle gösterilmesi, b) *S. aureus* ve Metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 suşlarına karşı negatif ve pozitif kontrolün disk difüzyon yöntemiyle gösterilmesi; 1) Boş antibiyotik diski, 2) Penisilin (10 µg, PV), 3) Vankomisin (30 µg, VA), 4) Oksitetrasiklin (1 µg, OT).

Figure 1. a) 1) Antibacterial activity against *S. aureus* of *L. sericata*, 2) *M. domestica*, 3) *Ch. albiceps*, 4) *C. vicina* fly larvae secretions demonstration by disk diffusion method in MHA medium, b) Negative and positive control against *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 strains demonstration by disc diffusion method; 1) Blank antibiotic disc, 2) Penicillin (10 µg, PV), 3) Vancomycin (30 µg, VA), 4) Oxytetracycline (1 µg, OT).

Tablo 1. Antibakteriyel etki test sonuçları**Table 1.** Antibacterial activity test results

| Sinek Türleri | Bakteri Türleri | | | |
|----------------------|------------------------|----------------------|------------------|-----------------|
| | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | MRSA ATCC 43300 |
| <i>L. sericata</i> | (-) | (-) | 6.5 mm | 7.5 mm |
| <i>M. domestica</i> | (-) | (-) | 6.5 mm | (-) |
| <i>Ch. albiceps</i> | (-) | (-) | 6.5 mm | 7.5 mm |
| <i>C. vicina</i> | (-) | (-) | 6.5 mm | 7.5 mm |

(-): inhibisyon zonu oluşmadı

TARTIŞMA ve SONUÇ

Maggot terapi uygulanan bir hastanın yarısından alınan *L. sericata* larva salgılarını da içeren total vücut sıvısının *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği görülmüştür (Doğandemir 2010). Bu çalışmada *L. sericata* ile diğer sineklerin larva salgılarında *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etki gözlenmezken, *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etki tespit edildi. Bu sonucun larva salgısı elde etmede kullanılan yöntemin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Lucilia sericata larvalarının in vitro ortamda *S. aureus* ve *Pseudomonas* türlerine etkili olduğu, buna karşın *E. coli* türlerine çok az etki gösterdikleri bildirilmiştir (Bonn 2000). Bu çalışmada *L. sericata* ve diğer sinek larva salgılarında *S. aureus*'a karşı tespit edilen antibakteriyel etki *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı gözlenmemiş, *P. aeruginosa* dışında bu çalışmaya benzer sonuçlar alınmıştır.

Bexfield ve ark. (2004), *L. sericata* larva salgılarının in vitro ortamda MRSA'ya ve *E. coli*'ye antibakteriyel etkilerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada hem *L. sericata* hem de *Ch. albiceps*, *C. vicina* larva salgılarında MRSA ATCC 43300'e karşı antibakteriyel etki tespit edilmiş ve bu açıdan Bexfield ve ark. (2004) çalışmalarıyla paralellik göstermiştir. Ancak *E. coli*'ye karşı *L. sericata* ve diğer sinek larva salgılarının antibakteriyel etki göstermemesinin nedeni çalışmada kullanılan larva sayısının ve yöntemin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Jaklic ve ark. (2008), *L. sericata* larva salgılarının antibakteriyel etkisini, katı Brain Heart Infusion Agar (BHIA)'da denemişler fakat olumlu sonuç elde edememişlerdir. Aynı deneyi sıvı BHI'da tekrarladıklarında ise *S. aureus* üremesinin tamamen inhibe olduğunu, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı ise sınırlı bir inhibisyon zonu oluştuğunu gözlemişlerdir. Bu çalışmada *L. sericata* ve diğer sinek larva salgılarında katı MHA besiyerinde *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etki tespit edilmiş ve bu açıdan Jaklic ve ark. (2008) çalışmalarıyla benzerlik göstermiştir. Ancak *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı *L. sericata* ve diğer sinek larva salgılarında antibakteriyel etki tespit edilemedi. Kullanılan besiyerlerinin farklılığı, katı veya sıvı olması bu durumun nedeni olabilir.

Kerridge ve ark. (2005), MRSA ve *P. aeruginosa*'ya karşı *L. sericata* larva salgılarının antibakteriyel etkilerini iso-sentitest agar katı besiyerinde denediklerinde bakterilerin üremelerini inhibe etmek suretiyle kısıtlı bir etki oluşturduğunu gözlemişlerdir. Bu çalışmada MHA besiyerinde MRSA ATCC 43300'e karşı *L. sericata*, *Ch.*

albiceps, *C. vicina* larva salgılarının gösterdiği antibakteriyel etki bahsedilen çalışmayla paralellik göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı ise sinek larva salgılarının hiçbirinde antibakteriyel etki tespit edilememiştir. Bu durum larva salgılarının antibakteriyel etkilerinin belirlenmesinde kullanılan besiyerlerinin farklı olmasından ileri gelmiş olabilir.

Bu çalışmada *L. sericata* larva salgılarının Gram-negatif bakterilere nazaran Gram-pozitif bakteriler üzerinde daha fazla inhibisyon etkisi oluşturması ilgili literatürlerle (Bonn 2000; Kerridge ve ark. 2005; Jaklic ve ark. 2008) paralellik göstermiştir. Konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, larva salgılarının eldesinde araştırmacıların farklı yöntemler izledikleri görülmüştür. Farklı sayıda larva kullanılması, besiyerlerinin katı veya sıvı olması, salgıların antibakteriyel etkilerinin değerlendirilmesinde disk difüzyon veya mikrodüzyon yöntemlerinin kullanılması bu farklılıklardan bazılarıdır. Bu sebepten dolayı konuyla ilgili standardize edilmiş çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, her bir sinek türünden 200 larva kullanılarak yapılan bu çalışmada muskid ve miyaz sinek larva salgılarının çeşitli bakteri suşları üzerinde antibakteriyel etkileri gösterilmiş olup, konuyla ilgili çalışmaların farklı metod ve besiyerleri kullanılarak karşılaştırmalı çalışılmasında yarar görülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Mustafa Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 15110 nolu proje ile desteklenmiştir. Antibakteriyel etkinin belirlenmesi kısmında yardımlarından ötürü Prof. Dr. Özkan Aslantaş'a ve Doç. Dr. Zafer Canteğin'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA, (2004). Detection and partial characterization of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes Infect*, 6, 1297-1304.
- Bonn D, (2000). Maggot therapy: an alternative for wound infection. *Lancet*, 356, 1174.
- Doğandemir G, (2010). *Lucilia sericata*'nın Kronik Yaralarda Kolonize Olan Mikroorganizmalar Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliğinin Araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Askeri Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı, Ankara.
- Jaklic D, Lapanje A, Zupancic K, Smrke D, Gunde-Cimerman N, (2008). Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J Med Microbiol*, 57 (5), 617 - 625.
- Kerridge A, Lappin-Scott H, Stevens JR, (2005). Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol*, 19, 333-337.

Kettle DS, (1990). Medical and Veterinary Entomology. CAB International, Wallingford.

Polat E, Kutlubay Z, (2014). Meglümün Antimoniat Tedavisine Dirençli Dört Kutanöz Leishmaniosis Olgusu. *Turkiye Parazitol Derg*, 38, 177-80.

Sherman RA, Grassberger M, Gileva OS, Kim CMH, Mumcuoğlu KY (Editors), (2013). Biotherapy - History, Principles and Practice, Springer Science+Business Media Dordrecht.

Sherman RA, Hall MJ, Thomas S, (2000). Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annu Rev Entomol*, 45, 55-81.

Soulsby EJL, (1986). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Bailliere Tindall, London.

Zumpt F, (1965). Myiasis in man and animals in the old world. Butterwoths & Co. ltd. London.