

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Valentina Margić i Patrik Meglič

Provjera učinkovitosti bioloških i kemijskih pripravaka na inhibiciju rasta gljive

*Macrorhabdus ornithogaster in vitro*

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za bolesti peradi s klinikom pod vodstvom doc. dr. sc. Željka Gottsteina i predan je na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018/2019.

## SADRŽAJ

1. UVOD

2. HIPOTEZA

3. CILJ RADA

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Soj gljive *Macrorhabdus ornithogaster* i priprema za testiranje

4.2. Priprema inokuluma za imunizaciju ličinki crne vojničke muhe (*Hermetia illucens*)

4.3. Testiranje bioloških i kemijskih pripravaka in vitro na gljivici *Macrorhabdus ornithogaster*

4.4. Statistička obrada podataka

5. REZULTATI

6. RASPRAVA

7. ZAKLJUČAK

8. LITERATURA

9. SAŽETAK

10. SUMMARY

## 1.UVOD

*Macrorhabdus ornithogaster* je anamorfna kvasnica iz koljena *Ascomycota* koja može zaraziti mnoge vrste ptica. Kolonizira istmus, prijelaz između žljezdanog (proventrikulus) i mišićnog želuca (ventrikulus) ptica (BORRELLI i sur., 2015). U prošlosti su je nazivali „Megabakterija“ zato što se smatralo da je to velika štapičasta bakterija, sve dok nije ustanovljeno da se radi o kvasnici (RAZMYAR i sur., 2016). *Macrorhabdus ornithogaster* je dugačak i tanak organizam širok između 2-3  $\mu\text{m}$ , a dugačak između 20-80  $\mu\text{m}$ . Boji se srebrnim bojama, tzv. periodic acid Schiff (PAS) bojenjem i slabo je gram pozitivan (TOMASZEWSKI i sur., 2003). Domaćini gljivice *Macrorhabdus ornithogaster* mogu biti divlje ptice poput papiga (*Psittacine*) i vrapčarki (*Passerine*) kao i ptice koje se koriste za intenzivnu proizvodnju, poput peradi i nojeva. *Macrorhabdus ornithogaster* je identificiran u nekoliko vrsta kaveznih ptica, a najčešće ga nalazimo u tigrice, plavovratih papiga (*Forpus coelestis*), agapornisa (*Agapornis* sp.), kanarinaca (*Serinus canarius*) i zeba (SULLIVAN i sur., 2017). Ova gljiva je izdvojena iz domaćina s i bez kliničkih znakova. Ptice izmetom mogu izlučivati stanice gljivice u okoliš dok se klinički čine zdrave, no s druge strane događa se da oboljele ptice ne ispuštaju kontinuirano stanice gljiva u okoliš (BORRELLI i sur., 2015). Pretpostavlja se da je bolest multikauzalna. Stresori poput parenja, mitarenja, loše higijene i promjena vlasnika mogu doprinijeti pojavi bolesti. *Macrorhabdus ornithogaster* prekida povezanost žlijezda istmusa sa slojem kolina, pri čemu kod prodora u žlijezde istmusa prekid sloja kolina dovodi do atrofije i nekroze žlijezda. Zbog toga hrana ne može biti probavljena što vodi do pojave kliničkih simptoma i pojave neprobavljenih sjemenki u izmetu (PUSTOW i sur., 2017). Ako se pojave klinički znakovi bolesti najčešće se uočavaju povraćanje, proljev (ponekad s neprobavljenim sjemenkama) i kronični gubitak težine. Ostali nespecifični klinički znakovi uključuju letargiju te polifagiju ili anoreksiju. Prošireni proventrikulus može se uočiti na rengenogramu (PUSTOW i sur., 2017). Antemortem dijagnostika megabakterioze može biti teška uslijed suptilnih i nespecifičnih kliničkih znakova. Uobičajena tehnika *in vivo* dijagnostike uključuje mikroskopsko pretraživanje obojenog ili nativnog uzorka fecesa. Međutim *Macrorhabdus ornithogaster* se može zamijeniti s ostacima biljaka ili drugim materijalima pronađenim u izmetu. Jedna od često korištenih metoda dijagnostike je i lančana reakcija polimerazom (PCR) (TOMASZEWSKI i sur., 2003). Ostale metode uključuju pokušaje da se *Macrorhabdus ornithogaster* koncentrira

u uzorku kao na primjer flotacija uzorka izmeta (SULLIVAN i sur., 2017). Epizootiološka istraživanja u Hrvatskoj pokazuju da je preko 20 % uzgoja i prodajnih mjesta kontaminirano ovom gljivom što posljedično dovodi do velike učestalosti pacijenata s makrorabdozom (TOMINAC, 2018). Terapija bolesti je zahtjevna. Tigrice se mogu liječiti s amfotericinom B u dozi 100 mg/kg PO svakih 12 sati u trajanju od 30 dana ili više (PUSTOW i sur., 2017). U Australiji je pronađen soj gljivice *Macrorhabdus ornithogaster* koji je rezistentan na amfotericin B. Ne zna se koliko je rezistencija proširena u ostalih sojeva i drugdje u svijetu (PHALEN, 2006). Druga opcija u terapiji je nistatin (20 000 U PO dva puta dnevno u trajanju od 10 dana), a učinak se treba kontrolirati pretraživanjem uzoraka fecesa jer je prijavljena rezistencija i na nistatin. Natrijev ili kalijev benzoat se također mogu koristiti kao terapija (HOPPES, 2011). U prognozi je potreban oprez jer su česte rekurentne infekcije (PUSTOW i sur., 2017). Poznato je također da neki antiparazitici s ciljem djelovanja na tubulin mogu imati i antimikotski učinak, poput benzimidazola (CHATTERJI i sur., 2011.). Uz navedeno, niz je i drugih antiseptika koji se mogu koristiti *per os* koji su se potencijalno pokazali uspješnim u terapiji makrorabdoze (neobjavljeno).

## **2. HIPOTEZA**

Megabakterioza je gljivična zarazna bolest koja predstavlja problem u uzgoju kaveznih ptica, posebno tigrice (*Melopsittacus undulatus*). Hipoteza ovog istraživanja je da postoje i drugi pripravci koji mogu sprječavaju inhibirati namnažanje gljivice *Macrorhabdus ornithogaster in vitro* jednako uspješno ili uspješnije od trenutne uobičajene terapije.

## **3. CILJ RADA**

Cilj rada je utvrditi *in vitro* postupkom testiranja da li različiti biološki i kemijski (komercijalni i u postupku razvoja) pripravci imaju mogućnost inhibicije namnažanja gljivice *Macrorhabdus ornithogaster* u svrhu poboljšanja postojeće terapije.

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Soj gljive *Macrorhabdus ornithogaster* i priprema za testiranje**

Soj gljive *Macrorhabdus ornithogaster* korišten u istraživanju izdvojen je iz želuca oboljelog i uginulog češljugara (*Carduelis carduelis*). Izdvojena je na tekućem hranjivom mediju RPMI s dodatkom 20% fetalnog govedjeg seruma i 5% saharoze, u atmosferi CO<sub>2</sub>, pri temperaturi od 37°C kroz 48 sati prema uputi autora (HANNAFUSA i sur., 2007) te potvrđen PCR reakcijom

(TOMASZEWSKI i sur., 2003). Izdvojeni soj čuvan je na  $-80^{\circ}\text{C}$  pomiješan u omjeru 1:1 s glicerolom. Za potrebe testiranja, soj je odleđen i pomiješan s gore navedenim medijem te namnožen kroz 48 sati. Medij s namnoženim gljivicama se centrifugira 15 minuta pri 3700 okretaja u minuti (5920 R, Eppendorf, Njemačka). Nakon centrifugiranja na peleti je ostavljeno nešto medija te je određena koncentracija i ukupan broj gljivica u uzorku brojanjem u Neubauer-ovoj komorici. Ovako namnožen uzorak gljivica korišten je za sva daljnja testiranja.

#### **4.2. Priprema inokuluma za imunizaciju ličinki crne vojničke muhe (*Hermetia illucens*)**

Uzorak gljivica u količini od  $9,3 \times 10^8$  gljivica/mL je podijeljen u tri jednaka dijela. Jedan dio uzorka inaktiviran je ultrazvučnim dezintegratorom Sonopuls HD2200 (Bandelin, Njemačka), te je zatim grijan na temperaturi od  $95^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 45 minuta. Preostala dva dijela uzorka nisu tretirana. Ličinke crne vojničke muhe (*Hermetia illucens*) inokulirane su u dobi od 7-10 dana. U pokusu 1. ličinke su bile podijeljene u pet skupina, a u svakoj skupini se nalazilo po dvadeset ličinaka. Skupini Ž subkutikularno je apliciran uzorak živih gljivica volumena  $15\mu\text{L}$  i koncentracije  $3,1 \times 10^8$  gljivica/mL, dok je skupini I subkutikularno apliciran uzorak inaktiviranih gljivica volumena  $15\mu\text{L}$  i koncentracije  $3,1 \times 10^8$  gljivica/mL. Skupini PO u hranjivi medij je umiješano  $100\mu\text{L}$  živih gljivica u koncentraciji  $3,1 \times 10^8$  gljivica/mL, dok je skupina N stavljena je u hranjivi medij bez dodataka te je predstavljala kontrolnu skupinu. Skupini FO subkutikularno je aplicirana 0.9% vodena otopina NaCl-a u volumenu od  $15\mu\text{L}$ . U pokusu 2. ličinke su bile podijeljene u četiri skupine, pri čemu se u svakoj skupini nalazilo po dvadeset ličinaka. Skupini Ž subkutikularno je apliciran uzorak živih gljivica volumena  $15\mu\text{L}$  i koncentracije  $1,2 \times 10^8$  gljivica/mL. Skupini I subkutikularno je apliciran uzorak inaktiviranih gljivica volumena  $15\mu\text{L}$  i koncentracije  $1,2 \times 10^8$  gljivica/mL. Skupini PO u medij je umiješano  $145\mu\text{L}$  živih gljivica u koncentraciji  $1,2 \times 10^8$  gljivica/mL. Skupina N stavljena je u medij kojem ništa nije dodano te je predstavljala kontrolnu skupinu. Kao medij, u oba pokusa, za uzgoj ličinki korištena je komercijalna gotova dječja hrana na bazi žitarica pomiješana s destiliranom vodom u omjeru 1:2. Ličinke su držane 7 dana na temperaturi od  $25^{\circ}\text{C}$ . Nakon sedam dana žive su ličinke isprane u sterilnoj fiziološkoj otopini te je potom svaka skupina ličinki usitnjena primjenom mehaničkog homogenizatora (IKA, Njemačka) u tri puta većem volumenu sterilne fiziološke otopine. Homogenizat je centrifugiran 15 minuta pri 3700 okretaja u minuti. Supernatant dobiven centrifugiranjem profiltriran je kroz mikrobiološki filter s  $0,2\mu\text{m}$  porama (Sarstedt, Njemačka) te je korišten odmah ili je do korištenja zamrznut na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **4.3. Testiranje bioloških i kemijskih pripravaka *in vitro* na gljivici *Macrorhabdus ornithogaster***

Testiranje pripravaka provedeno je mikrotitracijskim pločama s ravnim dnom za stanične kulture s 96 komorica (Sigma, SAD). U pokusu 1. svaka komorica sadržavala je  $6.25 \times 10^5$  stanica gljivica u ukupnoj količini od 200  $\mu\text{L}$  medija te je testirano 8 pripravaka (Tablica 1), u tri koncentracije (originalnoj, 10 i 100 puta manjoj) i četiri ponavljanja po koncentraciji. Korišteni preparati bili su: homogenizirani ekstrakt ličinaka s apliciranim živim gljivicama (Ž), homogenizirani ekstrakt ličinaka s apliciranim inaktiviranim gljivicama (I), homogenizirani ekstrakt ličinaka s gljivicama dodanim u hranjivi medij (PO), homogenizirani ekstrakt ličinaka bez dodanih gljivica (N), homogenizirani ekstrakt ličinaka s apliciranom fiziološkom otopinom (FO), kontrolna skupina dodanih pripravaka (K), amfotericin B (AmB), i natrijev benzoat (NaB). Kroz četiri dana za redom nakon inokulacija, iz svake komorice uzet je volumen od 10  $\mu\text{L}$  te je određena koncentracija brojanjem pomoću Neubauer-ove komorice. U pokusu 2. svaka komorica je sadržavala  $6 \times 10^5$  stanica gljivica u 350  $\mu\text{L}$ , pri čemu je testirano 16 različitih pripravaka (Tablica 1) u dvije koncentracije (originalnoj i 10x manjoj), s također četiri ponavljanja. Korišteni preparati u pokusu 2. bili su: itrakonazol (ITR), levamisol (LEV), antiseptik F10 (F10), amfotericin B (AmB), natrijev benzoat (NaB), FMT (FMT), tvar u postupku antimikrobnog testiranja nepoznatog sastava (X), homogenizirani ekstrakt ličinaka s apliciranim živim gljivicama (Ž), homogenizirani ekstrakt ličinaka s apliciranim inaktiviranim gljivicama (I), homogenizirani ekstrakt ličinaka s gljivicama dodanim u medij (PO), homogenizirani ekstrakt ličinaka bez dodanih gljivica (N), kontrolna skupina bez dodanih pripravaka (K), toltrazuril (BAY), klorheksidin (CHEX), ivermektin (IV) i fenbendazol (PAN). Koncentracija stanica određena je drugi i peti dan brojanjem pomoću Neubauer-ove komorice.

### **4.4. Statistička obrada podataka**

Dobiveni rezultati testirani su koristeći računalni program Statistica 13 (Tibco, SAD) na normalnost raspodjele Kolmogorov-Smirnov i Lilliefors testom, a potom su statistički obrađeni primjenom Anova LSD testa.

Tablica 1. Korišteni preparati i koncentracije u pokusu 1. i 2

POKUS	PRIPRAVAK	KONCENTRACIJA	BR. STANICA PO KOMORICI	BROJANJE NA DANE
1	Ž	1:12	6.25x10 <sup>5</sup>	1, 2, 3 i 4 nakon primjene
	I	1:12		
	PO	1:12		
	N	1:12		
	FO	1:12		
	K	1:12		
	AmB	5mg/mL		
	NaB	10mg/mL		
2	Ž	1:12	6x10 <sup>5</sup>	2 i 5 nakon primjene
	I	1:12		
	PO	1:12		
	N	1:12		
	K	1:12		
	AmB	5mg/mL		
	NaB	10mg/mL		
	ITR	20mg/mL		
	LEV	75mg/mL		
	FMT	2mg/mL		
	X	500mg/mL		
	BAY	25mg/mL		
	CHEX	10mg/mL		
	IV	10mg/mL		
	PAN	100mg/mL		
F10	4mg/mL			

## 5. REZULTATI

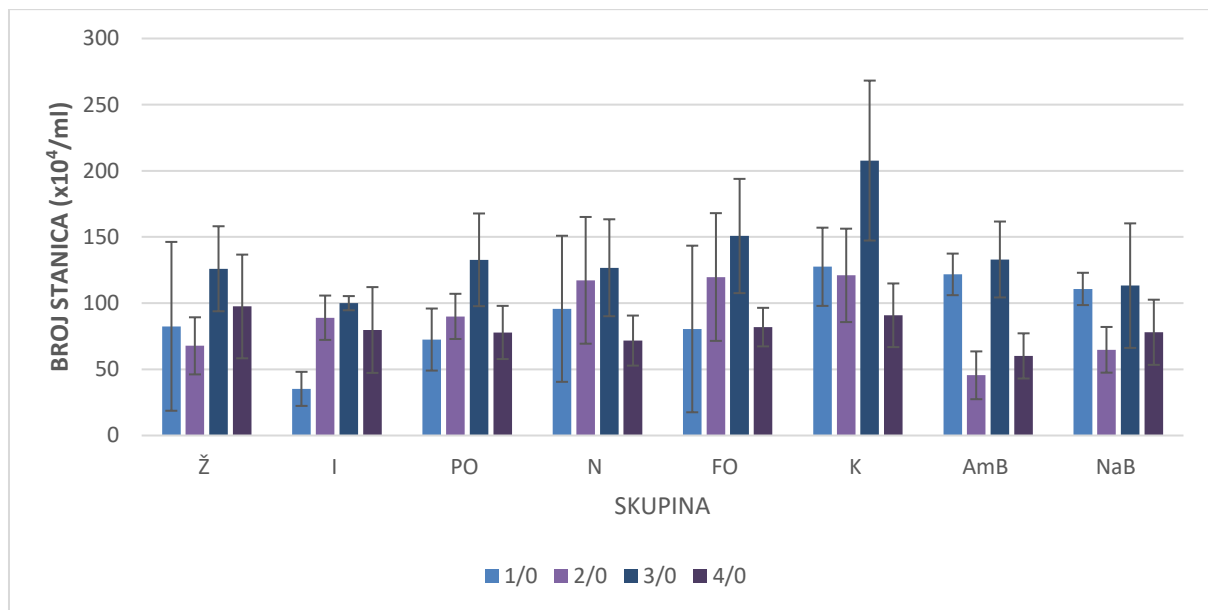


Tijekom pokusa 1. određivana je koncentracija stanica gljivice *Macrorhabdus ornithogaster* kroz četiri dana nakon početka testiranja kako bi se ustanovio učinak pojedinih pripravaka na samu gljivicu. U Tablici 2. prikazani su pripravci u svim razrjeđenjima korišteni u pokusu 1. s u razdoblju od četiri dana. Rezultati pokazuju statistički značajnu inhibiciju namnažanja stanica dan nakon primjene bioloških pripravaka podrijetlom od ličinki crne vojničke muhe u originalnim koncentracijama, ali i razrjeđenjima, u odnosu na kontrolnu ali i skupine tretirane kemijskim pripravcima (Tablica 2, Slika 1). Dva dana nakon primjene uočava se statistički značajna inhibicija namnažanja stanica djelovanjem amfotericina B kao i biološkog pripravka nastalog stimulacijom živim (Ž), kao i inaktiviranim (I) 10x razrijeđenim pripravkom. Treći dan nakon primjene uočava se statistički značajna inhibicija namnažanja kod svih pripravaka u originalnoj koncentraciji u odnosu na kontrolnu, dok četvrti dan nakon primjene nema značajnih razlika između skupina, osim u najvećem razrjeđenju. Vidljivo je i da ekstrakti ličinaka vjerojatno bolje inhibiraju rast gljivica već tijekom prvih 24 do 48 sati, dok amfotericin B i natrijev benzoat bolje inhibiraju rast gljivica nakon prvih 48 sati. Također se može uočiti i vjerojatna o dozi ovisna inhibicija namnažanja stanica djelovanjem amfotericina B i natrijevog benzoata dva dana nakon primjene (Slika 2.), koja je statistički značajna između originalne koncentracije i dvostrukog razrjeđenja, dok kod ekstrakta ličinki to nije izraženo.

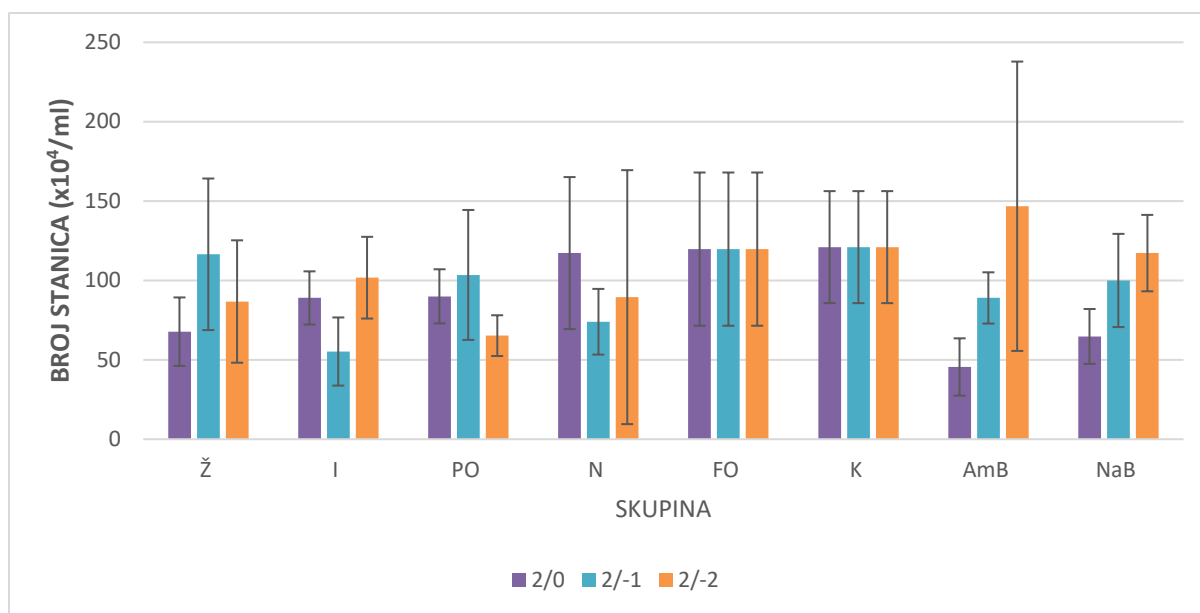
Tablica 2. Prikaz srednje vrijednosti ( $\pm$ SD) broja stanica gljivice *Macrorhabdus ornithogaster* po skupinama u pokusu 1. u razdoblju od četiri dana sa svim razrjeđenjima (vrijednosti prosječnog broja stanica po skupini za pojedine dane označenih s različitim malim slovima

abecede (a, b, c, d) statistički se značajno razlikuju na razini  $p < 0,05$ , dok su statistički značajne razlike na razini  $p < 0,05$  za srednje vrijednosti unutar skupine po danu između različitih razrjeđenja označene različitim velikim slovima abecede (A, B)).

	1/0	1/-1	1/-2	2/0	2/-1	2/-2	3/0	3/-1	3/-2	4/0	4/-1	4/-2
Ž	83±64a b	48±18c	37±26c	68±22b	117±48 a	87±39a b	126±32 b	115±32 bc	121±21	98±39	87±35	118±42a b
I	35±13b	48±36c	63±9bc	89±17a b	55±21b	102±26 ab	100±5b	69±33c	109±44 bc	80±32	74±19	78±32b
PO	73±23a b	67±25b c	11±38a	90±17a b	104±41 ab	65±13b	133±35 b	95±20b c	95±34b c	78±20	74±32	83±40b
N	96±55a	21±18c	11±9c	117±48 a	74±21	90±80a b	127±37 b	82±53c	76±16c	72±19	68±10	77±20b
FO	81±63a b	103±40 b	99±32a b	120±48 a	120±48 a	120±48 ab	151±43 b	151±43 b	151±43 b	82±15	82±15	82±15b
K	128±30 a	115±18 ab	85±37b	121±35 a	121±35 a	121±35 ab	208±60 a	208±60 a	208±60 a	91±24	91±24	91±24b
AmB	122±16 a	158±38 a	131±12 a	46±18b	89±16a b	147±91 a	133±29 b	135±45 b	113±45 bc	60±17	106±42	173±110 a
NaB	111±12 a	103±23 b	58±16c	65±17b	100±29 ab	117±24 ab	113±47 b	121±45 bc	105±49 bc	78±25	106±33	63±29b



Slika 1. Broj stanica gljivice *Macrorhabdus ornithogaster* po skupinama u pokusu 1. s nerazrijeđenim pripravcima tijekom četiri dana nakon primjene.

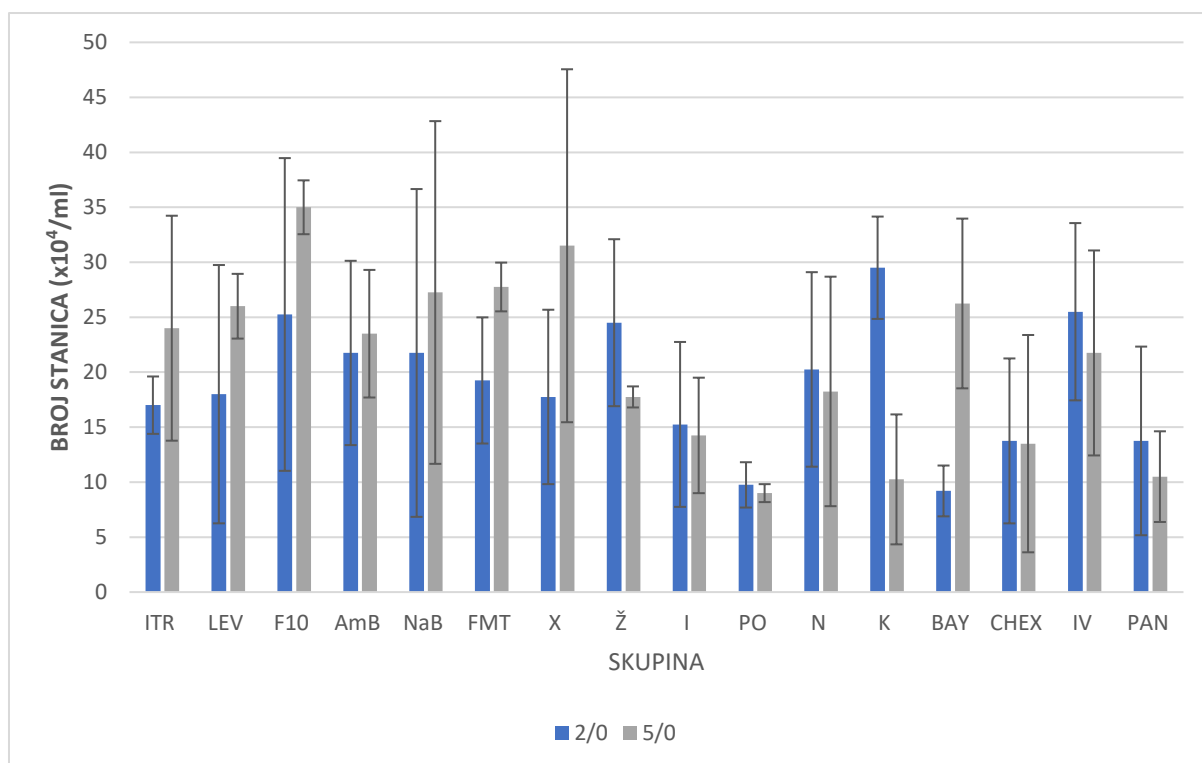


Slika 2. Broj stanica gljivice *Macrorhabdus ornithogaster* po skupinama u pokusu 1. tijekom drugog dana sa svim razrjeđenjima.

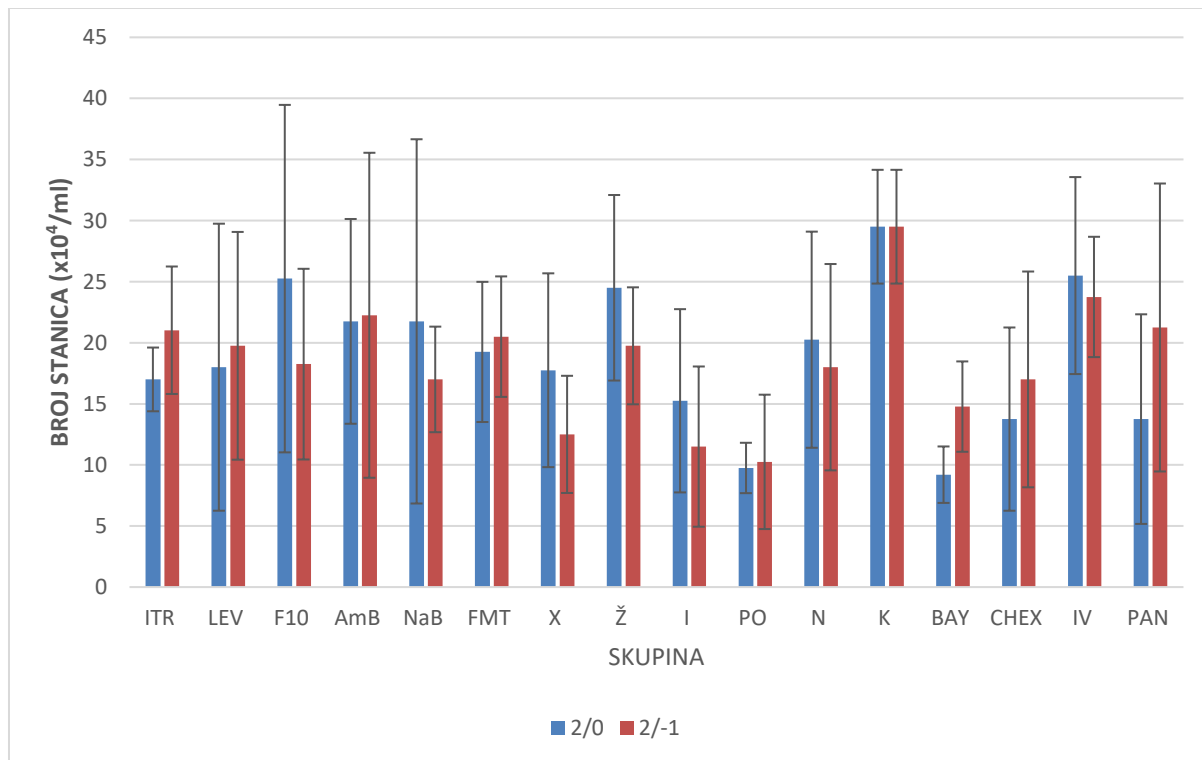
Tijekom pokusa 2. povećan je broj korištenih pripravaka, smanjen je broj razrjeđenja, a broj stanica gljivica određivan je drugi i peti dan nakon primjene, a rezultati su prikazani na Tablici 3., i slikama 4. i 5. Rezultati dva dana nakon primjene pokazuju statistički značajnu inhibiciju namnažanja stanica kod PO i I skupine, kao i kod skupina antiparazitika, poput toltrazurila (BAY) i fenbendazola (PAN), antimikotika itrakonazola (ITR) i antiseptika klorheksidina (CHEX) (Slika 3.). Također se može uočiti i o dozi ovisan učinak kod spomenutih kemijskih pripravaka, dok biološki pripravci ne pokazuju o dozi ovisnu inhibiciju, kao i u pokusu 1 (Slika 4.). Sličan se učinak može uočiti i pet dana nakon aplikacije, no iz nepoznatog razloga broj stanica u kontrolnoj skupini značajno opada u odnosu na pokusne skupine (Tablica 3.; Slika 2)..

Tablica 3. Prikaz srednje vrijednosti ( $\pm$ SD) broja stanica gljivice *Macrorhabdus ornithogaster* po skupinama u pokusu 2. tijekom drugog i petog dana sa svim razrjeđenjima . (vrijednosti prosječnog broja stanica po skupini za pojedine dane označenih s različitim malim slovima abecede (a, b, c, d) statistički se značajno razlikuju na razini  $p < 0,05$ ).

	2/0	2/-1	5/0	5/-1
ITR	17±3 bcd	21±5 bc	24±10 ab	21±10
LEV	18±12 abcd	20±9 abcd	26±3 ab	21±9
F10	25±14 ab	18±8 bcd	35±2 a	11±4
AmB	22±28 abc	22±13 abc	24±6 ab	21±11
NaB	22±15 abc	17±4 bcd	27±16 ab	15±11
FMT	19±6 abcd	21±5 abcd	28±2 ab	16±7
X	18±8 abcd	13±5 cd	32±16 a	18±8
Ž	25±8 ab	20±5 abcd	18±1 bcd	18±3
I	15±8 bcd	12±7 cd	14±5 cd	22±9
PO	10±2 cd	10±6 d	9±1 d	14±6
N	20±9 abc	18±8 bcd	18±10 bcd	16±9
K	30±5 a	30±5 a	10±6 cd	10±6
BAY	9±2 d	15±4 bcd	26±8 ab	17±7
CHEX	14±8 bc	17±9 bcd	14±10 cd	13±5
IV	26±8 ab	24±5 ab	22±9 bc	13±6
PAN	14±9 bc	21±12 abc	11±4 cd	11±2



Slika 3. Broj stanica gljivice *Macrorhabdus ornithogaster* u pokusu 2. s nerazrijeđenim pripravcima tijekom drugog i petog dana.



Slika 4. Broj stanica gljivice *Macrorhabdus ornithogaster* u pokusu 2. tijekom drugog dana sa svim razrjeđenjima.

## 6. RASPRAVA

*Macrorhabdus ornithogaster* kolonizira istmus, prijelaz između žljezdanog (proventrikulus) i mišićnog želuca (ventrikulus) ptica (BORRELLI L. i sur., 2015). Gljivica prekida povezanost žlijezda istmusa sa slojem kolina što dovodi do atrofije i nekroze žlijezda. Zbog toga hrana ne može biti probavljena što vodi do pojave kliničkih simptoma i pojave neprobavljenih sjemenki u izmetu (PUSTOW i sur., 2017), posljedično čemu ptica ugiba. Terapija bolesti je zahtjevna. Tigrice se mogu liječiti s amfotericinom B u dozi 100 mg/kg PO svakih 12 sati u trajanju od 30 dana ili više (PUSTOW i sur., 2017).), no u Australiji su utvrđeni i sojevi *Macrorhabdus ornithogaster* koji su rezistentni na amphotericin B (PHALEN, 2006). Također, iako se amfotericin B kao antimikotik koristi u terapiji megabakterioze, ne postoji istraživanje koje je potvrdilo izlječenje korištenjem ovog preparata. Amfotericin B ne uništava, već usporava razvoj ove gljivice što najčešće dovodi do kasnijeg uginuća inficirane jedinke (BARON, 2018.). Druga opcija u terapiji je nistatin (20 000 U PO dva puta dnevno u trajanju od 10 dana), a učinak se treba kontrolirati pretraživanjem uzoraka fecesa jer je prijavljena rezistencija na nistatin. Natrijev ili kalijev benzoat se također mogu koristiti kao terapija (HOPPES, 2011; PUSTOW i sur., 2017). Terapija koja se sastojala od davanja natrijevog benzoata u vodi za piće (1g/L) kroz četiri tjedna dovela je do rezultata kod kojeg u jatu nije bilo uginulih te su uzorci fecesa bili negativni na gljivicu. (MADANI i sur., 2014.).

U ovom istraživanju su se koristili kemijski i biološki pripravci koji bi mogli utjecati na rast i razvoj gljivice *Macrorhabdus ornithogaster*. Iz rezultata pokusa može se uočiti da preparati predloženi u trenutnoj terapiji megabakterioze (amfotericin B i natrijev benzoat) počinju inhibitorno djelovati na rast gljivica 48 sati nakon aplikacije gljivicama *in vitro*. S druge strane skupine koje su sadržavale ekstrakte ličinaka pokazale su dobar učinak u inhibiciji rasta gljivica tijekom prvih 24 do 48 sati. Može se izdvojiti ekstrakt ličinaka kojima je gljivica dodana u medij za uzgoj (PO) pokazuje najbolje rezultate u inhibiciji njihovog rasta. Larve crne vojničke muhe posjeduju raznolik spektar antimikrobnih peptida (AMP) zbog čega larve mogu preživjeti u ekstremno lošim uvjetima (VOGEL, 2017.). AMP-ovi su mali proteini koji pokazuju aktivnost u prisutnosti bakterija, gljivica, određenih parazita i virusa, djeluju imunomodulatorno te pojačavaju imunوسي odgovor (JÓZEFIAK i ENGBERG, 2017.), što bi bilo izrazito povoljno pri primjeni *in vivo*. U jednom istraživanju utvrđeno je da ekspresija AMP-ova u ličinaka traje najmanje 3 dana od dana aplikacije patogena (JÓZEFIAK i ENGBERG, 2017). U drugom je istraživanju utvrđeno da medij za uzgoj ličinaka obogaćen bakterijama potiče razvoj AMP-ova specifičnih za određeni patogen (VOGEL i sur., 2017).

Također je utvrđeno da direktna aplikacija bakterija u larve potiče izraženiji imunosni odgovor prema tom patogenu (VOGEL i sur., 2017). Prethodna istraživanja na gljivicama tretiranih raznim antiparaziticima koji djeluju na tubulin, poput fenbendazola, također pokazuju antimikotski učinak (CHATTERJI i sur., 2011). Itrakonazol korišten u ovom istraživanju u ptica se najčešće koristi kao terapija za kandidijazu i aspergilozu, inhibirajući stvaranje ergosterola koji igra bitnu ulogu u sintezi stanične membrane gljivice, što dovodi do razgradnje stanične membrane i ubijanja same gljivice i sprječavanja njenog širenja (ANNON., 2014a), nije pokazao značajan učinak. Kako je utvrđeno postojanje soja gljivice *Macrorhabdus ornithogaster* koji je rezistentan na amfotericin B (PHALEN, 2006) u budućnosti postoji potreba za učinkovitijom antimikotskom terapijom. Zna se da antimikotici i antiparazitici mogu također imati i negativan učinak na organizam ptice ili sisavca. Pripravci poput ekstrakta insekata s potaknutim AMP-om (VOGEL i sur., 2017) može zaobići neželjene učinke u makroorganizmu kao i razvoj rezistencije na AMP-ove insekata (JOZEFIAK, i ENGBERG, 2017). Od ostalih pripravaka korištenih u istraživanju, toltrazuril (BAY), fenbendazol (PAN) i klorheksidin (CHEX) pokazali su bolju učinkovitost u inhibiciji rasta gljivica od pripravaka koji se koriste u trenutnoj terapiji, iako na granici statističke značajnosti. Ostali pripravci korišteni u istraživanju nisu pokazali učinkovitost u inhibiciji rasta gljivica u odnosu na kontrolu i pripravke koji se koriste u trenutnoj terapiji. Od korištenih antiparazitika, fenbendazol je pokazao inhibitorni učinak, što je i za očekivati s obzirom na njegovo djelovanje na tubulin (CHATTERJI i sur., 2011), no toltrazuril je pokazao i bolji učinak u periodu do 48 sati, iako nije poznat njegov antimikotski učinak. Također, iako soj ne pokazuje rezistenciju na amfotericin B, učinak svih pripravaka nije testiran kroz svakodnevno dodavanje u medij, što je vjerojatno rezultiralo prolaznom, a ne potpunom inhibicijom rasta testiranih stanica. Stoga je cilj u sljedećim pokusima utvrditi učinak različitih kombinacija učinkovitih pripravaka uz kontinuiranu svakodnevnu primjenu tijekom testiranja.

## 7. ZAKLJUČCI

- Ekstrakti iz ličinki djeluju brzo i inhibiraju rast gljivica u prvih 24 do 48 sati
- Ekstraktima ličinaka učinkovitost u inhibiciji rasta gljivica značajno ne pada smanjenjem doze
- Amfotericin B i natrijev benzoat postižu značajnu učinkovitost u inhibiciji rasta gljivica nakon 48 sati od aplikacije
- Amfotericinu B i natrijevom benzoatu učinkovitost u inhibiciji rasta gljivica ovisna je o dozi
- Baycox i klorheksidin pokazali su bolju učinkovitost u inhibiciji rasta gljivica od amfotericina B i natrijevog benzoata
- Utvrditi postojanje učinka nakon kombinirane primjene pojedinih pripravaka *in vitro*



## 8. LITERATURA

1. ANNON.(2012a):  
<http://www.veterinarstvo.hr/UserDocsImages/vetMedPro/Upute%20novo%20rujan%202015/BAYCOX%202,5%20posto%20-%20SPC.pdf>
2. ANNON.(2012b):  
<http://www.veterinarstvo.hr/UserDocsImages/vetMedPro/VMP%20rujan%202016/Panacur%20granule%2022%20posto.pdf>
3. ANNON. (2013): *Macrorhabdus ornithogaster* in wild birds in Australia, Australian Wildlife Health Network, (informational sheet)
4. ANNON.(2014a):[https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/fungitraxx-epar-summary-public\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/fungitraxx-epar-summary-public_hr.pdf)
5. ANNON. (2014b): <http://www.pliva-sept.hr/pliva-sept-glukonat.html>
6. ANNON.(2017):<https://fmpvs.gov.ba/wpcontent/uploads/2017/Veterinarstvo/Veterinarstvo-uputstva/vet-VL169.pdf>
7. BARON H.R., LEUNG K.C.L., STEVENSON B.C., GONZALEZ M.S., PHALEN D.N. (2018.): Evidence of amphotericin B resistance in *Macrorhabdus ornithogaster* in Australian cage-birds, *Medical mycology*, 0, 1-8
8. BORRELLI L., DIPINETO L., RINALDI L., ROMANO V., NOVIELLO E., MENNA L.F., CRINGOLI G., FIORETTI A. (2015): New diagnostic insights for *Macrorhabdus ornithogaster* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, vol 53, 3448-3450.
9. BOŽIĆ F.(2000): Levamisol: anthelmintik i imunomodulator , *Hrvatski veterinarski vjesnik* 23, 94-98.
10. CHATTERJI B. P., B. JINDAL, S. SRIVASTAVA, D. PANDA (2011): Microtubules as antifungal and antiparasitic drug targets. *Expert Opin. Ther. Patents* 21, 167-186.
11. HANNAFUSA, Y., A. BRADLEY, E. E. TOMASZEWSKI, M. C. LIBAL, D. N. PHALEN (2007): Growth and metabolic characterization of *Macrorhabdus ornithogaster*. *J Vet Diagn Invest* 19, 256–265.

12. HOPPE, S. (2011): Treatment of *Macrorhabdus ornithogaster* with Sodium Benzoate in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Proceedings of the 32nd Annual Conference & Expo of Association of avian veterinarians, August 6-12, 2011, Seattle, SAD, p 67.
13. JOZEFIAK, A., R.M. ENGBERG (2017): Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review, *Jurnal of Animal and Feed Science*, 26
14. MADANI S.A., GHORBANI A., ARABKHAZAELI F.(2014.): Successful treatment of macrorhabdosis in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) using sodium benzoate, *Jurnal of Mycology Research*, Vol 1, No 1: Page 21-27
15. PHALEN D.N. (2006): Implications of *Macrorhabdus* in Clinical Disorders. U: *Clinical Avian Medicine* (Ur.: G.J. Harrison i T.L. Lightfoot), Spix Publishing, Inc., Palm Beach, Florida, SAD, 705-709.
16. PUSTOW R., KRAUTWALD-JUNGHANS M.E. (2017): The incidence and treatment outcomes of *Macrorhabdus ornithogaster* infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in a veterinary clinic. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, vol 31, 344-350.
17. RAZMYAR J., MOVOSAGHI A.R., REZAEI M. (2016): An outbreak of severe *Macrorhabdus ornithogaster* infection in common canaries (*Serinus canarius domesticus*), Molecular nad pathological assay. *Journal of Veterinary Science and Technology*, vol 8, 64-68.
18. SULLIVAN P.J., RAMSAY E.C., GREENACRE C.B., CUSHING A.C., ZHU X., JONES M.P. (2017): Comparison of two methods for determining prevalence of *Macrorhabdus ornithogaster* in a flock captive budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, vol 31, 128-131.
19. TOMASZEWSKI E.K., LOGAN K.S., SNOWDEN K.F., KURTZMAN C.P., PHALEN D.N. (2003): Phylogenetic analysis identifies the „megabacterium“ of birds as novel anamorphic ascomycetous yeast, *Macrorhabdus ornithogaster* gen. nov., sp. nov. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 53, 1201-1205.

20. TOMINAC, A. (2018): Izdvajanje i molekularna karakterizacija gljive vrste *Macrorhabdus ornithogaster* u uzgojima ptica kućnih ljubimaca na području Republike Hrvatske. Diplomski rad, Veterinarski fakultet Zagreb, 1-19.

21. VOGEL H., MULLER A., HECKEL D.G., GUTZEIT H., VILCINSKAS A. (2017): Nutritional immunology: Diversification and diet- dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens* , *Developmental and Comparative Immunology* , 78, 141-148

## 9. SAŽETAK

### Provjera učinkovitosti bioloških i kemijskih pripravaka na inhibiciju rasta gljive *Macrorhabdus ornithogaster in vitro*

Valentina Margić i Patrik Meglič

studenti 6. godine

Megabakterioza je gljivična zarazna bolest čiji uzročnik *Macrorhabdus ornithogaster* kolonizira istmus želuca ptica, što dovodi do atrofije i nekroze žljezdanog želuca. Zaražena jedinka ne može probavljati hranu, mršavi i ugiba. Terapija bolesti je zahtjevna. Tigrice se mogu liječiti s amfotericinom B u trajanju od 30 ili više dana. Druge opcije u terapiji poput nistatina, natrijevog benzoata i drugih antiseptika također se mogu koristiti kao terapija, ali ne i 100% uspješna. Ovim istraživanjem utvrdilo se postojanje značajnog učinka različitih korištenih pripravaka na privremenu inhibiciju rasta gljivice. Iz rezultata istraživanja može se uočiti da preparati predloženi u trenutnoj terapiji megabakterioze (amfotericin B i natrijev benzoat) počinju inhibitorno djelovati na rast gljivica 48 sati nakon aplikacije gljivicama *in vitro*. S druge strane skupine koje su sadržavale ekstrakte ličinaka crne vojničke muhe *Hermetia illucens* pokazale su dobar učinak u privremenoj inhibiciji rasta gljivica tijekom prvih 24 do 48 sati. Od ostalih pripravaka korištenih u istraživanju, toltrazuril, klorheksidin i fenbendazol pokazali su bolju učinkovitost u privremenoj inhibiciji rasta gljivica od pripravaka koji se trenutno koriste u terapiji. Ostali pripravci korišteni u istraživanju nisu pokazali značajniju učinkovitost u inhibiciji rasta gljivice. Rezultati ukazuju na potrebu za daljnjim ispitivanjem korištenih pripravaka, samostalno ili u kombinaciji, kroz svakodnevnu primjenu tijekom testiranja *in vitro*.

**Ključne riječi:** megabakterioza, *Macrorhabdus ornithogaster*, ekstrakt ličinke crne vojničke muhe *Hermetia illucens*, amfotericin B, natrij benzoat, fenbendazol, toltrazuril

## 10.SUMMARY

### **Efficacy testing of biological and chemical formulations on growth inhibition of *Macrorhabdus ornithogaster* fungi *in vitro***

Valentina Margić i Patrik Meglič

6th year students

Megabacteriosis is a fungal infectious disease caused by *Macrorhabdus ornithogaster*. The fungi colonizes the gastric isthmus, what leads to atrophies and necrosis of the proventriculus glands. For this reason, an infected bird cannot digest food, loses weight and eventually dies. The therapy is demanding. Budgerigars can be treated with amphotericin B during 30 or more days. Other options in therapy, like nystatin, sodium benzoate and other antiseptics could also be used as a therapy, but not 100% efficient. This research proved a significant effect of the various preparations used for temporary inhibition of fungal growth. From the results of the study it can be noticed that the preparations proposed in the current therapy of megabacteriosis (amphotericin B and sodium benzoate) start to inhibit the growth of fungi 48 hours after application to fungi *in vitro*. On the other hand, the groups containing the extracts of BSF larvae (*Hermetia illucens*) showed a good effect on the temporary inhibition of fungal growth during the first 24 to 48 hours. Other preparations used in the study such as toltrazuril, chlorhexidine and fenbendazol showed better efficacy in temporary inhibition of fungal growth than the preparations used in current therapy. Other preparations used in the study didn't show significant efficacy in inhibiting fungal growth. Achieved results show the need to proceed with further research with used formulations, solely or in combinations, with continuous everyday application during *in vitro* testing.

**Key words:** megabacteriosis, *Macrorhabdus ornithogaster*, BSF larvae *Hermetia illucens* extract, amphotericin B, sodium benzoate, fenbendazol, toltrazuril