



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Centro Interdisciplinario de Investigación
para el Desarrollo Integral Regional
CIIDIR – OAXACA**

INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO, BIODESBRIDACIÓN Y TASA DE OVIPOSICIÓN DE MOSCAS (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

Alicia Fonseca Muñoz

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

**Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca
2019**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca siendo las 13:30 horas del día 9 del mes de mayo de 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR OAXACA para examinar la tesis titulada: "Inhibición de crecimiento bacteriano, biodesbridamiento y tasa de oviposición de moscas (Diptera:Calliphoridae).

Presentada por el alumno:

Fonseca Muñoz
Apellido paterno Apellido materno
Nombre(s) Alicia

Con registro:

A	1	5	0	1	1	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. Rafael Pérez Pacheco


Dr. Carlos Alejandro Granados Echegoyen


Dr. Jaime Ruiz Vega


Dr. José Antonio Sánchez García

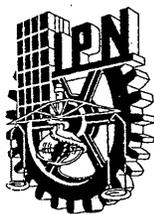

Dr. Alfonso Vásquez López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca el día 10 del mes de junio el año 2019, el (la) que suscribe Alicia Fonseca Muñoz alumno(a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales con número de registro A150114, adscrito a Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dres. Rafael Pérez Pacheco y Carlos Alejandro Granado Echegoyen y cede los derechos del trabajo intitulado **“Inhibición de crecimiento bacteriano, biodesbridamiento y tasa de oviposición de moscas (Diptera:Calliphoridae)”** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección afonsem@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Alicia Fonseca Muñoz

Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

A Dios por bendecirme día a día en cada uno de mis proyectos y a mi hermosa familia por todo el amor y apoyo que siempre me han brindado, por jamás dudar de mis estudios y llenarme de amor cada momento de mi vida.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAX) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), por permitirme desarrollar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Rafael Perez Pacheco y al Dr. Carlos Alejandro Granados Echegoyen por su gran amistad y su apoyo durante todo este tiempo.

Al Hospital San José en especial al Dr. Hugo Sarmiento Jiménez por todo su apoyo brindado durante todo este tiempo en mis proyectos de vida, por ser un gran soporte en mis ideas y en mis proyectos.

A la Licenciatura en Biología en especial a los maestr@s de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca por todo su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A los integrantes del laboratorio de Larvaterapia del Hospital San José: Agustín, Sofía y Liliana por su amistad, confianza, apoyo y sobre todo su entusiasmo en esta tesis

Agradezco por sus comentarios y revisiones del documento a los miembros del comité tutorial Dr. Rafael Perez Pacheco, Dr. Jaime Ruiz Vega, Dr. Alfonso Vasquez Lopez, Dr. Jose Antonio Sanchez Garcia.

A Ivan Diaz Rodriguez por todos estos años de apoyo, por su gran ayuda y sobre todo su amor brindado a este proyecto.

A los Dres Patricia J. Thyssen por su apoyo, enseñanzas, sobre todo por su gentileza y amistad por permitirme desarrollar un capítulo de mi tesis en su laboratorio de biología de la Universidad Estadual de Campinas UNICAMP Brasil. Dr. Ronald Sherman director de Monarch Labs EU por toda sus enseñanzas, paciencia y sobre todo su amistad, al Dr. Jeffery K Tomberlin del Laboratorio de Entomología Forense Texas A&M por sus comentarios y recomendaciones en la elaboración de esta tesis.

Durante el desarrollo de este estudio se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con beca mixta para estancias en el extranjero y beca nacional para estudios de doctorado

DEDICATORIA

*CON TODO MI AMOR A A MI HERMANA **EVANGELINA FONSECA MUÑOZ**
QUE ES UNA ESTRELLA QUE ILUMINA MI VIDA DESDE EL CIELO Y A MI MADRE
LEONIDES MUÑOZ CHAVEZ QUE SIEMPRE HA SIDO UNA GRAN PILAR EN MI
VIDA Y EJEMPLO DE LUCHA Y PERSEVERANCIA.*

RESUMEN

La familia Calliphoridae es ampliamente distribuida con más de 1000 especies, en 150 géneros, de los cuales se encuentran distribuidos en todo el mundo. El efecto inhibitorio de *Chrysomya rufifacies* (Macquart) y *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) excreciones-secreciones (ES) en *Staphylococcus aureus* (Bacillales: Staphylococcaceae) se determinó utilizando un método colorimétrico portátil sin necesidad de ningún instrumento espectral dedicado. La inhibición se midió con el software ImageJ. *S. aureus* y fue expuesto a diferentes concentraciones de ES de ambas especies individualmente. A una concentración de 800 ppm ES de *C. rufifacies* y *C. macellaria*, se inhibió el crecimiento bacteriano $97.45 \pm 1.70\%$ y $82.21 \pm 1.88\%$, respectivamente. Como se esperaba, la exposición a una concentración más baja (es decir, 50 ppm) fue menos inhibitoria (*C. rufifacies* ES, $77.65 \pm 4.25\%$ y *C. macellaria* ES, $43.54 \pm 4.63\%$). Por otro lado la búsqueda de proteínas con actividad antimicrobiana en diferentes organismos se ha asociado principalmente con el creciente problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos se evaluó in vitro la actividad antibacteriana de las ES de larvas de siete especies de moscas (Calliphoridae) en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, las ES extraídas de cada especie se evaluó en dos concentraciones de proteínas (0,1 y 1,0 ug / ml). Con la concentración de 0,1 mg / ml de proteínas de larval SE *C. putoria* redujo la población de *P. aeruginosa* desde las 2 h hasta 24 h. *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *C. macellaria*, *L. cuprina* y *L. eximia* mostraron una actividad contra *S. aureus*. En la concentración de 1 mg / ml de proteínas de larval SE *L. cuprina* mostró actividad inhibitoria a las 0 h, 1 h y 2 h contra *P. aeruginosa*, *C. megacephala* y *C. putoria* mostraron actividad contra *S. aureus* a las 4h, 5h, 6h y 24 horas. La gangrena de Fournier es una fascitis necrotizante fulminante del perineo y los genitales, dos hombres diabéticos se inscribieron en este estudio. Los aislados microbianos incluyeron *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, y los antibióticos se seleccionaron en consecuencia. Los tratamientos con larvas de mosca desinfectadas *Lucilia sericata* (Diptera:Calliphoridae) fueron seguidos rápidamente por la desaparición del tejido necrótico, el control de la infección y el crecimiento del tejido de granulación. Un paciente requirió tres ciclos de tratamiento de 48 horas, 8 ciclos por el otro, cada uno con 10 larvas / cm² de superficie de la herida. Ambos pacientes sobrevivieron sin necesidad de reconstrucción anatómica. La terapia con larvas disminuyó el número de procedimientos quirúrgicos que de otro modo habrían sido necesarios y dio lugar a resultados muy favorables. Los dípteros son los primeros colonizadores de los cadáveres,

Lucilia cuprina, *Lucilia sericata* y *Cochliomya macellaria* son utilizadas como herramientas en el proceso legal de la intervalo post mortem (IPM). En el presente estudio se determinó el porcentaje de oviposición de las tres especies (1 hembra 2 machos) con hígados frescos de res, pollo y cerdo durante fotoperiodos 12:12 horas (luz/obscuridad) con cambios entre cada fotoperiodo en un periodo de 15 días. Los resultados mostraron que *Lucilia sericata* obtuvo el más alto porcentaje de oviposición 29.55% en hígado de pollo durante el día, de la misma forma el hígado de pollo fue el que más atracción tuvo con un 35.51% durante el día. En cuanto a los fotoperiodos el más alto porcentaje de oviposición fue durante el día teniendo 57.92%. La oviposición en los califóridos es diferente entre cada especie, esto dependiendo de las condiciones de sustrato y fotoperiodo en las que se encuentren cada especie.

Palabras clave: Calliphoridae, desbridamiento, secreciones-excreciones, oviposición, inhibición bacteriana.

ABSTRACT

The Calliphoridae family is distributed with more than 1000 species, in 150 genera, of which are distributed throughout the world. The inhibitory effect of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) and *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) larval excretions-secretions (ES) with *Staphylococcus aureus* (Bacillales: Staphylococcaceae) was determined using a portable colorimetric method without the need for any dedicated spectral instrument. The inhibition was measured with the ImageJ software. *S. aureus* and was exposed to different ES concentrations of both species individually. At a concentration of 800 ppm ES of *C. rufifacies* and *C. macellaria*, bacterial growth was inhibited by $97.45 \pm 1.70\%$ and $82.21 \pm 1.88\%$, respectively. As expected, exposure to a lower concentration (ie, 50 ppm) was less inhibitory (*C. rufifacies* ES, $77.65 \pm 4.25\%$ and *C. macellaria* ES, $43.54 \pm 4.63\%$). On the other hand, the search for proteins with antimicrobial activity in different organisms has been associated mainly with the growing problem of bacterial resistance to antibiotics. The antibacterial activity of ES larvae of seven species of flies (Calliphoridae) was evaluated in vitro. Growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, the ES extracted from each species was evaluated in two protein concentrations (0.1 and 1.0 ug / ml). With the concentration of 0.1 mg / ml protein of larval SE of *C. putoria* reduced the population of *P. aeruginosa* from 2 h to 24 h. *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *C. macellaria*, *L. cuprina* and *L. eximia* showed activity against *S. aureus*. In the concentration of 1 mg / ml of protein of larval SE of *L. cuprina* showed inhibitory activity at 0 h, 1 h and 2 h against *P. aeruginosa* and *C. megacephala* and *C. putoria* showed activity against *S. aureus* at 4 h, 5 h, 6 h and 24 hours. Fournier's gangrene is a fulminating necrotizing fasciitis of the perineum and genitals, two diabetic men enrolled in this study. The microbial isolates included *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, and the antibiotics were selected accordingly. The treatments with disinfected *Lucilia sericata* larvae (Diptera: Calliphoridae) were followed quickly by the disappearance of the necrotic tissue, the control of the infection and the growth of the granulation tissue. One patient required three treatment cycles of 48 hours, 8 cycles for the other, each with 10 larvae / cm² of wound surface. Both patients survived without the need for anatomical reconstruction. Therapy with larvae decreased the number of surgical procedures that would otherwise have been necessary and resulted in very favorable results. The blowflies are the first colonizers of the corpses, *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata* and *Cochliomyia macellaria* are used as tools in the legal process of the post mortem interval (IPM). In the present study the percentage of oviposition of the three species of Calliphorids (1 female 2 males) with fresh livers of beef, chicken and pork during photoperiods 12:12 hours (light / dark) with changes between each photoperiod in a

period of 15 days was determined. The results showed that *Lucilia sericata* obtained the highest percentage of 29.55% oviposition in chicken liver during the day, in the same way the chicken liver was the most attractive with 35.51% during the day. As for the photoperiods the highest percentage of oviposition was during the day having 57.92%. The oviposition in the califorids is different between each species, this depending on the substrate and photoperiod conditions in which each species is found.

Key words: Calliphoridae, debridement, secretions-excretions, oviposition, bacterial inhibition.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN GENERAL	14

CAPITULO I

Actividad bactericida de *Chrysomya rufifacies* y *Cochliomyia macellaria*

(Diptera: Calliphoridae) Excreciones-Secreciones de larvas contra <i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach1884.....	16
RESUMEN.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUCCIÓN.....	18
MATERIALES Y METODO	21
Colonia de moscas	21
Colección de secreciones-excreciones.....	21
Ensayo antibacteriano.....	22
Adquisición de imágenes y procesamiento de datos	22
Análisis de datos.....	23
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	24
LITERATURA CITADA.....	28

CAPITULO II

Ensayos in vitro de la evaluación de la acción de exosecreciones de larvas de siete especies de moscas (Diptera; Calliphoridae) sobre el crecimiento de

<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
--	----

RESUMEN	38
ABSTRACT	39
INTRODUCCION	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
Obtencion de las larvas.....	41
Obtencion de las secreciones-excreciones.....	41
Determinación de la concentración de proteínas	42
Preparacion de la suspensión bacteriana.....	42
Análisis de concentración inhibitoria mínima (CIM).....	42
Ensayos para evaluar el efecto de las SE contra las bacterias.....	43
RESULTADOS.....	44
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	51
CAPITULO III	
Larvaterapia como un complemento eficiente y altamente eficaz en el desbridamiento de Gangrena de Fournier.....	
	58
RESUMEN	58
ABSTRACT	59
INTRODUCCIÓN.....	60
MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
Criterios de inclusión de pacientes	61
Crianza de moscas y obtencion de larvas.....	61
Aplicación de larvas	62
RESULTADOS.....	62
DISCUSIÓN.....	66
LITERATURA CITADA.....	70

CAPITULO IV

Tasa de oviposición de tres especies de moscas (Diptera:Calliphoridae)

con tres sustratos.....	73
RESUMEN	73
ABSTRACT	74
INTRODUCCIÓN	75
MATERIALES Y MÉTODOS	76
Cria de las moscas	76
Conteo de huevos.....	76
Análisis estadísticos.....	77
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	78
CONCLUSIONES.....	82
LITERATURA CITADA.....	83

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las moscas de la familia Calliphoridae son ampliamente distribuidas en el mundo ya que contiene mas de 1000 especies en 150 géneros, las especies de esta familia son de importancia médica y forense. En el área medica la curación de heridas crónicas es un reto en el sector de salud a nivel mundial, debido a la necesidad de conocer nuevos métodos rápidos y seguros en el manejo de heridas, además de los altos costos y el tiempo. Un factor que incide es el retraso de la cicatrización por el crecimiento bacteriano, además de que algunas bacterias han presentado resistencia a los antibióticos. Se han reportado varios estudios del efecto bactericida de las secreciones/excreciones de larvas de califóridos con bacterias gram-positivas y en gram negativos, la mayoría de los estudios se han desarrollado con larvas de moscas *Lucilia sericata*, sin embargo no ha habido ningún reporte de los efectos benéficos de las secreciones/excreciones de larvas *Chrysomya rufifacies* (Macquart) con bacterias *Staphylococcus aureus* cuantificadas mediante análisis colorimétricos, por ello en el Capítulo 1 se han trabajado con la inhibición de *Staphylococcus aureus* con las secreciones-excreciones (ES) de larvas de moscas *Chrysomya rufifacies* y *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) bacterias mediante la imagen digital basada en colimetría. De la misma forma en el Capítulo 2 se trabajó con las SE larvales de siete especies de importancia medica y forense en Brasil con dos concentraciones de proteínas (0,1 y 1,0 ug / ml) analizados frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Los califóridos han sido ampliamente estudiados debido a su importancia médica, ya que ellos pueden causar miasis benignas y malignas, algunas especies han sido reportadas como método de desbridamiento en las heridas necrosadas conocida como larvaterapia, dentro de las especies más representativas se encuentran las larvas de la mosca *Lucilia sericata*, las cuales han sido reportadas con efectos benéficos en el manejo de heridas, sin embargo no hay suficientes reportes de sus efectos en gangrenas de Fournier, es por ello que en el Capítulo 3 se manejan dos casos de pacientes diagnosticados con este padecimiento y que fueron tratados con larvas *Lucilia sericata* con dosis de 10 larvas por cm² en ciclos de 48 horas cada uno. La importancia de los califóridos en el área forense son conocidas como las primeras colonizadoras en los cadáveres, son utilizados evidencia forense y brindar información que permiten estimar el intervalo post-mortem (IPM), entre sus especies más representativas algunos estudios de conducta de califóridos en el área forense muestran la necesidad de conocer la atracción y oviposición de cada especie en cuanto al sustrato y fotoperíodo de cada especie, sabiendo que las diversas especies tiene conductas diferentes en el proceso de oviposición dependiendo de las condiciones medio ambientales, en el Capítulo 4 se

buscó contribuir al conocimiento de oviposición de cada hembra de cada especie *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), *Lucilia sericata* (Meiguen) y *Lucilia cuprina* (Wiedemann), con tres sustratos de hígados de res, cerdo y pollo y del fotoperiodo.

CAPITULO I

Actividad bactericida de *Chrysomya rufifacies* y *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) Excreciones-Secreciones de larvas contra *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884

Bactericidal Activity of *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) Larval Excretions-Secretions Against *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884

RESUMEN

El efecto inhibitorio de *Chrysomya rufifacies* (Macquart) y *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) excreciones-secreciones (ES) en *Staphylococcus aureus* (Bacillales: Staphylococcaceae) se determinó utilizando un método colorimétrico portátil sin necesidad de ningún instrumento espectral dedicado. Se utilizaron microplacas de poliestireno y se agregaron a cada pocillo 100 µl del inóculo bacteriano (5×10^5 CFU) / ml más 100 µl de las exosecreciones de las diferentes concentraciones. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 50 µl de una solución al 1% de la tinción con cloruro de trifetil tetrazolio para determinar la viabilidad bacteriana. El desarrollo del color en cada pozo se midió con el software ImageJ. *S. aureus* fue expuesto a diferentes concentraciones de ES de ambas especies individualmente. A una concentración de 800 ppm ES de *C. rufifacies* y *C. macellaria*, se inhibió el crecimiento bacteriano $97.45 \pm 1.70\%$ y $82.21 \pm 1.88\%$, respectivamente. Como se esperaba, la exposición a una concentración más baja (es decir, 50 ppm) fue menos inhibitoria (*C. rufifacies* ES, $77.65 \pm 4.25\%$ y *C. macellaria* ES, $43.54 \pm 4.63\%$). Este estudio demuestra por primera vez la actividad bactericida de *C. rufifacies* y *C. macellaria* ES contra *S. aureus*. Este hallazgo es prometedor, ya que podría resultar en la identificación y síntesis de proteínas capaces de suprimir el desarrollo de patógenos en las heridas. Además, el método propuesto puede simplificar el uso de instrumentos de laboratorio costosos para la determinación de la actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

The inhibitory effect of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) and *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) larval excretion-secretions (ES) on *Staphylococcus aureus* (Bacillales: Staphylococcaceae) was determined using a portable colorimetric method without the need for any dedicated spectral instrument. Polystyrene 96 well microplates were used and 100 μ l of the bacterial inoculum (5×10^5 CFU/ml) plus 100 μ l of the dipteran exosecretions at different concentrations were added to each well. Subsequently, 50 μ l of a 1% solution of the triphenyl tetrazolium chloride stain was added to each well to determine the bacterial viability. The color development in each well was measured with the ImageJ software. *S. aureus* was exposed to different concentrations of the ES of both species individually. At a concentration of 800 ppm ES of *C. rufifacies* or *C. macellaria*, bacterial growth was inhibited $97.45 \pm 1.70\%$ and $82.21 \pm 1.88\%$, respectively. As expected, exposure to a lower concentration (i.e., 50 ppm) was less inhibitory (*C. rufifacies* ES, $77.65 \pm 4.25\%$ and *C. macellaria* ES, $43.54 \pm 4.63\%$). This study demonstrates for the first time the bactericidal activity of *C. rufifacies* and *C. macellaria* ES against *S. aureus*. This finding is promising as it could result in the identification and synthesis of proteins capable of suppressing pathogen development in wounds. Additionally, the proposed method can simplify the use of expensive laboratory instruments for antimicrobial activity determination.

Keywords: Antibacterial activity, Maggot's exosecretions, Calliphoridae, ImageJ, Colorimetric-analysis.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de nuevos compuestos prometedores derivados de insectos como moléculas biológicamente activas de fuentes naturales ha sido un pilar en las ciencias biológicas durante milenios (Srivastava et al. 2009). Incluso hoy en día, los curanderos tradicionales usan insectos como medicina para tratar heridas (Alves & Alves, 2011; Cherniack, 2010). Los esfuerzos de investigaciones recientes han demostrado que los productos químicos producidos por los insectos, como resultado de sus mecanismos de defensa personal, pueden utilizarse como antibacterianos (Talukdar 2009; Mishra et al. 2003). Entre las especies de insectos más comúnmente utilizadas para fines médicos se encuentran las larvas de moscas (Diptera: Calliphoridae). Más específicamente, las larvas de *Lucilia sericata* (Meigen) (Mumcuoglu 2007), *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Paul et al. 2009) y *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Masiero et al. 2017) han sido examinadas para determinar su uso en el tratamiento de heridas infectadas. Se ha atribuido un enorme potencial económico e innovador al producto natural derivado de insectos (Vilcinskas 2011).

Actualmente, el tratamiento de las heridas crónicas es un gran desafío. Dicho reconocimiento se debe a los altos costos involucrados en el tratamiento de dichas heridas y al tiempo necesario para una recuperación completa. En muchos casos, la recuperación se retrasa debido a la proliferación bacteriana y a su resistencia a los antibióticos. Además, en muchos casos, las heridas están infectadas con múltiples especies microbianas, lo que hace que el diagnóstico y el tratamiento sean aún más difíciles (Bowler & Davies, 1999). Por ejemplo, tanto *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (Livermore 2000; Tentolouris et al. 1999) como *Pseudomonas* que ocurren comúnmente en heridas crónicas (Rahim et al. 2016; Gjodsbol et al. 2006). Por lo tanto, los planes de tratamiento pueden ser complejos y difíciles de implementar.

Hay más de 30 especies de *Staphylococcus*, el *Staphylococcus aureus* tiene el mayor impacto en la humanidad debido a que es un patógeno oportunista comúnmente asociado con los hospitales (Diarra et al. 2013). Además, en las últimas dos décadas, el número de infecciones por *S. aureus* resistentes a la meticilina ha aumentado (Cardozo et al. 2013). De hecho, esta bacteria ha sido identificada como la segunda causa más común de infecciones en el flujo sanguíneo asociadas con los hospitales (Purrello et al. 2014). Rodvold y McConeghy (2014) describieron que *S. aureus* se ha asociado con una morbilidad significativa y surgió como una causa crítica de las infecciones de la herida. La prevalencia de esta cepa se ha convertido en un importante patógeno estudiado en la

cicatrización de heridas en el mundo. Además, la resistencia antimicrobiana de esta especie se está volviendo más común y, en consecuencia, es una preocupación aún mayor.

La larvaterapia (LT) ha proporcionado resultados prometedores en la curación de heridas (Cruz-Saavedra et al. 2016). La curación de heridas inducida por larvas se produce a través del desbridamiento, la desinfección y la estimulación de la formación de tejidos, seguida de un efecto bacteriostático / antibacteriano y antiséptico que elimina el crecimiento bacteriano (Bexfield et al. 2004). La resistencia a los antibióticos es un desafío importante que el mundo enfrenta hoy. La mayoría de las investigaciones examinaron el uso de larvas de *L. sericata* debido a su distribución cosmopolita (Herrmann et al. 2019; Baumann et al. 2017; Bernhardt et al. 2017; Valachova et al. 2014). De la misma manera, el efecto antimicrobiano de *L. sericata* se ha demostrado en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como una reducción en el biofilm formado por *Staphylococcus aureus* (Bexfield et al. 2010).

La familia Calliphoridae contiene más de 1000 especies, en 150 géneros, que se distribuyen en todo el mundo (Shewell 1987; Hennig 1973). Muchas de estas especies son conocidas como colonizadores de restos humanos en descomposición (Byrd y Castner 2010; Wells y Greenberg 1992). Entre las especies más representativas se encuentran *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), *Chrysomya rufifacies* (Macquart), *L. sericata* y *L. cuprina* (Wiedemann). *C. rufifacies* es conocida como el gusano veloso, tiene una distribución mundial y un interés especial para la ciencia forense en muchos países del mundo (Byrd y Castner 2010; Sukontason et al. 2008; Wells y Greenberg, 1994). *C. macellaria* es una especie de cría en carroña de importancia médica, veterinaria y forense, y tiene una distribución ampliamente en la región neotropical (Byrd & Castner 2010).

Las secreciones-excreciones (SE) de larvas de *L. sericata* contienen compuestos de bajo peso molecular que han sido demostrados *in vitro* que son activos contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Huberman et al. 2007). Los más notables son las defensinas, los péptidos cíclicos antimicrobianos y también podrían estar relacionados con la respuesta inmune de un insecto, que se activa durante la terapia de desbridamiento larval (Andersen et al. 2010). La mayor parte de la investigación de la actividad antibacteriana se ha realizado en condiciones *in vitro* a partir de las secreciones y excreciones de larvas de *L. sericata* (Bohova et al. 2014; Andersen et al 2010; Harris et al 2009). Ratcliffe et al. (2015) indicaron que las secreciones-excreciones de larvas de *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps* y *Chrysomya putoria* tuvieron una alta actividad antibacteriana contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Sin embargo, la actividad antibacteriana de *Chrysomya rufifacies*, que es uno de los objetivos de nuestro estudio, no se había

investigado hasta la fecha. Algunas especies como *Calliphora vicina* (Barnes et al. 2010), *L. cuprina* (Arora et al. 2011, 2010) y *C. macellaria* (Masiero et al. 2017) también se han notificado, pero con menos frecuencia.

Asimismo, la cuantificación colorimétrica del causa-efecto de los péptidos de los dípteros sobre el crecimiento bacteriano con programas especializados en informática, además es un proceso innovador y de bajo costo para cualquier situación adversa en equipos de laboratorios para estimar el efecto antibacteriano. Los desarrollos recientes de las tecnologías de análisis de imágenes han hecho más accesible una foto de alta resolución producida desde una cámara digital. Existe una amplia gama de tareas cruciales en las que las tecnologías informáticas pueden ser una herramienta actual para desarrollar detecciones colorimétricas rápidas y de bajo costo para el análisis cuantitativo (Ferrari et al. 2017). ImageJ es un software de procesamiento de imágenes de código abierto y se puede descargar desde <http://rsbweb.nih.gov/ij/>. El software se puede instalar en cualquier sistema de plataforma, por lo que se ha convertido en una herramienta valiosa en la investigación que involucra el análisis de imágenes digitalizadas. Además, se ha utilizado para diversas aplicaciones en una amplia escala espacial, desde experimentos moleculares que incluyen el recuento de eritrocitos nucleados en frotis de sangre (medicamentos), ciencias biológicas y ambientales, hasta aplicaciones entomológicas y estudios que analizan la expansión de los arrecifes de coral (Fortin & Battie 2012; Igathinathane et al. 2009; Teale 2009; Collins 2007; Toews et al. 2006; Johnson & Perez 2006; Halley et al. 2005; Hill et al. 2005; Gering & Atkinson 2004; Abramoff et al. 2004).

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del crecimiento inhibitorio *in vitro* causado por las secreciones-excreciones de larvas de importancia forense (*C. rufifacies* y *C. macellaria*) en la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*. Además, pretende demostrar el uso de un método de detección simple, de bajo costo y potencialmente portátil para el análisis colorimétrico del crecimiento bacteriano sin utilizar ningún instrumento espectral de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colonia de moscas

Las colonias de *C. rufifacies* y *C. macellaria* se criaron en una cámara de cría de insectos en la Universidad Autónoma de Campeche, México (19°49'36.7" N, 90°33'15.6" W). La identificación morfológica se realizó bajo un estereomicroscopio (DS-2MV-NIKON) utilizando las claves de identificación descritas por (Grella et al. 2015; Irish et al. 2014; Grella & Thyssen 2011). Las colonias de moscas se mantuvieron en jaulas de malla (40 cm x 40 cm x 40 cm) a $25 \pm 1,5$ ° C, bajo un fotociclo de 12:12 h luz:oscuridad y humedad relativa ($70 \pm 10\%$). Aproximadamente, se agregaron 50 g de hígado de pollo fresco en las jaulas de malla durante 4 h por la mañana cuando se necesitaban huevos para la experimentación. Se proporcionó azúcar granulada (sacarosa) y agua ad libitum (Sukontason et al. 2008; Gabre et al. 2005). En un gabinete de flujo laminar, los huevos que se colectaron en el sustrato se transfirieron a a matraces estériles transparentes de 1 L que contenían aserrín estéril para la cría, fueron renovados por 50 g de hígado de pollo cada dos días como suplemento de crecimiento e incubados a 27 ° C. Todo ello hasta que las larvas eclosionadas alcanzaron el tercer estadio.

Colección de secreciones-excreciones

Se tomaron larvas del tercer estadio de *C. rufifacies* y *C. macellaria* (≈ 1500) de colonias previamente establecidas y se usaron para obtener secreciones-excreciones de larvas (Pinilla et al. 2013; Rueda et al. 2010). Las larvas se alimentaron con 200 g de hígado de res y se transfirieron a un tubo cónico, donde se lavaron cuatro veces con agitación constante durante 5 minutos en diferentes soluciones para esterilizarse siguiendo el método propuesto por Cruz-Saavedra et al. (2016): 1) hipoclorito de sodio al 0,5%, 2) formaldehído al 5% y 3) lavado con solución salina estéril. Posteriormente, se añadieron 6 ml de solución salina a las larvas; el tubo se cubrió con papel de aluminio y se incubó en un horno (Felisa EU) durante 1 hora a 37 ° C para inducir estrés y producir exudados. Las secreciones-excreciones acumuladas se colectaron con una jeringa desechable y se pasaron a través de papel de filtro y se centrifugaron a 13,000 g durante 10 minutos a 4 ° C (Eppendorf-5810R). El sobrenadante de secreciones-excreciones que se utilizó en el ensayo antimicrobiano se filtró a través de filtros Millipore (0,22 μm) para asegurar la consistencia de la actividad antibacteriana no inducida por bacterias contaminantes. Sin embargo, se tomó una muestra para crecer en Agar de Dextrosa de Papa (PDA) y Agar de Soja Trypticase (TSA) a 27° C

para confirmar la ausencia de contaminación bacteriana. Las exosecreciones se mantuvieron a -80° C hasta su uso (Díaz-Roa et al. 2014).

Ensayo antibacteriano

La actividad antibacteriana de larvas de *C. rufifacies* y *C. macellaria* SE se llevó a cabo utilizando la técnica de microdilución. Se aisló una cepa bacteriana de *S. aureus* de un paciente en el Hospital General de Campeche, México y se donó al Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Universidad Autónoma de Campeche. Para obtener el inóculo bacteriano, se cultivó *S. aureus* en una placa de Petri con agar tripticasa de soya y se incubó a 37° C durante 24 horas. Posteriormente, el inóculo se ajustó a una concentración final de 5×10^5 UFC / ml. Se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos para llevar a cabo los bioensayos, se depositaron 100 μ l de inóculo bacteriano en cada placa de pocillo y se agregaron 100 μ l de las exosecreciones de los dípteros a 800, 400, 200, 100 y 50 ppm, y se realizaron tres controles experimentales. estableciendo un control negativo (bacteria con medio de cultivo), un medio de cultivo y un control positivo (bacteria con amikacina). Las microplacas se incubaron a 37° C durante 24 horas. Posteriormente, se agregaron 50 μ l de solución de cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) (Sigma-Aldrich) al 1% en cada pocillo para determinar el efecto bacteriano de las exosecreciones sobre las bacterias después de 30 minutos; la reducción de TTC por las enzimas deshidrogenasas bacterianas produce un precipitado rojo que indica un efecto negativo; por otra parte, ningún cambio de color indica un efecto inhibidor positivo.

Adquisición de imágenes y procesamiento de datos

Como se muestra en la Figura 1, el color que se desarrollaba en cada pocillo de la microplaca se fotografió con una cámara digital (Nikon-D3300®, Japón) con el formato de alta resolución. La imagen fue asistida con el software Adobe Photoshop 14.0 (Programa de Manipulación de Imágenes de Adobe - TIFF, 600 dpi) y depositada con ImageJ 1.52a (Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD, EE. UU.) (Rasband 1997–2016, Schneider et al. 2012) . La densidad óptica integrada de cada punto se analizó utilizando imágenes de nivel de gris que se transfirieron desde la imagen RGB para observar el área bajo la curva de cada tratamiento e interpretación (Hartig 2013; Miller 2007, 2010,). Los datos se obtuvieron con la función 'Gel Analysis - Plot". La intensidad del color (Media \pm SD) de cada punto se midió con la función "Histograma - Medir" y se mostró en un formato de excel para ser exportado para su análisis estadístico a través de equipos informáticos.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por cuadruplicado y los datos se expresaron como media \pm desviación estándar. Los datos de intensidad colorimétrica se transformaron en un porcentaje de crecimiento bacteriano. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos. El procesamiento de los datos y la comparación de las medias se realizaron mediante el método de Tukey ($p \leq 0.05$) y el software estadístico Minitab 18.1.

RESULTADOS

Por primera vez el efecto antibacteriano de las excreciones-secreciones de larvas de *C. rufifacies* mediante un análisis colorimétrico con el software ImageJ. Además, se confirma, a través de este mismo método, el efecto tóxico de las secreciones-excreciones de larvas de *C. macellaria* contra *S. aureus* (Masiero et al. 2017). Se observó una disminución proporcional en el color de cada pocillo representativo para el crecimiento bacteriano con cada una de las concentraciones evaluadas.

A una concentración de 800 ppm de exosecreciones de larvas, hubo inhibiciones del crecimiento bacteriano de $97.45 \pm 1.70\%$ ($F = 1000.80$, $df = 6, 21$, $p < 0.0001$, $r^2 = 0.9965$) para *C. rufifacies* y $82.21 \pm 1.88\%$ ($F = 965.88$, $df = 6, 21$, $p < 0.0001$, $r^2 = 0.9964$) para *C. macellaria*, mientras que en la concentración más baja de 50 ppm, se obtuvieron $77.65 \pm 4.25\%$ y $43.54 \pm 4.63\%$ en la inhibición del crecimiento bacteriano para *C. rufifacies* y *C. macellaria*, respectivamente. La efectividad de la exosecreción de *C. rufifacies* en *S. aureus* es mayor que la de *C. macellaria* según los datos de intensidad colorimétrica e inhibición del crecimiento obtenido con el software ImageJ (Cuadro 1).

No hubo crecimiento de otras bacterias en ninguna de las lecturas observadas, lo que sugiere que el procedimiento de esterilización de larvas de mosca y la purificación de las secreciones-excreciones fue exitoso. Los filtros de membrana ($0,22 \mu\text{m}$) utilizados en el estudio se emplean para recuperar bacterias y otros microorganismos de muchas muestras ambientales porque son lo suficientemente pequeños para retenerlos (Millipore, 2000). El mecanismo es bastante simple porque retiene todas las partículas que tienen un tamaño más grande que los poros. Estos poros están formados por los espacios que resultan de la superposición de las fibras de las diferentes capas de la membrana. Así, algunas partículas más pequeñas son retenidas por otros mecanismos como las fuerzas de Van der Waals o por la suma de partículas retenidas previamente (Pearce, 2007)

Cuadro 1. Cuantificación colorimétrica de la actividad antibacteriana de *Chrysomya rufifacies* y *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) exosecreciones larvales contra *Staphylococcus aureus*

Concentración (ppm)	<i>Chrysomya rufifacies</i>		<i>Cochliomyia macellaria</i>			
	IC	ICC (%)		IC	ICC (%)	
800	200.36	97.45 ± 1.70	ab	169.03	82.21 ± 1.88	b
400	201.87	98.17 ± 0.67	ab	162.10	78.84 ± 1.28	bc
200	198.05	96.34 ± 3.71	b	156.44	76.09 ± 1.70	c
100	197.77	96.17 ± 1.40	b	155.06	75.40 ± 1.59	c
50	159.60	77.65 ± 4.25	c	89.66	43.54 ± 4.63	d
C+	205.65	100.00 ± 0.00	a	205.65	100.00 ± 0.00	a
C-	41.15	0.00 ± 0.00	d	41.15	0.00 ± 0.00	e

Los datos de las concentraciones con letras diferentes para la columna de CGI en cada especie de mosca de soplo son estadísticamente significativos ($p < 0.05$). C +: control positivo (antibiótico-sulfato de amikacina), C-: control negativo (medio bacteriano). IC: Intensidad colorimétrica. ICC: inhibición del crecimiento colorimétrico.

DISCUSIÓN

Hoy en día es muy importante conocer más sobre las herramientas de origen natural para ayudar a la implementación de diferentes medidas preventivas y terapéuticas para combatir las infecciones por *S. aureus* resistentes a la meticilina en la comunidad y los hospitales (Mejia et al. 2010). Algunos informes han demostrado la eficacia de la potente actividad antibacteriana presente en las secreciones-excreciones de larvas de las especies de la familia Calliphoridae tales como *Lucilia sericata*, *Cochliomyia macellaria* contra *S. aureus* (Masiero et al. 2017; Barnes et al. 2010; van der Plas et al. 2008; Bexfield et al. 2004). Thomas (1999) mostró una marcada actividad antimicrobiana in vitro de las secreciones-excreciones de larvas de *L. sericata* contra *Streptococcus* y *S. aureus*. Bexfield et al. (2004) demostraron que las exosecreciones de las larvas de *L. sericata* son termoestables, resistentes a la proteasa y una potente actividad antibacteriana contra una cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina. Nuestros resultados mostraron resultados similares, aunque utilizamos diferentes especies de Calliphoridae. Del mismo modo, los trabajos de Bexfield y colaboradores (2010) y Jaklic et al. (2008) demostraron que la capacidad de las exosecreciones de *L. sericata* para reducir la población de esta bacteria fue 91.5% y 100% en menos de 24 horas,

respectivamente, demostró el uso potencial de los compuestos químicos secundarios que se encuentran en esas SE. Las diferencias en la eficacia biológica que se encuentran en la literatura pueden deberse a la cantidad de larvas de mosca utilizadas para obtener las secreciones, lo que implica la variación de la concentración del producto, el uso de diferentes especies de moscas y cepas bacterianas, medio de crecimiento, biótico y / o abiótico. estrés al que están sometidas las larvas para la producción de secreciones, y por supuesto, al método de cuantificación bacteriana. Aunque los datos en nuestro estudio no difirieron de la efectividad encontrada en otras cepas bacterianas.

En esta práctica científica debemos considerar que existen compuestos con actividad bacteriostática, teniendo en cuenta los comentarios de Masiero et al. (2017) donde expresan que las secreciones-excreciones de larvas de *C. macellaria* no siempre mantuvieron un efecto antibacteriano, pero no hay razones suficientes para descartar su potencial como agente antibacteriano. Se ha demostrado que algunos compuestos tienen efectos antibacterianos como la lucifensina, que es una de las sustancias producidas por larvas *L. sericata* que están involucradas en la terapia larvaria (Valachova et al. 2014). La lucifensina juega un papel importante en la inhibición de algunos patógenos de la herida, ya que se ha encontrado en las SE de las larvas (Valachová et al. 2013; Cerovský et al. 2010). La microflora del intestino de las larvas secreta oligopéptidos con potencial antibacteriano (Bexfield et al. 2004) y desinfectantes (Erdmann & Khalil 1986), tal vez este compuesto químico se encuentra en las secreciones-excreciones evaluadas en nuestra investigación o algún otro péptido que los hace efectivos contra las bacterias; razón importante para seguir evaluando la información que se encuentra en nuestro estudio. Adicionalmente, Kawabata et al. (2010) y Barnes & Gennard (2011) han establecido que el sistema inmunitario larvario podría activarse para inducir la producción de sustancias antibacterianas para sobrevivir en un entorno infeccioso (Cerovsky & Bem 2018). En nuestro estudio, las larvas de las moscas sopladoras fueron sometidas a estrés abiótico (T ° C), lo que sugiere que esta sustancia se puede producir a través de las condiciones bióticas y/o abióticas, y no solo con la presencia de microorganismos asociados con una herida y/o afecciones bacterianas que podrían ser inducidas.

El movimiento físico de las larvas de *L. sericata* ayuda a generar SE que licúan el tejido necrótico para que pueda ser digerido fácilmente (Sherman 2014). Sus SE tienen actividad bactericida y destruyen biopelículas (Brown et al. 2012). Algunos estudios han demostrado que las SE de *L. sericata* poseen potentes péptidos con actividad antibacteriana contra *S. aureus* (Barnes et al. 2010; Bexfield et al. 2004, 2008; van der Plas et al. 2008; Cazander et al. 2009;), que tuvieron un

parecido con nuestro trabajo de investigación. Meylaers et al. (2003) informaron de un péptido antimicrobiano, beta-alanil-tirosina (sarcófagina), obtenido de recursos de insectos. Barnes et al. (2010) describieron que la concentración de SE de larvas de *Lucilia sericata* son potenciales para inhibir *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Algunas enzimas potentes que están presentes en las SE son tripsina, leucina aminopeptidasa, carboxipeptidasa, serina proteasas, aspartil proteinasa, exopeptidasa (Vistnes et al. 1981; Schmidtchen et al. 2003; Chambers et al. 2003; Telford et al. 2010). Recientemente Brown et al. (2012) mostraron que las SE de larvas contienen desoxirribonucleasa (DNAse) que desempeña un papel importante en la inhibición del crecimiento microbiano. Se han encontrado varios agentes antimicrobianos nuevos, como la serina proteasa (Morgan et al. 1991, Gao y Zhang 2009), por lo tanto, podemos inferir que las secreciones obtenidas de las larvas de mosca en nuestro trabajo contienen al menos un péptido que proporciona esta actividad biológica en la cepa bacteriana evaluada en esta investigación.

Un estudio reciente de Ahmed et al. (2016), mostraron que las secreciones-excreciones de larvas de *C. albiceps* podrían ser útiles como un agente anticanceroso potencial y un inhibidor de quinasas. Chaiwong et al. (2016) mencionaron que las exosecreciones de *C. megacephala* han mostrado inhibición del crecimiento de *E. coli*; sin embargo, no se encontró que inhibieran el crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, lo que sugiere que no todas las especies de moscas tienen el mismo potencial antibacteriano, en nuestro estudio *C. rufifacies* presentó un efecto tóxico con *S. aureus*, que se cuantificó, mediante un análisis de colorimetría basado en imágenes digitales. Algunos desarrollos en bioingeniería han tenido un gran potencial en la medicina moderna debido al desarrollo de compuestos derivados de insectos para tratar bacterias resistentes a los antibióticos, VIH, cáncer, angiogénesis, coagulación y curación de heridas (Ratcliffe et al. 2011).

Por otro lado, Baviskar (2011) comentó que las técnicas microbiológicas permiten a los científicos adquirir grandes cantidades de datos en forma de imágenes. El análisis manual de estas imágenes requiere mucho tiempo, es tedioso y a menudo, proporciona resultados sesgados e irreproducibles. Por ejemplo, el ojo humano no puede detectar una disminución en el tamaño de las células en un 10% o una disminución doble en la intensidad de una proteína marcada con fluorescencia en una imagen, pero el análisis de imágenes con ImageJ puede detectar cambios que son tan sutiles, pero biológicamente significativos, lo que permite ser una herramienta viable para cuantificar el crecimiento bacteriano. La detección se logra midiendo el cambio de color cuando las enzimas deshidrogenasas asociadas con el patógeno de interés reaccionan con un sustrato

cromogénico, el método permite un tiempo de enriquecimiento que le permite detectar bacterias en bajas concentraciones de UFC/cm² (Jokerst et al. 2012).

Este estudio muestra por primera vez la acción de la actividad bactericida de SE de *C. rufifacies* contra *S. aureus* y confirma la actividad bactericida de *C. macellaria*. La familia Calliphoridae son moscas prometedoras para el descubrimiento y desarrollo biotecnológico. Este hallazgo representa una alternativa prometedora para la generación de nuevos productos que pueden aplicarse como un recurso biotecnológico en pacientes con heridas que no desean someterse a una terapia larvaria. De la misma manera, se pretende ofrecer un método de detección simple, de bajo costo y potencialmente portátil para el análisis colorimétrico del crecimiento bacteriano sin utilizar ningún instrumento espectral de laboratorio. También recomendamos estudios de seguimiento, como la identificación química de péptidos de SE y el posible modo de acción en cepas bacterianas para obtener una visión más amplia de esta interacción SE-bacterias.

LITERATURA CITADA

- Abramoff, M. D., P. J. Magelhaes, and S. J. Ram. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics Internat.* 11: 36-42.
- Ahmed, Z. I. S., B. M. A. Mehany, M. Y. Tarek, and El-Sheikh. 2016. Excretion/secretion of *Lucilia sericata* and *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) maggots as potential anticancer agent and kinases inhibitor. *N.Y. Sci J.* 9: 95-101.
- Alves, R. R., and H. N. Alves. 2011. The faunal drugstore: Animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 7: 1-43.
- Andersen, A. S., D. Sandvang, K. M. Schnorr, T. Kruse, S. Neve, B. Joergensen, T. Karlsmark, and K. A. Krogfelt. 2010. A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 1646-1654.
- Arora, S., C. Baptista, and C. S. Lim. 2011. Maggot metabolites and their combinatory effects with antibiotic on *Staphylococcus aureus*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 10: 1-8.
- Arora, S., L.C. Sing, and C. Baptista. 2010. Antibacterial activity of *Lucilia cuprina* maggot extracts and its extraction techniques. *Int. J. Integr. Biol.* 9: 43-48.
- Barnes, K. M., and D. E. Gennard. 2011. The effect of bacterially-dense environments on the development and immune defences of the blowfly *Lucilia sericata*. *Physiol. Entomol.* 36: 96-100.
- Barnes, K. M., D. E. Gennard, and R. A. Dixon. 2010. An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. *Bull. Entomol. Res.* 100:635-640.
- Barnes, K. M., R. A. Dixon, and D. E. Gennard. 2010. The antibacterial potency of the medicinal maggot, *Lucilia sericata* (Meigen): Variation in laboratory evaluation. *J. Microbiol. Meth.* 82: 234-237.
- Baumann, A., M. Skaljic, R. Lehmann, A. Vilcinskas, and Z. Franta. 2017. Urate Oxidase produced by *Lucilia sericata* medical maggots is localized in Malpighian tubes and facilitates allantoin production. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 83: 44-53.

- Baviskar, S. N. 2011. A quick & automated method for measuring cell area using ImageJ. *Am. Biol. Teach.* 73: 554-556.
- Bernhardt, V., W. Pogoda, M. A. Verhoff, S. W. Toennes, and J. Amendt. 2017. Estimating the age of the adult stages of the blow flies *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) by means of the cuticular hydrocarbon n-pentacosane. *Sci. Justice.* 57: 361-365.
- Bexfield, A., A. E. Bond, C. Morgan, J. Wagstaff, R. P. Newton, N. A. Ratcliffe, E. Dudley, and Y. Nigam. 2010. Amino acid derivatives from *Lucilia sericata* excretions/secretions may contribute to the beneficial effects of maggot therapy via increased angiogenesis. *Br. J. Dermatol.* 162: 554-562.
- Bexfield, A., A. E. Bond, E. C. Roberts, E. Dudley, Y. Nigam, S. Thomas, R. P. Newton, and N. A. Ratcliffe. 2008. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500 Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes and Infection* 10: 325-333.
- Bexfield, A., Y. Nigam, S. Thomas, and N. A. Ratcliffe. 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.
- Bohova, J., J. Majtan, V. Majtan, and P. Takac. 2014. Selective Antibiofilm Effects of *Lucilia sericata* Larvae Secretions/Excretions against Wound Pathogens. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* 1-9.
- Bowler, P., and B. J. Davies. 1999. The microbiology of acute and chronic wounds. *Wounds.* 1: 72-78.
- Brown A., A. Horobin, D. G. Blount, P. J. Hill, J. English, A. Rich, P. M. Williams, and D. I. Pritchard. 2012. Blow fly *Lucilia sericata* nuclease digests DNA associated with wound slough/eschar and with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Med. Vet. Entomol.* 26: 432-439.
- Byrd, J., and J. Castner. 2010. Insects of forensic importance. In: Byrd, J, and J. Castner. (eds) *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*, Second edition. Taylor and Francis Group, USA, 39-126.

- Cardozo V. F., A. G. Oliveira, E. K. Nishio, M. R. E. Perugini, C. G. T. J. Andrade, W. D. Silveira, N. Durán, G. Andrade, R. K. T. Kobayashi, and G. Nakazato. 2013. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 12: 12.
- Cazander, G., K. E. B. van Veen, A. T. Bernards, and G. N. Jukema. 2009. Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/ secretions. *J. Tissue Viability.* 18: 80-87.
- Cerovský, V., and R. Bém. 2018. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: The story behind maggot therapy. *Pharmaceuticals.* 7: 251-264.
- Cerovský, V., J. Zdarek, V. Fucík, L. Monincova, Z. Voburka, and R. Bém. 2010. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell. Mol. Life. Sci.* 67: 455-466.
- Chaiwong, T., T. Srivoramas, P. Sebsumran, M. Panya, S. Wanram, and P. Panomket. 2016. Antibacterial activity of excretions-secretions from *Chrysomya megacephala* against *Escherichia coli*. *J. Med. Assoc. Thai.* 1:7-11.
- Chambers, L., S. Woodrow, A. P. Brown, P. D. Harris, D. Phillips, M. Hall, J. C. Church, and D. I. Pritchard. 2003. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *The Br. J. Dermatol.* 148: 14-23.
- Cherniack, E. P. 2010. Bugs as Drugs, Part 1: Insects. The “New” Alternative Medicine for the 21st Century? *Altern. Med. Rev.* 15: 124-135.
- Collins, T. J. 2007. ImageJ for microscopy. *BioTechniques.* 43: 25-30.
- Cruz-Saavedra, L., A. Díaz-Roa, M. A. Gaona, M. L. Cruz, M. Ayala, J. A. Cortés-Vecino, M. A. Patarroyo, and F. J. Bello. 2016. The effect of *Lucilia sericata*-and *Sarconesiopsis magellanica*-derived larval therapy on *Leishmania panamensis*. *Acta Trop.* 164: 280-289.
- Diarra M. S., G. Block, H. Rempel, B. D. Oomah, J. Harrison, J. McCallum, S. Boulanger, E. Brouillette, M. Gattuso, and F. Malouni. 2013. In vitro and in vivo antibacterial activities of

- cranberry press cake extracts alone or in combination with β -lactams against *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement Altern. Med.* 13: 90.
- Díaz-Roa, A., A. G. María, A. S. Nydia, S. Diana, A. P. Manuel, and J. B. Felio. 2014. *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) excretions and secretions have potent antibacterial activity. *Acta Trop.* 136: 37-43.
- Erdmann, G. R., and S. K. Khalil. 1986. Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 23:208-211.
- Ferrari, A., L. Stefano, and S. Alberto. 2017. Bacterial colony counting with Convolutional Neural Networks in Digital Microbiology Imaging. *Pattern Recognit.* 61: 629-640.
- Fortin, M., and M. C. Battie. 2012. Quantitative paraspinal muscle measurements: inter-software reliability and agreement using OsiriX and ImageJ. *Phys. Ther.* 82: 853-864.
- Gabre, R., F. Adham, and H. Chi. 2005. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *Acta Oecol.* 27: 179-183.
- Gao, K., and S. Zhang. 2009. Ovochymase in amphioxus *Branchiostoma belcheri* is an ovary-specific trypsin-like serine protease with an antibacterial activity. *Dev. Comp. Immunol.* 33: 1219-1228.
- Gering, E., and C. T. Atkinson. 2004. A rapid method for counting nucleated erythrocytes on stained blood smears by digital image analysis. *J. Parasitol.* 90: 879-881.
- Gjodsbol, K., J. J. Christensen, T. Karlsmark, B. Jørgensen, B. M. Klein, and K. A. Kroghfelt. 2006. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int. Wound J.* 3: 225-231.
- Grella, M. D., A. G. Savino, D. F. Paulo, F. M. Mendes, A. M. Azeredo-Espin, M. M. Queiroz, P. J. Thyssen, and A. X. Linhares. 2015. Phenotypic polymorphism of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) may lead to species misidentification. *Acta Trop.* 141: 60-72.

- Grella, M. D., and P. J. Thyssen. 2011. Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil.
http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil. (Accessed 21 October 2014).
- Halley, J. D., M. Burd, and P. Wells. 2005. Excavation and architecture of Argentine ant nests. *Insect. Soc.* 52: 350-356.
- Harris L. G., A. Bexfield, Y. Nigam, H. Rohde, N. A. Ratcliffe, and D. Mack. 2009. Disruption of *Staphylococcus epidermidis* biofilms by medicinal maggot *Lucilia sericata* excretions/secretions. *Int. J. Artif. Organs.* 32: 555-564.
- Hartig, S. M. 2013. Basic Image Analysis and Manipulation in ImageJ. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 14: 14-15.
- Hennig, W. 1973. Diptera (Zweiflügler). *Handbuch der Zoologie, Berlín.* 4: 311-337.
- Herrmann J. D., H. Beye, C. Broise, H. Hartlep, and T. Diekötter. 2019. Positive effects of the pollinators *Osmia cornuta* (Megachilidae) and *Lucilia sericata* (Calliphoridae) on strawberry quality. *Arthropod-Plant Interact.* 13: 71-77.
- Hill, M. G., N. A. Mauchline, L. R. Cate, and P. G. Connolly. 2005. A technique for measuring growth rate and survival of armoured scale insects. *N. Z. Plant Prot.* 58: 288-293.
- Huberman, L., N. Gollop, K. Y. Mumcuoglu, C. Block, and R. Galun. 2007. Antibacterial properties of whole body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots. *J. Wound Care.* 16: 123-127.
- Igathinathane, C., L. O. Pordesimo, and W. D. Batchelor. 2009. Major orthogonal dimensions measurement of food grains by machine vision using ImageJ. *Food Res. Int.* 42: 76-84.
- Irish, S., T. Lindsay, and N. Wyatt. 2014. Key to adults of Afrotropical species of the genus *Chrysomya* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae). *African Entomol.* 22: 297-306.
- Jaklic, D., A. Lapanje, K. Zupancic, D. Smrke, and N. Gunde-Cimerman. 2008. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J. Med. Microbiol.* 57: 617-625.

- Johnson, K. G., and M. E. Perez. 2006. Skeletal extension rates of cenozoic caribbean reef corals. *Palaios*. 21: 262-271.
- Jokerst, J. C., J. A. Adkins, B. Bisha, M. M. Mentele, L. D. Goodridge, and C. S. Henry. 2012. Development of a paper-based analytical device for colorimetric detection of select foodborne pathogens. *Anal. Chem.* 84: 2900-2907.
- Kawabata, T., H. Mitsui, K. Yokota, K. Ishino, K. Oguma, and S. Sano. 2010. Induction of antibacterial activity in larvae of the blowfly *Lucilia sericata* by an infected environment. *Med. Vet. Entomol.* 24: 375-381.
- Livermore, D. M. 2000. Antibiotic resistance in staphylococci, *Int. J. of Antimicrob. Agents.* 16: 3-10.
- Masiero, F. S., M. F. Aquino, M. P. Nassu, D. I. Pereira, D. S. Leite, and P. J. Thyssen. 2017. First Record of Larval Secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) Inhibiting the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Neotrop. Entomol.* 46: 125-129.
- Mejía, C., J. Zurita, and M. Guzmán-Blanco. 2010. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Braz. J. Infect. Dis.* 14: 79-86.
- Meylaers, K., A. Cerstiaens, E. Vierstraete, G. Baggerman, C. W. Michiels, A. De Loof, and L. Schoofs . 2003. Antimicrobial compounds of low molecular mass are constitutively present in insects: characterisation of b-alanyl-tyrosine. *Curr. Pharm. Des.* 9: 159-174.
- Miller, L. (August 01, 2007). Quantifying western blots without expensive commercial quantification software. In: *Quantifying western blots without expensive commercial quantification software*, vol. 2007–2016.
- Miller, L. (November 04, 2010). Analyzing gels and western blots with ImageJ. In: *Analyzing gels and western blots with ImageJ*.
- Millpore. 2000. Effect of Membrane Filter Pore Size on Microbial Recovery and Colony Morphology. 1-3.

- Mishra, N., N. C. Hazarika, K. Narain, and J. Mahanta. 2003. Nutritive value of non-mulberry and mulberry silkworm pupae and consumption pattern in Assam, India Nutr. Res. 23: 1303-1311.
- Morgan, J. G., T. Sukiennicki, H. A. Pereira, J. K. Spitznagel, M. E. Guerra, and J. W. Larrick. 1991. Cloning of the cDNA for the serine protease homolog CAP3 7/azurocidin, a microbicidal and chemotactic protein from human granulocytes. J. Immunol. 147: 3210-3214.
- Mumcuoglu, K. Y. 2007. Maggot debridement therapy. Plast. Reconstr. Surg. 120: 1738-1739.
- Paul, A. G., N. W. Ahmad, H. L. Lee, A. M. Ariff, M. Saranum, A. S. Naicker, and Z. Osman. 2009. Maggot debridement therapy with *Lucilia cuprina*: a comparison with conventional debridement in diabetic foot ulcers. Int Wound J. 6: 39-46.
- Pearce, G. 2007. Introduction to membranes: Filtration for water and wastewater treatment. Filt. Sep. 44: 24-27.
- Pinilla, Y. T., M. A. Patarroyo, and F. J. Bello. 2013. *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) life-cycle, reproductive and population parameters using different diets under laboratory conditions. Forensic Sci. Int. 233: 380-386.
- Purrello S. M., R. S. Daum, G. F. Edwards, G. Lina, J. Lindsay, G. Peters, and S. Stefani. 2014. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) update: new insights into bacterial adaptation and therapeutic targets. J Glob Antimicrob Resist 2(2):61-69.
- Rahim K., S. Saleha, X. Zhu, L. Huo, A. Basit, and O.L. Franco. 2016. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. Microb. Ecol. 73: 710-721.
- Rasband, W. S. (1997-2016). ImageJ. In ImageJ: Bethesda, MD, USA: U.S. National Institutes of Health.
- Ratcliffe, N. A., C. B. Mello, E. S. Garcia, T. M. Butt, and P. Azambuja P. 2011. Insect natural products and processes: new treatments for human disease. Insect Biochem. Mol. Biol. 41: 747-769.
- Ratcliffe, N. A., C. S. Vieira, P. M. Mendonça, R. L. Caetano, M. M. Queiroz, E. S. Garcia, C. B. Mello, and P. Azambuja. 2015. Detection and preliminary physico-chemical properties of

- antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil. *Acta Trop.* 147: 6-11.
- Rodvold K.A., and K. W. McConeghy. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future, *Clin. Infect. Dis.* 58: 20-27.
- Rueda, L. C., L. G. Ortega, N. A. Segura, V. M. Acero, and F. Bello. 2010. *Lucilia sericata* strain from Colombia: experimental colonization, life tables and evaluation of two artificial diets of the blowfly *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae). *Biol. Res.* 43: 197-203.
- Schmidtchen, A., H. Wolff, V. Rydengard, and C. Hansson. 2003. Detection of serine proteases secreted by *Lucilia sericata* in vitro and during treatment of a chronic leg ulcer. *Acta Derm. Venereol.* 83: 310-311.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband, K. W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* 9: 671-675.
- Sherman, R. A. 2014. Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here? *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 1-13.
- Shewell, G. 1987. Calliphoridae. In: J. F. McAlpine, (ed.), *Manual of Nearctic Diptera.* 2: 1133-1145.
- Srivastava, S. K., B. Naresh, and P. Hema. 2009. Traditional insect bioprospecting - as human food and medicine. *Indian J. Tradit. Know.* 8: 485-494.
- Sukontason, K., S. Piangjai, S. Siriwattananurungsee, and K. L. Sukontason. 2008. Morphology and developmental rate of blowflies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* in Thailand: application in forensic entomology. *Parasitol. Res.* 102: 1207-1216.
- Talukdar, R. B. 2009. A filip for the silk industry, in North-east India.
<http://southasia.oneworld.net/fromthegrassroots>.
- Teale, S. A., S. Letkowski, G. Matusick, S. V. Stehman, and J. D. Castello. 2009. Quantitative, nondestructive assessment of beech scale (Hemiptera: Cryptococcidae) density using digital image analysis of wax masses. *Environ. Entomol.* 38: 1235-1240.

- Telford, G., A. P. Brown, R. A. Seabra, A. J. Horobin, A. Rich, J.S. English, D. I. Pritchard. 2010. Degradation of eschar from venous leg ulcers using a recombinant chymotrypsin from *Lucilia sericata*. Br. J. Dermatol. 163: 523-531.
- Tentolouris N., E. B. Jude, I. Smirnof, E. A. Knowles, and A. J. Boulton. 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an increasing problem in a diabetic foot clinic. Diabet. Med. 16: 767-771.
- Thomas, S., A. M. Andrews, N. P. Hay, and S. Bourgoise. 1999. The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. J. Tissue Viability. 9: 127-132.
- Toews, M. D., T. C. Pearson, and J. F. Campbell. 2006. Imaging and automated detection of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) pupae in hard red winter wheat. J. Econ. Entomol. 99: 583-592.
- Valachova, I., E. Prochazka, J. Bohova, P. Novak, P. Takac, and J. Majtan. 2014. Antibacterial properties of lucifensin in *Lucilia sericata* maggots after septic injury. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 4: 358-361.
- Valachová, I., J. Bohová, Z. Pálošová, P. Takáč, M. Kozánek, and J. Majtán. 2013. Expression of lucifensin in *Lucilia sericata* medicinal maggots in infected environments. Cell Tissue Res. 353: 165-171.
- van der Plas, M. J. A., G. N. Jukema, S. W. Wai, H. C. M. Dogterom-Ballering, E. L. Lagendijk, C. van Gulpen, J. T. van Dissel, G. V. Bloemberg, and P. H. Nibbering. 2008. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemoth. 61: 117-122.
- Vilcinskas, A. 2011. Insect Biotechnology. Biologically-Inspired Systems 2. Springer Dordrecht Heidelberg London & New York. 269p.
- Vistnes, L. M., R. Lee, and G. A. Ksander. 1981. Proteolytic activity of blowfly larvae secretions in experimental burns. Surgery. 90: 835-841.
- Wells, J. D., and B. Greenberg. 1992. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. Bull. Entomol. Res. 82: 133-137.

Wells, J.D., and B. Greenberg. 1994. Resource use by an introduced and native carrion flies.
Oecologia, 99: 181-187.

CAPÍTULO II

Ensayos in vitro de la evaluación de la acción de exosecreciones de larvas de siete especies de moscas (Diptera; Calliphoridae) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

In vitro assays to evaluate the action of larval exosecretions of seven species of blowflies (Insecta, Diptera, Calliphoridae) on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

RESUMEN

La búsqueda de proteínas con actividad antimicrobiana en diferentes organismos se ha asociado principalmente con el creciente problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos. En insectos, particularmente en las moscas, varios informes han descrito que los péptidos antimicrobianos (AMP) presentes en la excreción / secreción de larvas (ES) tienen una actividad de amplio espectro contra una amplia gama de microorganismos. La especie objetivo en estas investigaciones es principalmente *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae). En el presente estudio, evaluamos in vitro la actividad antibacteriana de las larvas de ES de siete especies de moscas de las moscas (Calliphoridae) en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los ES extraídos de cada especie en dos concentraciones de proteínas (0,1 y 1,0 ug / ml) se analizaron frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Se utilizaron antibióticos como ampicilina y ciprofloxacina como grupo de control. Los ensayos revelaron la actividad con 0,1 mg / ml de proteínas *C. putoria* redujo la población de *P. aeruginosa* desde las 2 h hasta 24 h. *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *C. macellaria*, *L. cuprina* y *L. eximia* mostraron una actividad contra *S. aureus*. En la concentración de 1 mg / ml de proteínas *L. cuprina* mostró actividad inhibitoria a las 0 h, 1 h y 2 h contra *P. aeruginosa*. *C. megacephala* y *C. putoria* mostraron actividad contra *S. aureus* a las 4h, 5h, 6h y 24 horas. Estas características contribuyen al uso potencial de estos ES en medicina humana y veterinaria.

Palabras clave: Larval therapy – Medical Entomology – Multiresistant Bacteria – Wound Care – Public Health.

ABSTRACT

The search for proteins with antimicrobial activity in different organisms has been associated mainly with the growing problem of bacterial resistance to antibiotics. In insects, particularly flies, several reports have described that antimicrobial peptides (AMPs) present in larval excretion/secretion (ES) have broad-spectrum activity against a wide range of microorganisms. The target species in these investigations is mostly *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae). In the present study, we evaluated in vitro the antibacterial activity of larval ES of seven species of blowflies (Calliphoridae) on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Blowfly maggots of seven species were reared for extraction of its metabolites. The ES extracted of each species in two protein concentrations (0.1 and 1.0 ug/mL) were screened against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Antibiotics such as ampicillin and ciprofloxacin were used as a control group. The assays revealed the activity with 0.1 mg / ml protein with *C. putoria* who reduced the population of *P. aeruginosa* from 2 h to 24 h. *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *C. macellaria*, *L. cuprina* and *L. eximia* showed activity against *S. aureus*. The concentration of 1 mg / ml of protein *L. cuprina* showed inhibitory activity against *P. aeruginosa* at 0 h, 1 h and 2 h. *C. megacephala* and *C. putoria* showed activity at 4h, 5h, 6h and 24 hours against *S. aureus*. These characteristics contribute to the potential use of these ES in human and veterinary medicine. These characteristics contribute to the potential use of these ES in human and veterinary medicine.

Keywords. Larval therapy – Medical Entomology – Multiresistant Bacteria – Wound Care – Public Health.

INTRODUCCIÓN

Los tratamientos de alto costo y la aparición de bacterias multiresistentes en las heridas crónicas (Sen et al., 2009) fomentaron el resurgimiento de la Larvaterapia (LT) (Masiero & Thyssen, 2016; Pinheiro et al. 2015; Nassu & Thyssen, 2015; Téllez et al. 2012; Wang et al. 2010; Nordstrom et al. 2009; Figueroa et al. 2006), que es un tratamiento que consiste en la aplicación de larvas de moscas estériles vivas (Diptera: Calliphoridae), en lesiones agudas, crónicas y / o infectadas, con el propósito de promover o acelerar el proceso de curación (Sherman et al. 2000). El proceso de curación de heridas en con LT se realiza a través de tres acciones principales: desbridamiento, desinfección y remodelación de tejidos (Masiero et al. 2015; Van der Plas et al. 2009; Chambers et al. 2003; Prete, 1997). Los mecanismos de respuesta de los insectos contra los microorganismos pueden percibirse fácilmente por su éxito en ambientes inhóspitos de supervivencia como la basura, las heces y las carcasas de animales, sin duda, muy contaminados (Kawabata et al. 2010; Fleischmann et al., 2004; Greenberg, 1968). Por lo tanto, la acción de las larvas durante el tratamiento larval no se limita solo a la eliminación de la secreción purulenta y el tejido necrótico, es decir, el acto de desbridar, como se les atribuyó hace algunas décadas. De esta manera, varios informes han demostrado que los compuestos con acción antimicrobiana presentes en las secreciones-excreciones (SE) de las larvas tienen una actividad de amplio espectro contra una amplia gama de microorganismos (Masiero et al. 2017; Ratcliffe et al. 2015; Jiang et al. 2012; Kruglikova & Chernysh, 2011; Arora et al. 2010; Cazander et al. 2009; 2010; Jaklic et al. 2008; Smith et al. 2006; Bexfield et al. 2004; Thomas y otros, 1999; Erdmann & Khalil, 1986; Simmons, 1935). Estas acciones parecen estar asociadas, predominantemente, a los péptidos antimicrobianos (Díaz-Roa et al. 2018; Józefiak & Engberg, 2017; Gordya et al. 2017; Yakovlev et al. 2016; Čeřovský & Bém, 2014; Shazely et al., 2013; Čeřovský et al. 2011; Margolin & Gialanella, 2010; Bexfield et al. 2008; Huberman et al. 2007; Kerridge et al. 2005; Bulet et al. 1999; Lambert et al. 1989; Dimarcq et al. 1988), otros mecanismos (Greenberg, 1968 Robinson y Baker, 1939), incluidos los compuestos antimicrobianos producidos por microbios simbióticos como *Proteus mirabilis* que vive en el intestino de algunas especies de califóridos (Erdmann & Khalil, 1986). Ya se ha investigado un número considerable de especies de moscas para la búsqueda de componentes con actividad antimicrobiana que se puedan usar en medicina humana o veterinaria. La mayoría de las especies evaluadas, incluida *Lucilia sericata* (Meigen), que se encuentran entre las más estudiadas, se distribuyen en regiones templadas. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo

evaluar in vitro la actividad antimicrobiana de las excreciones / secreciones (ES) de larvas de siete especies de moscas de la mosca - *Chrysomya albiceps* (W.), *Chrysomya megacephala* (F.), *Chrysomya putoria* (W.), *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), *Cochliomyia macellaria* (F.), *Lucilia cuprina* (W.) y *Lucilia eximia* (W.) (Diptera: Calliphoridae) - contra las bacterias *Staphylococcus aureus* (grampositivas) y *Pseudomonas aeruginosa* (gram negativas). Tres de las siete especies mencionadas anteriormente, *Co. macellaria*, *Cap. megacephala* y *L. eximia*, se han utilizado con frecuencia en LT en Sudamérica (Masiero & Thyssen, 2016; Pinheiro et al. 2015; Nassu & Thyssen, 2015; Wolff-Echeverri et al. 2010; Figueroa et al. 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de larvas

Colonias de *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *C. macellaria*, *L. cuprina* y *L. eximia* se establecieron a partir de moscas adultas recolectadas en el campo (Estado de São Paulo, Brasil, 22 ° 54'21 "S, 47 ° 03'39" W) usando las trampas apropiadas (Moretti et al. 2009) que contenían hígado crudo de bovino como cebo. Las muestras recolectadas se llevaron vivas al laboratorio, se anestesiaron temporalmente mediante congelación a -20 ° C durante aproximadamente 3 minutos, se identificaron (Grella & Thyssen, 2011) y se transfirieron a jaulas de plástico en una habitación con clima controlado a 27 ± 1 ° C, 70 ± 10% de humedad relativa, y un fotoperíodo de 12 h. La colonia de *Cochliomyia hominivorax* se estableció a partir de larvas recolectadas en heridas del huésped (bovinos).

Los procedimientos para el mantenimiento y la cría de moscas en el laboratorio siguieron los mismos pasos publicados por Masiero et al. (2019). A las moscas adultas se les proporcionó agua y azúcar *ad libitum*. Se utilizó una porción de carne molida cruda para estimular la oviposición. Con la ayuda de un cepillo, los huevos obtenidos se retiraron del sustrato y se mantuvieron en papel de filtro en una cámara climática a 25 ° C durante 12 h, hasta que las larvas eclosionaron. Se permitió que las larvas se alimentaran de carne molida cruda durante 72 h.

Obtención de Secreciones-Excreciones de larvas (ES)

La producción de ES se realizó de acuerdo con los protocolos publicados por Masiero et al. (2017) y Arora et al. (2011) y con ligeras modificaciones. Aproximadamente 300 larvas de tercer estadio no estériles de cada especie se retiraron de la carne molida y se transfirieron a un frasco de lavado limpio de 500 ml. Las larvas no estériles se lavaron con 1.000 ml de agua destilada tres

veces, se secaron con toallas de papel y se transfirieron a microtubos de 2 ml (25 larvas vivas por tubo) con 200 µl de solución salina estéril. Los tubos se llevaron a una centrifugadora a 10.000 rpm a 4 ° C durante 10 min y luego se mantuvieron en un baño de agua a 37 ± 2 ° C durante 1 h en la oscuridad. Las larvas se retiraron de los tubos y se desecharon, las EES obtenidas se autoclavaron a 1 atm, a 121 ° C durante 20 min. Todas las ES se mantuvieron refrigeradas (15 ± 2 ° C) durante al menos 24 h.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas ES se determinó mediante el método de Bradford (Bradford et al., 1976) y se utilizó solución salina como estándar. Posteriormente, todas las ES tuvieron sus concentraciones finales de proteína ajustadas a 0,1 y 1 mg / ml para realizar los ensayos.

Preparación de la suspensión bacteriana

Cultivos de stock de bacterias (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) se cultivaron en placas BHI (infusión de corazón y cerebro) y se incubaron durante la noche a 37 ° C. Tres-cuatro colonias de cada bacteria con morfología similar se inocularon, por separado, en 10 ml de caldo LB (Luria-Bertani) estéril y se incubaron durante la noche a 37 ° C.

Las suspensiones bacterianas se ajustaron a 0,5 McFarland Standard con caldo LB estéril siguiendo el protocolo de Teh et al. (2017). El ajuste de las suspensiones bacterianas (1.5 x 10⁸ CFU / mL) a la densidad del estándar de 0.5 McFarland se realizó contra un fondo blanco con líneas negras contrastantes.

Análisis de concentración inhibitoria mínima (CIM)

La CMI de los antibióticos se determinó mediante un ensayo de microdilución en placas de microtitulación de 96 pocillos de acuerdo con la pauta de microdilución de caldo de NCCLS (2003). Los antibióticos ampicilina (Pharmachemie B.V) y Ciprofloxacina (Pharmachemie B.V.) se seleccionaron debido a la sensibilidad antimicrobiana observada en las cepas en estudio. En los ensayos para evaluar el efecto de los ES de cada especie de mosca contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, la solución madre de cada antimicrobiano se diluyó en agua destilada estéril hasta la concentración final de 10 mg / ml.

Ensayos para evaluar el efecto de las SE contra las bacterias

En una placa de microtitulación de 96 pocillos, para cada bacteria, el ensayo se compone de 1 fila vertical de caldo LB estéril, 7 filas verticales de ES estériles (1 fila para cada especie de mosca sopladora), 1 fila vertical de control de crecimiento (LB + *S. aureus* o *P. aeruginosa* 1: 1), 1 fila vertical de control de antibióticos (Ampicilina o Ciprofloxacina + *S. aureus* o *P. aeruginosa* 1: 1), y 7 filas verticales de prueba (ES estériles de cada especie de mosca + *S. aureus* o *P. aeruginosa* 1: 1). Los grupos experimentales dispuestos en las líneas verticales se probaron por cuadruplicado (N = 4), por esta razón algunos grupos se organizaron en la parte superior (líneas horizontales entre AD) mientras que otros en la parte inferior (líneas horizontales entre EH) de placa de microtitulación. Se introdujo un volumen total de 200 µL en cada pozo.

Para evaluar la actividad de los ES de cada especie contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, se midieron los cambios en la densidad óptica (OD) utilizando un lector de microplacas multimodo SpectraMax™ i3x. En este equipo, la microplaca se incubó a 37 ° C. Las OD de cada pocillo se controlaron cada 1 h (hasta 6 h) y después de 24 h a 540 nm (OD540).

Análisis de datos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía), seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey, para evaluar las diferencias entre los grupos analizados. El nivel de significancia fue $\alpha = 0.05$. Todos los análisis se realizaron utilizando los PROC GLM (Modelos lineales generales) del R™ (R Core Team, 2017).

RESULTADOS

Efecto de las larvas ES contra P. aeruginosa.

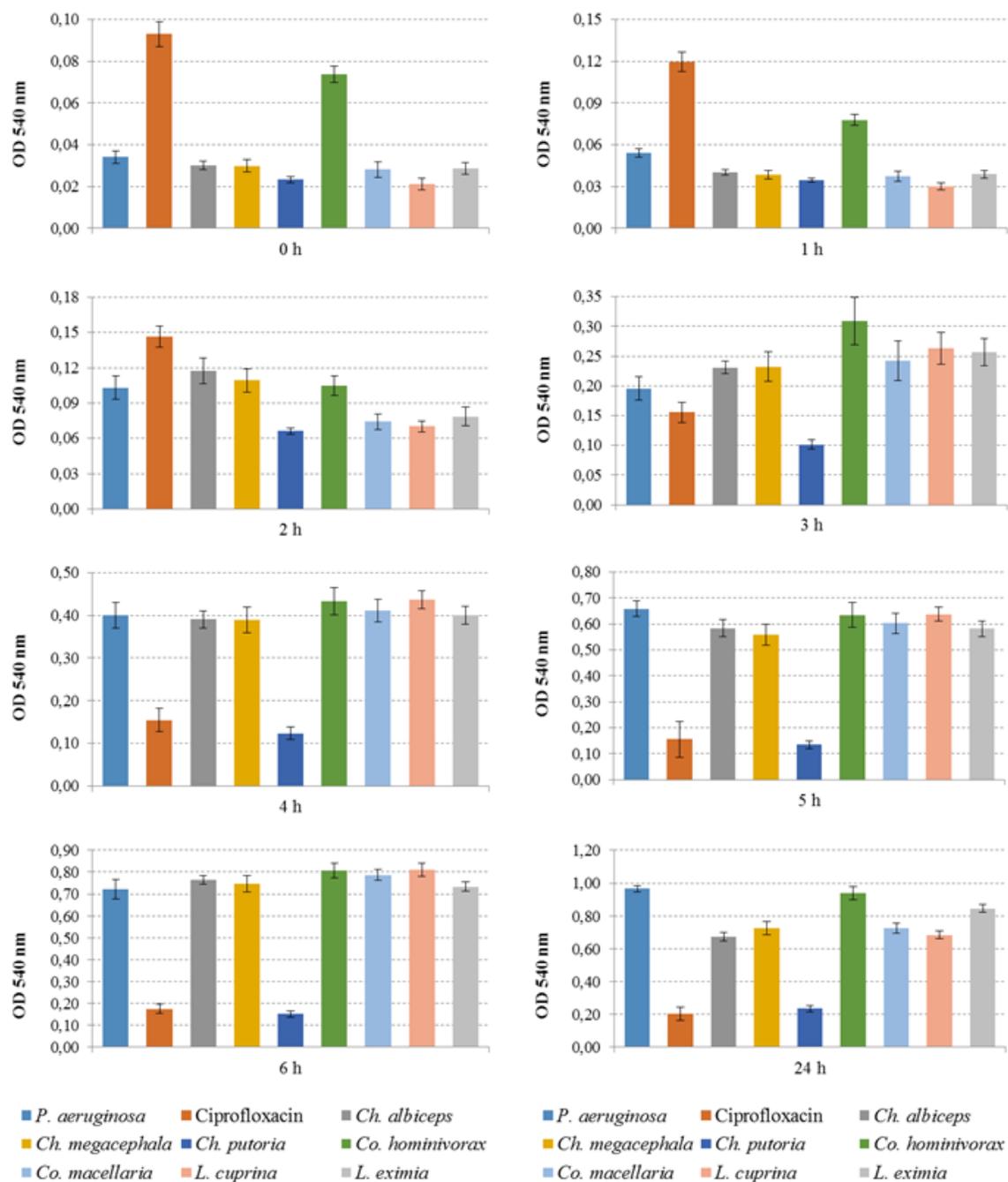
Los resultados obtenidos en este estudio revelaron que la concentración con 0,1 mg / ml de proteínas de las siete especies de Calliphoridae contra *Pseudomona aeruginosa*, la larva SE de *C. macellaria*, *Lucilia cuprina* y *L. eximia* mostraron actividad de inhibición durante un corto período de tiempo, como 0 h , 1h y 2h y 24h. En la misma concentración de proteínas *C. putoria* pudo reducir la población de *P. aeruginosa* desde las 2 h hasta las 24 h. Otras especies como el *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. macellaria*, *L. cuprina* no mostraron efecto bactericida significativo con *P. aureginosa* durante las primeras horas, pero después de 24 h mostraron un efecto de inhibición. Por otro lado, no hubo un efecto significativo con las larvas de ES de *C. hominivorax* en todos los tratamientos (Figura 1).

Con una concentración de 1 mg / ml de proteínas, *L. cuprina* mostró actividad inhibitoria a las 0 h, 1 h y 2 h. Por otro lado SE de *C. megacephala* y *C. putoria* mostraron actividad a las 4h, 5h, 6h y 24 horas. *Lucilia eximia* solo mostró actividad a las 4 h, 5 h y 6 h (Figura 2).

Efecto de las larvas ES contra S. aureus.

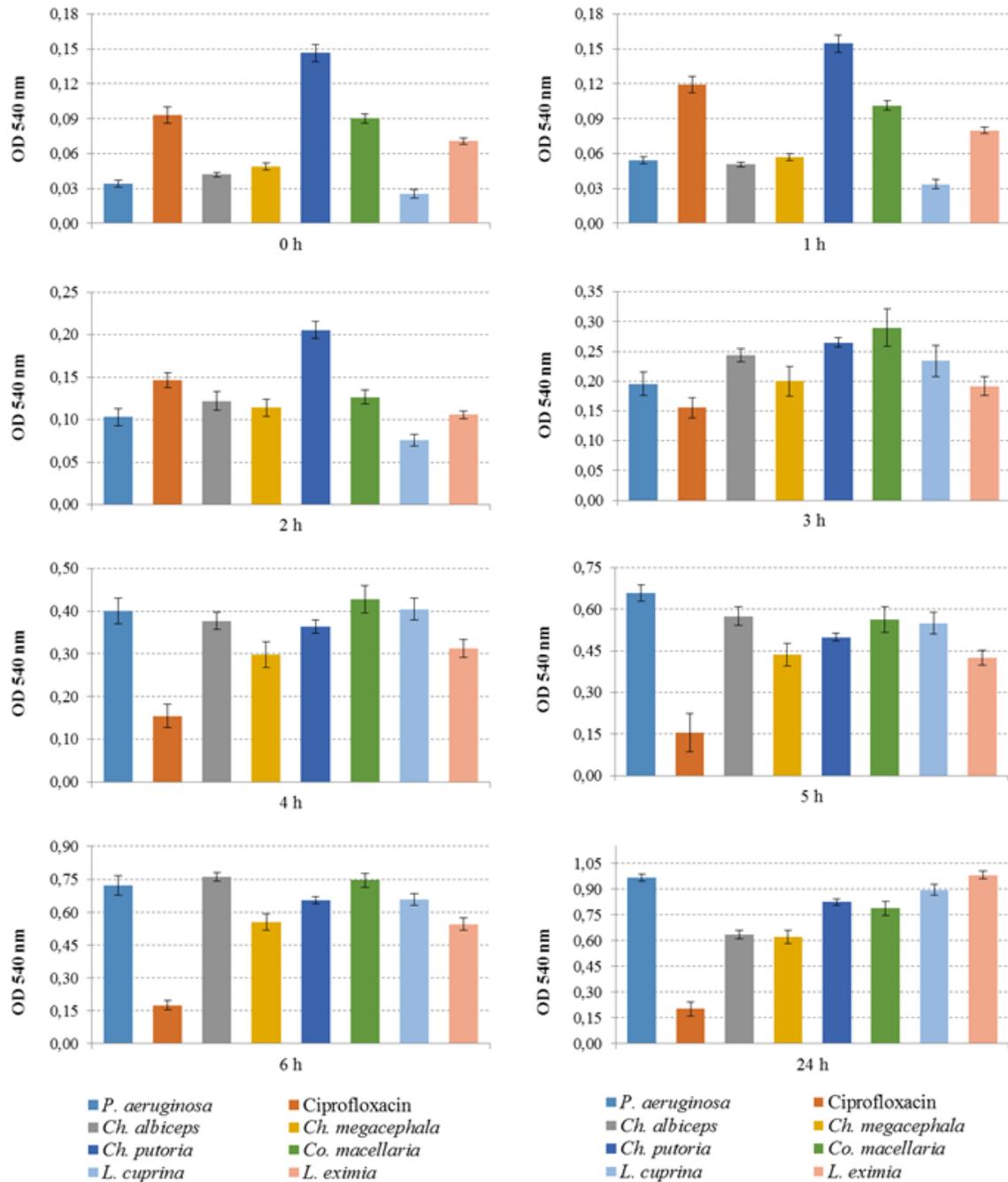
C. albiceps, *C. megacephala*, *C. putoria*, *C. macellaria*, *L. cuprina* y *L. eximia* mostraron una actividad disminuida significativa contra *S. aureus* desde las 3 h hasta las 24 h a una concentración de 0.1 µg / mL. Sin embargo, no se observó actividad antibacteriana en ninguna de las horas con *C. hominivorax* (Figura 3). Con una concentración de 1 mg / ml de proteínas, se observó que no había actividad antibacteriana de ninguna de las especies probadas en todos los tratamientos, donde *C. putoria* aumentó el cultivo de bacterias en todo el tiempo probado (Figura 4).

Figura 1 Actividad antibacteriana de larvas ES (con una concentración de 0,1 mg / ml de proteínas) de *Ch. albiceps*, *cap. megacephala*, *cap. Putoria*, *Co. hominivorax*, *Co. macellaria*, *L. cuprina* y *L. eximia* contra *P.aeruginosa* a las 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h y 24 h.



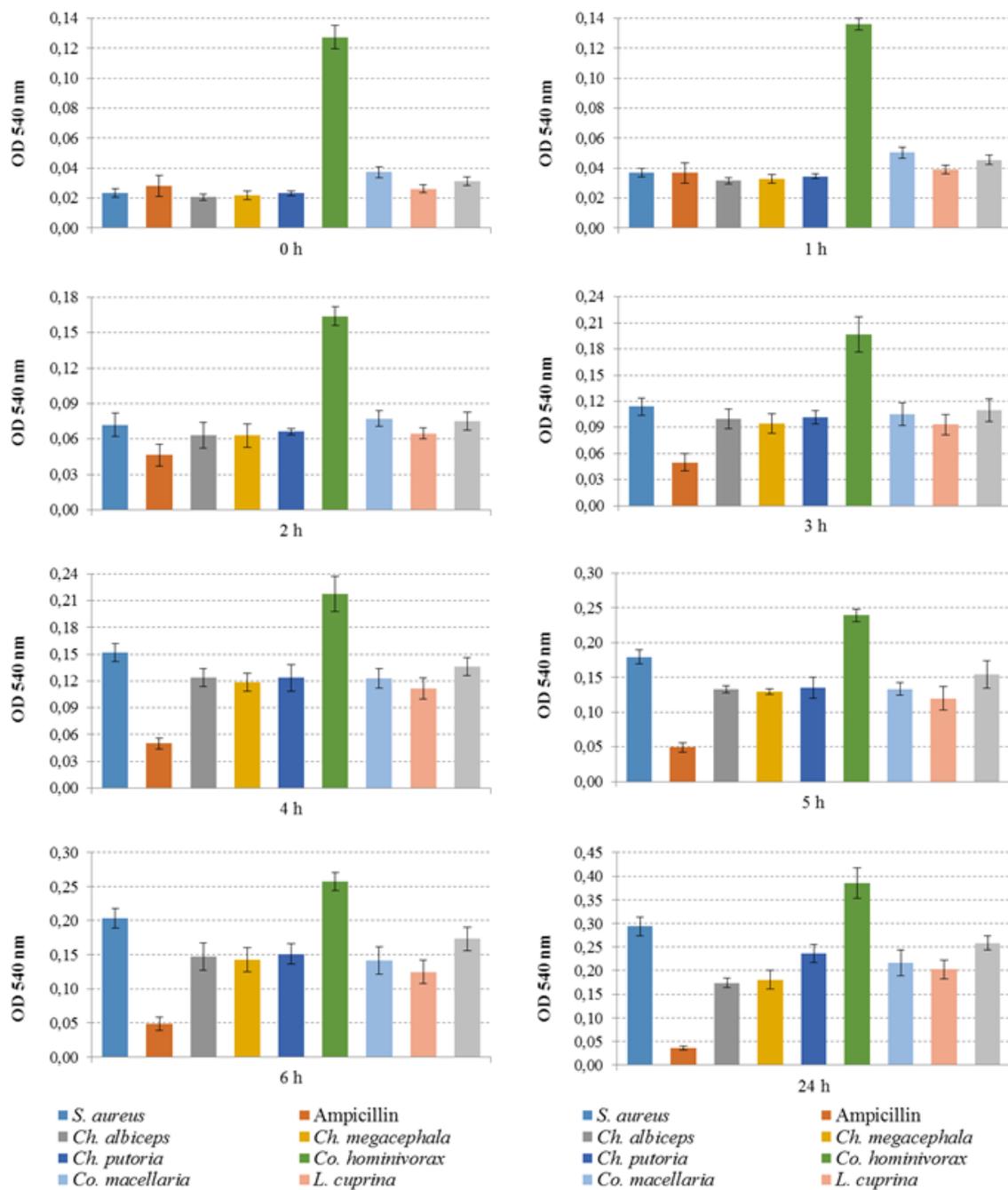
* Diferencia significativa cuando $p < 0.05$

Figura 2 Actividad antibacteriana de las larvas ES (con una concentración de proteínas de 1 mg / ml) de *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *C. macellaria*, *L. cuprina* y *L. eximia* contra *P.aeruginosa* a las 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h y 24 h.



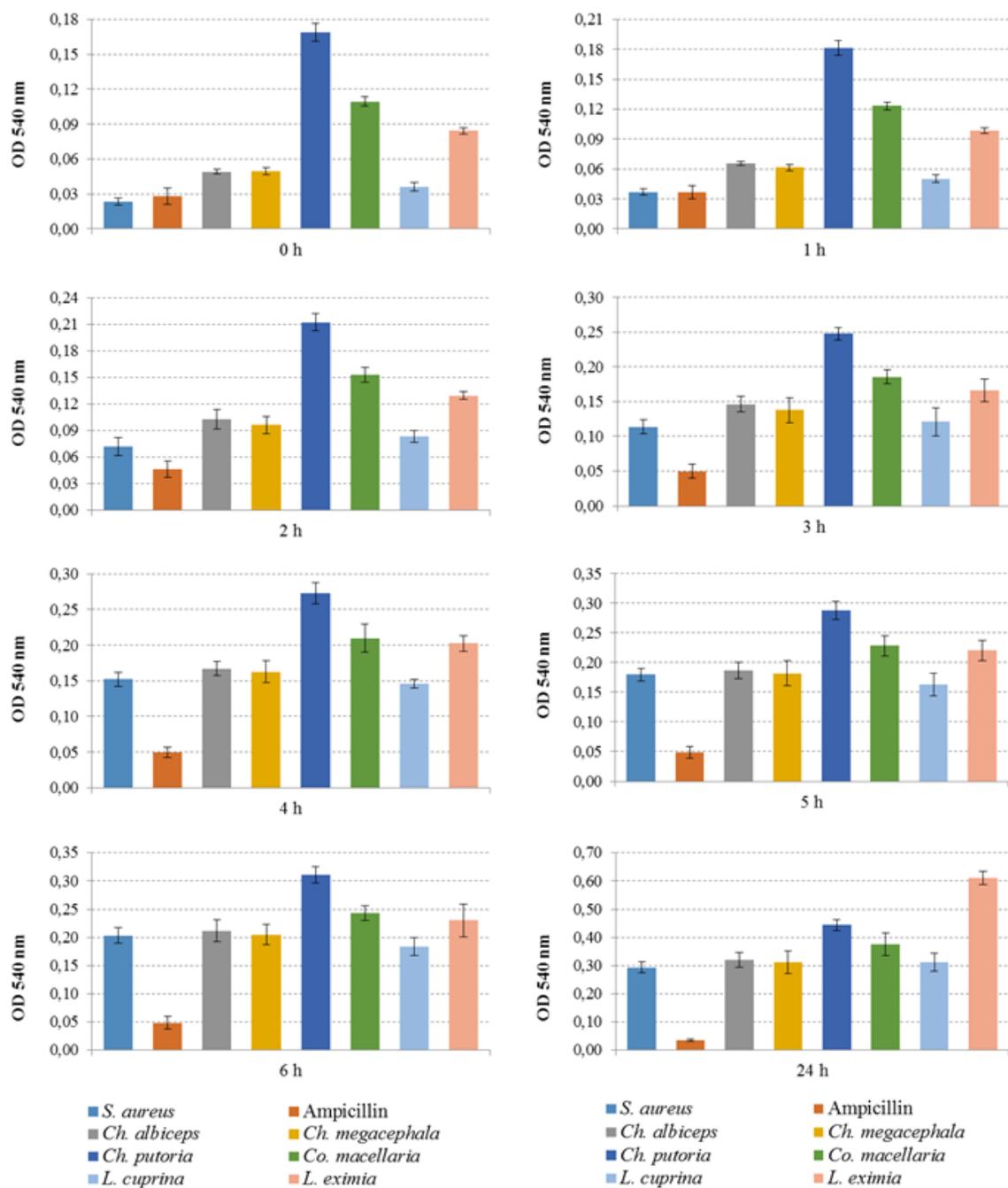
* Diferencia significativa cuando $p < 0.05$

Figura 3 Actividad antibacteriana de la larvas ES (con una concentración de 0,1 mg / ml de proteínas) de *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *C. hominivorax*, *C. macellaria* y *L. cuprina* contra *S. aureus* a las 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h y 24 h.



- Diferencia significativa cuando $p < 0.0$

Figura 4 Actividad antibacteriana de las larvas ES (con una concentración de 0,1 mg / ml de proteínas) de *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *C. macellaria*, *L. cuprina* y *L. eximia* contra *S. aureus* a las 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h y 24 h.



* Diferencia significativa cuando $p < 0.05$

DISCUSIÓN

La biodiversidad de los califóridos ha sido descrita como más de 1000 especies en todo el mundo (Byrd & Castner, 2010). Ha convencido a algunos investigadores para investigar los efectos de las larvas ES como un posible factor antibacteriano para inhibir las bacterias in vitro. Algunos han sido los factores que se han descrito que influyen en la potencia antibacteriana de las larvas ES, el número de larvas, las especies de bacterias, el entorno de las larvas (Barnes et al., 2010; Jaklic et al. 2008). Por ese motivo, en la presente evaluación de larvas, se analizaron ES de siete especies con dos concentraciones: 0.1 µg / mL y 1 µg / mL de proteína contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*, ambas bacterias de importancia médica debido a que están presentes en heridas y su tratamiento podrían retrasar su curación.

Las SE de larvas utilizadas en el presente estudio fueron de especies de moscas de importancia médica en Brasil que aunque no se utilizan para propósitos terapéuticos médicos, algunas de ellas se han reportado debido al potencial antimicrobiano (bactericida y bacteriostático) de SE larvales de bacterias resistentes a los antibióticos (Bexfield et al., 2004). Existen varios informes, como las SE de larvas de *Lucilia sericata*, que ha sido la mosca más estudiada de la familia Calliphoridae debido a los beneficios descritos con el uso de larvas para tratar heridas infectadas; varios informes se han descrito con beneficios de SE de larvas de diferentes bioensayos (Cazander et al. 2009b; van der Plas et al 2008; Jaklic et al 2008; Bexfield et al 2004).

Algunos informes han indicado que las larvas de *L. sericata* han mostrado inhibición contra *S. aureus* pero no contra *P. aeruginosa*. (Kawabata et al 2010; Kerridge et al 2005). Sin embargo. Barnes et al. (2010b) describieron que una concentración de 1 g / ml de *L. sericata* ES no era potencial para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, sin embargo, concentraciones de 3 g / ml y 4 g / ml presentaron inhibición contra *P. aeruginosa* en 4 H y *S. aureus* en más de 24 h. Jian et al. (2012) informaron que con solo 30 µg de la ES larvaria de *Lucilia sericata* pudo prevenir y degradar la biopelícula de *P. aeruginosa*. Los experimentos en nuestro laboratorio también describieron que con una concentración de proteína de 1 mg / ml de proteínas, *L. cuprina* mostró actividad inhibitoria a las 0 h, 1 h y 2 h. Por otro lado SE de *C. megacephala* y *C. putoria* mostraron actividad contra *P. aeruginosa* a las 4h, a las 5h, 6h y 24 horas. Por otro lado *Lucilia eximia* solo mostró actividad con la misma concentración de proteína a las 4h, 5h y 6 h.

Masiero y colaboradores (2017) han demostrado que, al igual que otras larvas de la familia Calliphoridae, las SE de *C. macellaria* poseen actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *P.*

aeruginosa. En coincidencia con este trabajo, en el presente estudio contra *P. aeruginosa* con SE de larvas de *C. macellaria*, *L. cuprina* y *L. eximia* con una concentración de proteína de 0.1 mg / mL mostraron actividad antimicrobiana en el período de tiempo de 0h, 1h, 2h y 24 h. En ese hecho, no mantuvieron la inhibición de las bacterias durante todos los períodos del experimento, pero podemos inferir que tienen un posible efecto antibacteriano, sin embargo sería necesario realizar más estudios con diferentes concentraciones proteicas de las SE de larvas para sus futuros efectos.

Los resultados se mostraron con las SE de larvas de *C. putoria* a una concentración de (0,1 mg / ml), pudo reducir la población de *P. aeruginosa* desde las 2 h hasta las 24 h, donde las SE mantuvieron una actividad antibacteriana constante. Sin embargo en las SE larvales con *C. megacephala*, Ratcliffe et al (2015) describieron que los factores antimicrobianos de *C. megacephala* son resistentes al calentamiento, congelación y digestión con tripsina. Los resultados actuales del efecto SE con 0.1 mg / mL con *C. megacephala*, no mostró una reducción significativa de *P. aeruginosa* durante las primeras horas, solo a las 24 h mostró un efecto de inhibición. Estos resultados respaldan los resultados obtenidos por Wang et al. (2018), quienes informaron que las larvas de *C. megacephala* alteraron la microbiota de estiércol, redujeron el riesgo de bacterias patógenas y mantuvieron la estabilidad y los cambios de microbiota, especialmente en *Pseudomonas*.

En el presente estudio, los resultados contra *S. aureus* con *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, a una concentración de 0,1 µg / ml, mostró una disminución de bacterias a las 3 h y continuó hasta las 24 h. Estos resultados respaldan el trabajo de Ratcliffe et al. (2015) quienes demostraron que las ES de larvas de *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps* y *Chrysomya putoria* tuvieron actividad contra *Staphylococcus aureus*, sus resultados mostraron que *Chrysomya megacephala* y *Chrysomya putoria* tuvieron actividad a las 6 h después de la incubación.

Este es el primer informe con larvas SE de *C. hominivorax* con 0.1 y 1 mg / mL de concentración de proteína contra *P. aeruginosa*, los resultados mostraron que SE no tuvo inhibición bacteriana. Esta mosca se seleccionó debido a que se reconoce que es una mosca importante que causa miasis en animales y humanos.

Los resultados de los experimentos actuales muestran que las diferentes concentraciones de proteínas (0.1 µg / mL y 1 µg / mL) pueden verse afectadas en la variación de los resultados y las especies de larvas. En el presente estudio, los factores antibacterianos como la concentración de

proteínas son alentadores para futuras investigaciones para encontrar nuevos antibióticos para tratar heridas necróticas.

CONCLUSIONES

El presente estudio podría representar una alternativa para tratar heridas necróticas donde las larvas no se pueden aplicar directamente a las heridas, pero se puede usar como ES extraído para reducir la infección. Es necesario continuar la cuantificación de las proteínas larvales SE con más especies de moscas calliphoridae y más bacterias. Este estudio se demostró que las SE larvas de algunas especies con concentraciones de 0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de proteínas mostraron ser un potencial contra los inhibidores de *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Estos factores podrían considerarse como antibióticos potencialmente nuevos en el futuro.

LITERATURA CITADA

- Arora, S., Sing, L.C., Baptista, C., 2010. Antibacterial activity of *Lucilia cuprina* maggot extracts and its extraction techniques. *Int J Integr Biol.* 9, 1, 43-48.
- Arora, S., Baptista, C., Lim, C.S., 2011. Maggot metabolites and their combinatory effects with antibiotic on *Staphylococcus aureus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 10,6, 1-8.
- Barnes, K.M., Gennard, D.E., Dixon, R.A., 2010. An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. *Bull Entomol Res.* 100, 635-640.
- Barnes, K. M., Dixon, R. A., & Gennard, D. E. 2010b. The antibacterial potency of the medicinal maggot, *Lucilia sericata* (Meigen): Variation in laboratory evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 82,3, 234–237.
- Bexfield, A., Nigam, Y., Thomas, S., Ratcliffe, N.A., 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, 14, 1297-1304.
- Bexfield, A., Bond, A.E., Roberts, E.C., et al., 2008. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes Infect.* 10, 4, 325-333.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7,72, 248-254.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L., Hoffmann, D. 1999, Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev Comp Immunol*, 23, 329-344.
- Byrd J, Castner JL. 2010. Insects of Forensic importance, in: *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, 2nd edition, J.H. Byrd and J.L. Castner (eds.),. Boca Raton: CRC Press. pp. 41–126

- Cazander, G., van Veen K.E., Bernards, A.T, Jukema, G.N, 2009. Do maggots have an influence on the bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of five different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata*. J Tissue Viability. 18, 80-87.
- Cazander, G., van Veen, K.E.B., Bouwman, L.H., Bernards, A.T., Jukema, G.N., 2009b. The influence of maggot excretions on PA01 biofilm formation on different biomaterials. Clin. Orthop. Relat. Res. 467, 536–545.
- Cazander, G., van de Veerdonk M.C., Vandebroucke-Grauls, C.M.J.E., Schreurs, M.W.J., Jukema, G.N., 2010. Maggot excretions inhibit biofilm formation on biomaterials. Clin Orthop Relat Res. 468, 2789-2796.
- Čeřovský, V., Slaninová, J., Fučík, V., Monincová, L., Bednářová, L., Malón, P., Štokrová, J., 2011. Lucifensin, a novel insect defensin of medicinal maggots: synthesis and structural study. ChemBioChem. 12, 1352-1361.
- Čeřovský, V., Bém, R., 2014. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: the story behind maggot therapy. Pharmaceuticals. 7, 251-264.
- Chambers, L., Woodrow, S., Brown, A.P. et al., 2003. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. Br J Dermatol. 148, 14-23.
- Díaz-Roa, A., Patarroyo, M.A., Bello, F.J., Silva Jr., P.I., 2018. Sarconesin: *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval excretions and secretions with antibacterial properties. Front Microbiol. 9, 2249.
- Dimarcq, J.L., Keppi, E., Dunbar, B., et al., 1988. Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipteracin A. Eur. J. Biochem. 171, 1-2, 17-22.
- Erdmann, G.R., Khalil, S.K., 1986. Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae). J Med Entomol. 23, 208-211.

- Figuerola, L., Uherek, F., Yusef, P., López, L., Flores, J., 2006. Experiencia de terapia larval en pacientes con úlceras crónicas. *Parasitol. Latinoam.* 61, 160-164.
- Fleischmann, W., Grassberger, M., Sherman, R., 2004. A handbook of maggots-assisted wound healing, New York.
- Greenberg, B., 1968. Model for destruction of bacteria in the midgut of blowfly maggots. *J Med Entomol.* 5, 31-38.
- Grella, M.D., Thyssen, P.J., 2011. Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil. http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil (accessed 07 September 2018)
- Gordya, N., Yakovlev, A., Kruglikova, A., Tulin, D., Potolitsina, E., Suborova, T., Bordo, D., Rosano, C., Chernysh, S., 2017. Natural antimicrobial peptide complexes in the fighting of antibiotic resistant biofilms: *Calliphora vicina* medicinal maggots. *PLoS One.* 12(3): 1-29
- Huberman, L., Gollop, N., Mumcuoglu, K.Y. et al., 2007. Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med. Vet. Entomol.* 21, 2, 127-131.
- Jaklic, D., Lapanje, A., Zupancic, K., Smrke, D., Gunde-Cimerman, N., 2008. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J Med Microbiol.* 57, 617-625.
- Jiang, K., Sun, X., Wang W., Liu, L., Cai, Y., Chen, Y., Luo, N., Yu J., Cai, D., Wang, A., 2012. Excretions/Secretions from Bacteria-Pretreated Maggot Are More Effective against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS One.* 7(11): 1-4
- Józefiak, A., Engberg, R.M., 2017. Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. *J. Anim. Feed Sci.* 26(2): 87-99
- Kawabata, T., Mitsui, H., Yokota, K. et al., 2010. Induction of antibacterial activity in larvae of the blowfly *Lucilia sericata* by an infected environment. *Med Vet Entomol.* 24, 375-381.
- Kerridge, A., Lappin-Scott, H., Stevens, J.R., 2005. Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol.* 19, 333-337.

- Kruglikova, A.A., Chernysh, S.I., 2011. Antimicrobial compounds from the excretions of surgical maggots, *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae). *Entomol Rev.* 91, 813-819.
- Lambert, J., Keppi, E., Dimarcq, J.L. et al., 1989. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bacteriocidal peptides. *PNAS.* 86, 262-266.
- Margolin, L., Gialanella, P., 2010. Assessment of the antimicrobial properties of maggots. *Int. Wound J.* 7, 3, 202-204.
- Masiero, F.S., Thyssen, P.J., 2016. Evaluation of conventional therapeutic methods versus maggot therapy in the evolution of healing of tegumental injuries in Wistar rats with and without diabetes mellitus. *Parasitol. Res.* 115, 6, 2403-2407.
- Masiero, F.S., Nassu, M.P., Soares, M.P., Thyssen, P.J., 2015. Histological patterns in healing chronic wounds using *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) larvae and other therapeutic measures. *Parasitol. Res.* 114, 8, 2865-2872.
- Masiero, F.S., Aquino, M.F.K., Nassu, M.P., Pereira, D.I.B., Leite, D.S., Thyssen, P.J., 2017. First Record of Larval Secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) Inhibiting the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Neotrop. Entomol.* 46, 1, 125-129.
- Masiero, F.S., Silva, D.G., Luchese, M., Estércio, T., Pérsio, N.V., Thyssen, P.J., 2019. In vitro evaluation of the association of medicinal larvae (Insecta, Diptera, Calliphoridae) and topical agents conventionally used for the treatment of wounds. *Acta Tropica.* 190, 68-72.
- Moretti, T.C., Thyssen, P.J., Solis, D.R., 2009. Breeding of the Scuttle Fly *Megaselia scalaris* in a fish Carcass and Implications for the use in Forensic Entomology (Diptera: Phoridae). *Entomol. Gen.* 31, 349-353.
- NCCLS, 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard. 6th ed. USA, Pennsylvania.
- Nordstrom, A., Hansson, C., Karlstrom, L., 2009. Larval therapy as a palliative treatment for severe arteriosclerotic gangrene on the feet. *Clin. Exp. Dermatol.* 34, 683-685.

- Nassu, M.P., Thyssen, P.J., 2015. Evaluation of larval density *Cochliomyia macellaria* F. (Diptera: Calliphoridae) for therapeutic use in the recovery of tegumentar injuries. *Parasitol. Res.* 114, 9;3255-3260.
- Pinheiro, M.A.R.Q., Ferraz, J.B., Junior, M.A.A., Moura, A.D., et al., 2015. Use of maggot therapy for treating a diabetic foot ulcer colonized by multidrug resistant bacteria in Brazil. *Indian. J. Med. Res.* 141, 340-342.
- Prete, P.E., 1997. Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sci.* 60, 505-510.
- R Core Team, 2017. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna <https://www.R-project.org/>
- Ratcliffe, N.A., Vieira, C.S., Mendonça, P.M., Caetano, R.L., Queiroz, M.M.C., Garcia, E.S., Mello, C.B., Azambuja, P., 2015. Detection and preliminary physico-chemical properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil. *Acta Trop.* 147, 6-11.
- Robinson, W., Baker, F.L., 1939. The enzyme urease and occurrence of ammonia in maggot infected wounds. *J. Parasitol.* 25, 2, 149-155.
- Sen, C.K., Gordillo, G.M., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T.K., Gottrup, F., Gurtner, G.C., Longaker, M.T., 2009. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound. Repair. Regen.* 17, 6, 763-771.
- Shazely, B., Veverka, V., Fucik, V., Voburka, Z., Zdárek, J., Cerovský, V., 2013. Lucifensin II, a defensin of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol.* 50(3): 571-578
- Sherman, R.A., Hall, M.J., Thomas, S., 2000. Medicinal maggots: An ancient remedy for some contemporary afflictions. *Ann. Rev. Entomol.* 45, 55-81.
- Smith, A.G., Powis, R.A., Pritchard, D.I., Britland, S.T., 2006. Greenbottle (*Lucilia sericata*) larval secretions delivered from a prototype hydrogel wound dressing accelerate the closure of model wounds. *Biotechnol. Prog.* 22, 1690-1696.

- Simmons, S., 1935. A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which destroys important etiological agents of pyogenic infections. *J Bacteriol.* 30, 253-267.
- Teh, C.H., Nazni, W.A., Nurulhusna, A.H., Norazah, A., Lee, H.L., 2017. Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. *BMC Microbiol.* 17, 36-43.
- Téllez, G.A., Acero, M.A., Pineda, L.A., Castaño, J.C., 2012. Larvaterapia aplicada a heridas con poca carga de tejido necrótico y caracterización enzimática de la excreción, secreción y hemolinfa de larvas. *Rev. Biomédica.* 32, 3, 312-320.
- Thomas, S., Andrews, A.M., Hay, N.P., Bourgoise, S., 1999. The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *J Tissue Viability.* 9, 127-132.
- Van Der Plas, M., Baldry, M., Van Dissel, J., Jukema, G., Nibbering, P., 2009. Maggot secretions suppress pro-inflammatory responses of human monocytes through elevation of cyclic AMP. *Diabetol.* 52, 9, 1962-1970.
- Van der Plas, M.J.A., Jukema, G.N., Wai, S.-W., Dogterom-Ballering, H.C.M., Lagendijk, E.L., van Gulpen, C., van Dissel, J.T., Bloemberg, G.V., Nibbering, P.H., 2008. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemoth.* 61, 117–122.
- Wang, S., Wang, J., Lv, D., Diao, Y., Zhang, Z., 2010. Clinical research on the bio-debridement effect of maggot therapy for treatment of chronically infected lesions. *Orthopaedic. Surg.* 2, 3, 201-206.
- Wang, X., Wang, W., Gao, Q., Wang, X., Lei, C., Zhu, F. 2018. *Chrysomya megacephala* larvae feeding favourably influences manure microbiome, heavy metal stability and greenhouse gas emissions. *Microbial Biotechnology*, 11,3, 498–509.
- Wolff-Echeverri, M.I., Álvarez, C.R., Higueta, S.E.H., Wolff-Idárraga, J.C., Franco, M.M.E., 2010. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), una nueva alternativa para la terapia larval y reporte de casos en Colombia. *Iatreia.* 23, 2, 107-116.

CAPITULO III

Larvaterapia como un complemento eficiente y altamente eficaz en el desbridamiento de Gangrena de Fournier

Maggot Therapy as an Efficient and Highly Effective Adjunct in Treating Fournier's Gangrene

RESUMEN

La gangrena de Fournier es una fascitis necrotizante fulminante del perineo y los genitales. El tratamiento estándar implica la extirpación inmediata de todo el tejido necrótico, la cobertura agresiva de antibióticos y la atención médica de apoyo. Aún así, la infección suele ser mortal y cuando no es mortal, a menudo es necesaria una extensa reconstrucción anatómica. El tratamiento de heridas con larvas de moscas silvestres desinfectadas vivas (Diptera: Calliphoridae) ha demostrado ser altamente efectivo, con múltiples estudios que demuestran el desbridamiento, la desinfección y / o la promoción de tejido de granulación. El objetivo de este estudio fue probar la hipótesis de que el uso complementario de larvas podría disminuir la cantidad de tratamientos quirúrgicos necesarios para tratar la gangrena de Fournier. A los sujetos se les proporcionó una escisión quirúrgica inicial, seguida de desbridamiento utilizando solo larvas de *Lucilia sericata* (Meigen). Dos hombres diabéticos se inscribieron en este estudio. Los aislados microbianos incluyeron *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, y los antibióticos se seleccionaron en consecuencia. Los tratamientos con larvas fueron seguidos rápidamente por la desaparición del tejido necrótico, el control de la infección y el crecimiento del tejido de granulación. Un paciente requirió tres ciclos de tratamiento de 48 horas, 8 ciclos por el otro, cada uno con 10 larvas / cm² de superficie de la herida. Ambos pacientes sobrevivieron sin necesidad de reconstrucción anatómica. La terapia con larvas disminuyó el número de procedimientos quirúrgicos que de otro modo habrían sido necesarios y dio lugar a resultados muy favorables. Aunque es pequeño, este estudio debería inspirar a otras instituciones a considerar la terapia con larvas como una terapia complementaria para infecciones de tejidos profundos como la fascitis necrotizante, o bien cuestionar nuestros hallazgos con un ensayo clínico controlado.

Palabras clave: *Lucilia sericata*, bioterapia, larvaterapia, fascitis necrosante, Calliphoridae.

ABSTRACT

Fournier's Gangrene is a fulminating necrotizing fasciitis of the perineum and genitalia. Standard treatment involves immediate excision of all necrotic tissue, aggressive antibiotic coverage, and supportive medical care. Still, the infection is commonly fatal, and when not fatal, extensive anatomical reconstruction is often necessary. Wound treatment with live disinfected blowfly larvae (Diptera: Calliphoridae) has been shown to be highly effective, with multiple studies demonstrating debridement, disinfection and/or promotion of granulation tissue. This study aimed to test the hypothesis that adjunctive use of maggots could decrease the number of surgical treatments required to treat Fournier's Gangrene. Subjects were provided with one initial surgical excision, followed by debridement using only *Lucilia sericata* (Meigen) maggots. Two diabetic men enrolled in this study. Microbial isolates included *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, and antibiotics were selected accordingly. Maggot treatments were rapidly followed by the disappearance of necrotic tissue, control of infection and growth of granulation tissue. Three 48-hour cycles of treatment were required by one patient, 8 cycles by the other, each with 10 larvae/cm² of wound surface area. Both patients survived without requiring anatomical reconstruction. Larval therapy decreased the number of surgical procedures that would have otherwise been necessary, and led to very favorable outcomes. Though small, this study should inspire other institutions either to consider maggot therapy as an adjunct therapy for deep tissue infections like necrotizing fasciitis or else challenge our findings with a controlled clinical trial.

Keywords: *Lucilia sericata*; biotherapy; maggot therapy; necrotizing fasciitis, Fournier's Gangrene.

INTRODUCCIÓN

La gangrena de Fournier es una fascitis necrotizante fulminante que se desarrolla principalmente en el perineo y los genitales. Puede extenderse hasta afectar la región inguinal, los muslos e incluso la pared abdominal. Esta condición potencialmente mortal es causada frecuentemente por una infección polimicrobiana sinérgica (Erol et al, 2010; Lujan et al, 2010; Corcoran et al, 2008; Morpurgo et al, 2002; Laucks, 1994; Clayton et al, 1990). Los factores predisponentes más comunes son la edad, la diabetes, la desnutrición y otras formas de inmunosupresión (Moslemi et al, 2009; Eke, 2000). El diagnóstico temprano es esencial porque la infección progresa rápidamente, lo que lleva a un fallo multiorgánico y la muerte en 30 a 50% de los casos, o incluso más (Aridogan et al, 2012; Laor et al, 1995; Spirnak et al, 1984; Kasier & Cerra, 1981). El tratamiento inicial consiste en antibióticos de amplio espectro y resección quirúrgica agresiva del tejido necrótico (Eke, 2000; Laor y otros, 1985; Spirnak y otros, 1984). De hecho, la infección, y por lo tanto la resección, puede ser tan agresiva que a menudo se requiere una reconstrucción anatómica extensa después de controlar la infección y desbridar el tejido necrótico (Eke, 2000). Por razones que aún no se comprenden bien, la gangrena de Fournier afecta a los varones con mucha mayor frecuencia que a las mujeres (Eke, 2000; Spirnak et al, 1984).

La Larvaterapia (LT) es el uso de larvas desinfectadas de moscas *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) para tratar heridas problemáticas en humanos y animales (Tantawi et al, 2010; Paul et al, 2009; Sherman, 2009; Sherman, 2002; Sherman et al, 2000). Las larvas han demostrado ser un método de desbridamiento altamente efectivo y rápido. Las cuales tienen tres acciones principales dentro de las heridas: desbridamiento, desinfección y estimulación del crecimiento de tejido sano (Sherman, 2014; Mumcuoglu et al., 1998). Las larvas desinfectan las heridas al secretar y excretar sustancias que licúan el tejido necrótico, por lo tanto, la terapia con larvas elimina solo el tejido necrótico sin afectar el tejido viable. Esta característica es particularmente valiosa en el tratamiento de afecciones como la gangrena de Fournier, en la que la fascitis necrotizante penetra profundamente en los espacios que contienen estructuras vitales: nervios, venas y arterias. En el tratamiento de la gangrena de Fournier, uno de los mayores problemas a los que se enfrentan los cirujanos es la dificultad de extirpar todo el tejido infectado muerto sin dañar el tejido cercano que todavía es viable. Además, las larvas también tienen la capacidad de acceder a los pequeños espacios profundos dentro de la herida, que los cirujanos no pueden visualizar fácilmente (Wollina et al, 2000; Mumcuoglu et al, 1998).

La Larvaterapia es utilizada más comúnmente en heridas como úlceras por presión (Sherman, 2002b; Sherman et al, 1995;), úlceras del pie diabético (Sherman 2003; Mumcuoglu et al, 1998), úlceras venosas (Dumville et al, 2009; Wayman et al , 2000;). Dada su capacidad para disolver rápidamente el tejido necrótico sin dañar el tejido viable cercano, la terapia con gusanos se ha utilizado ocasionalmente para tratar la gangrena de Fournier y otras formas de fascitis necrotizante (Steenvoorde y otros, 2007; Dunn y otros, 2002; Teich y Myers, 1986) . Pero la escasa literatura sugiere que la terapia con gusanos rara vez se use para tales heridas. Además, cuando se usa, generalmente se usa como un procedimiento de rescate, después de que todo lo demás haya fallado. En tales circunstancias, incluso cuando es efectivo, se ha perdido tanto tiempo y tejido que los resultados pueden ser bastante deficientes (Teich y Myers, 1986). Steenvoorde y sus colegas (2007) sugirieron que la terapia con gusanos, si se usa antes en el curso del tratamiento, podría ser capaz de minimizar la cantidad y el alcance de los desbridamientos quirúrgicos. Este estudio prospectivo se llevó a cabo para probar esa hipótesis proporcionando a cada sujeto solo una escisión quirúrgica. A partir de entonces, la terapia con gusanos fue la única forma de desbridamiento disponible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Criterios de inclusión de pacientes

Los pacientes fueron diagnosticados con gangrena de Fournier por el equipo multidisciplinario de médicos especialistas en el Hospital San José, Oaxaca, México donde aceptaron el tratamiento con larvas y proporcionaron un consentimiento informado por escrito. El comité de revisión institucional aprobó el estudio y el formulario de consentimiento como conformes a la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

Crianza de moscas y obtención de larvas

Las moscas de *L. sericata* (Diptera: Calliphoridae) se criaron en jaulas de plástico de 30 cm³ en condiciones de laboratorio (27° C, 60% de humedad relativa, 12 h de luz: 12 h de oscuridad). Aproximadamente 200-300 moscas adultas se mantuvieron con agua ad libitum, sacarosa granulada y 50 g de hígado de res (SUKSA; Oaxaca, México). Los huevos se colectaron colocando 50 g de hígado de res en las jaulas y fueron retirados dos horas más tarde. Los huevos fueron desinfectados de acuerdo con el método descrito por Figueroa et al. (2007) e incubados a 27

° C durante 24 horas antes de su aplicación, durante el cual se realizaron cultivos de control de calidad para demostrar que las larvas ahora estaban libres de gérmenes.

Aplicación de larvas

Las larvas desinfectadas se aplicaron de manera similar al descrito por Angel et al. (2000). La piel alrededor de la herida se limpió y se secó, a lo largo del margen de la herida formando un borde protector a la misma se le aplicaron tiras adhesivas de 1 x 6 cm (Hypafix; Charlotte, NC, EE. UU.). Este borde protector protegió la piel de las secreciones / excreciones de las larvas y ayudó a la adhesión del apósito superior de la jaula. Se colocó una dosis de aproximadamente 10 larvas por cm² en el lecho de la herida y las larvas fueron cubiertas con una malla de poliéster fina estéril la cual fue adherida con cinta adhesiva al borde como protector de Hypafix colocada anteriormente (ver Figuras 1 y 2). Después de sellar el apósito jaula, se colocaron varias almohadillas de gasa en la parte superior para absorber el exudado que eventualmente se drenaría de la herida.

Las almohadillas de gasa se cambiaron periódicamente, para evitar la asfixia o el ahogamiento de las larvas, así mismo para evitar la maceración de la piel. El apósito jaula fue supervisado cada 4 a 8 horas para verificar la viabilidad de las larvas y asegurarse de que no hubiera fugas. Las larvas se retiraron del apósito jaula con enjuagues de solución salina o agua limpia, las larvas fueron selladas en bolsas y colocadas de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos R.P.B.I. para su eliminación. Entre cada ciclo de 48 horas c/u las heridas se lavaron con solución fisiológica.

RESULTADOS

Los dos pacientes inscritos en este ensayo clínico prospectivo. Cada uno recibió solo un desbridamiento quirúrgico inmediato, junto con una terapia con antibióticos dirigida de acuerdo con los resultados del cultivo microbiano. A partir de entonces, recibieron desbridamiento con Larvaterapia, sin tener más desbridamientos quirúrgicos. Ninguno de los sujetos se retiró del estudio; ninguno de los sujetos requirió posterior desbridamiento quirúrgico ni cirugía reconstructiva; ninguno de los pacientes tuvo lo que podría considerarse un mal resultado.

Caso 1

El paciente # 1 fue un hombre hemipléjico de 59 años, originario de Oaxaca de Juárez, México. Presentó diabetes mellitus no dependiente de insulina durante 30 años, hipertensión durante 5 años e insuficiencia renal que requería diálisis peritoneal durante los 3 años anteriores. Se presentó con necrosis del escroto con un tiempo de evolución de 15 días. La herida era fétida y exudativa. Se realizó el diagnóstico de gangrena de Fournier y el paciente se sometió a un desbridamiento quirúrgico agresivo con cobertura de antibióticos. Cultivos microbiológicos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, por los cuales recibió metronidazol y cefotaxina. Debido a la sepsis persistente, al avance de la necrosis y al deseo de preservar la mayor cantidad posible de tejido viable, se le ofreció y aceptó la oportunidad de aceptar ser candidato en este estudio.

Sus heridas fueron tratadas con tres ciclos de 48 horas de larvaterapia, cada aplicación contenía alrededor de 300 larvas desinfectadas. Después del primer ciclo, hubo una disminución notable en el exudado y el olor, y comenzó a aparecer tejido de granulación a lo largo de la base. Al final del tercer ciclo, la herida se cubrió principalmente con tejido de granulación sano y luego se trató con una gasa impregnada de miel. Cinco días después, la herida se injertó con éxito (Figura 1) y el paciente fue dado de alta después de un total de solo 20 días.

Caso 2

El paciente # 2 fue un hombre de 32 años, originario de Oaxaca, México, a quien recientemente se le había diagnosticado diabetes mellitus. Era sintomático (polidipsia, polifagia), pero aún no había comenzado la terapia con medicamentos. Su historial también fue notable por fumar cigarrillos, alcoholismo, mielomeningocele, transfusión de sangre previa y alergia a la lactosa, pero ningún trauma reciente.

Se presentó a urgencias quejándose de 11 días de dolor perianal, enrojecimiento y fiebre. Tras el examen, se descubrió que era taquicárdico y taquipínico, con edema perianal y una úlcera central que drenaba material fétido y purulento. La hiperemia se extendió bilateralmente al nivel inguinal y la necrosis tisular se extendió al flanco derecho. Estaba deshidratado, con leucocitosis y una glucosa superior a 500 mg / dl. Los cultivos de la heridas presentaron *Escherichia coli* y *Candida albicans*. El tratamiento inicial incluyó rehidratación, corrección metabólica, antibióticos de amplio espectro (inicialmente vancomicina, imipenem y metronidazol; luego se redujo a levofloxacina y metronidazol) y resección quirúrgica completa.

El estado metabólico y fluido del paciente se estabilizó, pero se necesitó un mayor desbridamiento. Después de aceptar participar en este estudio, recibió un total de 8 ciclos de desbridamiento con Larvaterapia (aproximadamente 500 larvas por cada tratamiento). Después del ciclo final de LT , los cultivos de la herida no presentaron microorganismos, no quedó tejido necrótico y la base de la herida se cubrió con tejido de granulación. Posterior a la LT la herida fue continuada con una gasa impregnada con miel durante 10 días más. Finalmente, se suturó la herida y la estancia hospitalaria total fue de 52 días (Figura 2).



Fig. 1. Primer caso de gangrena de Fournier a) inicio de larvaterapia, b) trampa de larvas, c) y d) durante el tratamiento de larvas, e) posterior al tratamiento de larvas y f) dos meses después del tratamiento.



Fig. 2. Segundo caso de gangrena de Fournier a) Paciente diagnosticado con G.F. b) Primer biodesbridamiento c) Durante la larvaterapia d) y e) posterior al tratamiento de larvas, f) Sutura del paciente.

DISCUSIÓN

Ventajas

La gangrena de Fournier es una emergencia médico-quirúrgica. La infección puede propagarse en cuestión de horas y conlleva a una tasa de mortalidad muy alta. El estándar de atención, por lo tanto, es la el desbridamiento agresivo del tejido infectado (cirugía), el control de la infección (antibióticos) y el soporte vital intensivo (atención médica intensiva).

Muchos especialistas recurren a la terapia con larvas como "último recurso", solo después de que todo lo demás haya fallado. Si bien la terapia con larvas a menudo funciona en esa etapa tardía, el retrasar el tratamiento no es la mejor estrategia porque se puede perder mucho tiempo y el tejido sano puede ser afectado. En cambio, en el presente reporte de casos consideramos las ventajas y desventajas de la LT al inicio del proceso de la toma de decisión en el manejo de los pacientes diagnosticados con GF, tal como lo hicimos con todas nuestras otras opciones. Seleccionamos la LT debido a que sus ventajas superaron sus riesgos, y el balance incluso superó las ventajas y riesgos de algunas de las otras opciones de tratamiento. Ya que las larvas de mosca *Lucilia sericata* no solo podrían desbridar la herida y tratar la infección de manera rápida y completa (al ingresar a todas las cavidades dentro de la herida), sino que podrían hacerlo sin destruir ninguna de las estructuras vitales no afectadas que estaban en peligro con la gangrena. En el presente reporte de casos utilizamos la LT en combinación con otros tratamientos, en lugar de una alternativa o último recurso. Esta es una de las características que distingue nuestros casos de los informes anteriores del uso de LT para la Gangrena de Fournier (Teich y Myers, 1986), y es probablemente el factor que explica nuestros resultados mucho mejor. En el presente caso, se reporta el uso de LT donde es más preciso y específico que el desbridamiento quirúrgico tratando de que el tejido viable permanezca intacto.

Algunos reportes muestran la importancia del uso de larvas, tal es el descrito por Steenvoorde et al (2007) donde reportaron que el uso de LT parece ser una indicación ideal para tratar la fascitis necrotizante. Ya que se tiene una tasa de mortalidad alta con diagnóstico de gangrena de Fournier si los pacientes no reciben un desbridamiento quirúrgico agresivo, en el presente estudio, ambos pacientes recibieron un desbridamiento quirúrgico como tratamiento inicial y fue continuado con la LT. Actualmente, hay muchos informes sobre el uso de la terapia con larvas en heridas infectadas; sin embargo, nuestros casos apoyaron el caso descrito por Angel y colaboradores (2000) quienes informaron el uso de la LT en un caso con gangrena de Fournier,

describieron que el uso de larvas reduce el número de desbridamientos quirúrgicos, el uso de antibióticos y la estancia hospitalaria. En nuestro estudio, el uso de LT redujo el número de desbridamientos quirúrgicos debido a que solo se llevo uno al inicio del tratamiento, fue más rápido que los apósitos convencionales debido a que las larvas tienen la capacidad de acceder a pequeños espacios profundos dentro la herida. Además el uso de LT disminuyó el edema y el olor de ambos pacientes, los dos pacientes conservaron las bolsas escrotales y el escroto no se reseco. Las dermofaciectomías tuvieron drenaje en los sitios de declive por drenaje por gravedad.

El presente trabajo apoya informes anteriores del uso de terapia larval para tratar la fascitis necrotizante y la reducción de la pérdida de sangre (Steen Voorde et al 2007; Teich y Meyers, 1986). En cuanto al número de larvas empleadas en los casos reportados, reportes previos describieron que el número de larvas dependerá del tamaño de la lesión y del número de ciclos de evolución del paciente, Mumcuoglu et al. (1998) describieron que el número de larvas varía de acuerdo con la profundidad de la lesión, variando de 50 a 1000 larvas en ciclos de 24 a 48 horas. En nuestros casos reportados se aplicaron como promedio 300 y 500 larvas con movimiento libre para cada caso, todo esto dependió de la magnitud del tamaño de cada herida en ciclos de 48 h esto tuvo como ventaja de que las larvas pudieran moverse libremente y llegar a cavidades difíciles para un desbridamiento quirúrgico a diferencia del descrito por Steen Voorde et al, (2007) que demostraron un promedio de 45 (rango de 9-100 bolsas) de LT en contenedores (biobags) por paciente y un promedio de 17 días (rango de 3-38 días) en fascitis necrotizante, donde pudo reducirse el número de desbridamientos quirúrgicos, en este último a diferencia del reportado por nuestro equipo, las larvas tienen limitación en su movimiento por el uso de los biobags, sin embargo a diferencia del movimiento libre el biobag puede mantener a las larvas dentro de la herida sin tener alguna fuga. Steen Voorde y Jukema (2004) informaron un promedio de 27 días de ciclos larvales. La estancia hospitalaria de los dos pacientes tratados con LT descritos en el presente trabajo fue un total de 20 días en el primer caso y 52 días con el segundo caso.

El uso de larvas ha demostrado ser un método eficaz en el tratamiento de heridas gram positivas (Steen Voorde et al, 2007; Steen Voorde & Jukema, 2004), en los casos presentados en el presente trabajo mostraron la presencia de bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, donde el uso de larvas *Lucilia sericata* en ambos casos dio resultados favorables de desbridamiento y tejido de granulación (Figura 1, 2). Cakmac et al, (2008) describieron a *Escherichia coli* como el microorganismo más común aislado en los casos de gangrena de Fournier tanto en hombres como en mujeres. Sin embargo, en los pacientes con presencia de *Candida albicans* se han descrito como

un microorganismo primario en pacientes con gangrena de Fournier, aunque pueden ser mortales (Temiz et al., 2008). En nuestro informe de casos, se encontraron colonias de heridas de *Escherichia coli* en ambos, sin embargo, en el primer caso se presentó *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* en el segundo caso. Podemos determinar que el uso de larvas en presencia de estos microorganismos mostro inhibición bacteriana, considerándola como una alternativa en el tratamiento de ellas.

Esta serie de casos respalda el informe de casos reportados por Felder et al. (2012) con el uso de un nuevo apósito diseñado en base a componentes modificados de un sistema de terapia de heridas por presión negativa de aplicación de LT en un caso de gangrena de Fournier, sin embargo en el presente caso las larvas se aplicaron directamente sin terapia de presión negativa, donde podemos describimos que el uso de larvas directamente en la herida es también benéfica en el tratamiento de gangrenas de Fournier.

Desventajas

Los informes previos de casos con fascitis necrotizante describieron un exitoso desbridamiento utilizando LT en gangrena de Fournier, aplicando las larvas en biobags (Steenvoorde et al. 2007; Preuss et al. 2004). A diferencia de este trabajo de los resultados obtenidos con el uso de biobags, y acorde al estudio de Dunn et al, (2002) que describió la dificultad de retener los gusanos en la herida en una fascitis necrotizante, en los dos casos descritos en el presente trabajo tuvieron buen resultado con las larvas de forma libre, sin embargo existen algunas desventajas como la dificultad para colocar las larvas en hacer el apósito jaula debido a la zona de la herida, ya que las larvas pueden escapar si las tiras adhesivas no están bien adheridas con la tela organza que cubre la herida, además de poder causar dermatitis en la piel sana si no se controla la humedad dentro de la herida.

Otro factor complicado en los casos reportados fue la dificultad para retirar las larvas entre cada ciclos, debido a que la ubicación de la herida y los problemas para controlar la defecación del paciente. El uso de LT no redujo el uso de antibióticos, por ese motivo y de acuerdo con el estudio de Steenvoorde et al (2007) se describió que es necesario una combinación de antibióticos de amplio espectro con desbridamiento quirúrgico después de diagnosticar una fascitis necrotizante. Además los pacientes en el ambos casos manifestaron dolor durante el tratamiento larval y fueron trataron con analgésicos ketorolaco 30 mg via intra venosa i.v. y dramadol en infusión 100 mg en una solución fisiológica de 100 cc durante 24 horas, que coincide con lo informado con Mumcuoglu

(2001) que describió que aproximadamente del 20 al 25% de los pacientes tratados con larvas manifiestan dolor.

Recomendaciones

Para garantizar los mejores resultados para los pacientes, es importante que las enfermeras y/o personal de atención médica tengan conocimiento de cómo colocar el aposito jaula, la manipulación de los gusanos, monitorear constantemente al paciente durante el tratamiento, para evitar que las larvas se escapen. El vendaje de gusanos evita mojarse para evitar que las larvas escapen. Los resultados en ambos pacientes fueron favorables, ya que los microorganismos MDT ya no estaban presentes en la herida después del MDT. En ambos casos, se demostró que el uso de MDT redujo el número de desbridamientos quirúrgicos necesarios para el tratamiento de la gangrena de Fournier. En los países en desarrollo, esta terapia es una excelente alternativa para los pacientes con recursos limitados.

La efectividad del uso de la miel en el tratamiento de la gangrena de Fournier (Subrahmanyam y Ugane, 2004) de acuerdo con nuestro informe de casos, después de que se decidiera la LT, se utilizaron con gasas impregnadas de miel para ser artesanales o suturadas. Cabe mencionar que esta combinación de bioterapias puede beneficiar al paciente, las larvas de *Lucilia sericata* pueden desbridar al paciente y la miel puede continuar manteniendo la herida limpia hasta que ésta se cierre. Después de la LT, los pacientes tuvieron menos complicaciones para requerir la reconstrucción mediante cirugía plástica.

CONCLUSIONES

En este sencillo ensayo clínico prospectivo de terapia complementaria con larvas de mosca *Lucilia sericata* en el tratamiento de gangrena de Fournier, los beneficios predichos de la disminución de los procedimientos quirúrgicos y los mejores resultados se lograron. Estos resultados sugieren que otras instituciones deberían considerar la Larvaterapia como un tratamiento complementario para infecciones de tejidos profundos como la fascitis necrotizante, o bien cuestionar nuestros hallazgos con su propio ensayo clínico.

LITERATURA CITADA

- Angel K, Grassberger M, Huemer F, Stackl W. Madentherapie bei Fournierscher Gangränsterne Erfahrungen mit einer neuen Therapie. *Aktuel Urol* 2000; 31: 440-443.
- Aridogan IA, Izol V, Abat D, Karsli O, Bayazit Y, Satar N. Epidemiological characteristics of Fournier's gangrene: a report of 71 patients. *Urol Int* 2012; 89: 457-61.
- Çakmak A, Genç V, Akyol C, Ayhan Kayaoğlu H, Hazinedaroğlu, SM. Fournier's gangrene: Is it scrotal gangrene? . *Adv Ther* 2008; 25: 1065-1074.
- Clayton MD, Fowler Jr JE, Sharifi R, Pearl RK. Causes, presentation and survival of fifty-seven patients with necrotizing fasciitis of the male genitalia. *Sur Gynecol Obstet* 1990; 170: 49-55.
- Corcoran AT, Smaldone MC, Gibbons EP, Walsh TJ, Davies BJ. 2008. Validation of the Fournier's gangrene severity index in a large contemporary series. *J Urol* 2008; 180: 944-948.
- Dumville JC, Worthy G, Bland JM, Cullum N, Dowson C, Iglesias C, Mitchell JL, Nelson EA, Soares MO, Torgerson DJ; VenUS II team. Larval therapy for leg ulcers (VenUS II): randomized controlled trial. *BMJ* 2009;338:b773.
- Dunn C, Raghavan U, Pfliegerer AG. The use of maggots in head and neck necrotizing fasciitis. *J Laryngol Otol* 2002; 116: 70-72.
- Eke N. Fournier's gangrene: a review of 1726 cases. *Br J Surg* 2000; 87: 718-728.
- Erol B, Tuncel A, Hanci V et al., Fournier's gangrene: over- view of prognostic factors and definition of new prognostic parameter. *Urology* 2010; 75: 1193-1198.
- Felder JM, Hechenbleikner E, Jordan M, Jeng J. Increasing the Options for Management of Large and Complex Chronic Wounds With a Scalable, Closed-System Dressing for Maggot Therapy. *J Burn Care Res* 2012; 33:70-76.
- Figuroa I, Flores J, Rodríguez S. Método de cultivo de larvas de moscas *Lucilia sericata* para terapia larval. *Parasitol Latinoam* 2007; 62: 79-82.

- Kaiser R, Cerra F. Progressive necrotizing surgical infections-a unified approach. J Trauma 1981; 21: 349-355.
- Laor E, Palmer LS, Tolia BM, et al. Outcome prediction in patients with Fournier's gangrene. J Urol 1995; 154: 89 –92.
- Laucks SS. Fournier's Gangrene. Surg Clin North Am 1994; 74:1339–1352.
- Lujan Marco S, Budía A, Di Capua C, Broseta E, Jiménez Cruz F. Evaluation of a severity score to predict the prognosis of Fournier's gangrene. BJU Int 2010; 106: 373–376.
- Morpurgo E, Galandiuk S. Fournier's gangrene. Surg Clin North Am 2002; 82: 1213–1224.
- Moslemi MK, Sadighi Gilani MA, et al. Fournier gangrene presenting in a patient with undiagnosed rectal adenocarcinoma: a case report. Cases J 2009; 2: 9136.
- Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L. et al. Maggot therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. Diabetes Care 1998; 21: 2030-31.
- Mumcuoglu KY, 2001. Clinical applications for maggots in wound care. Am J Clin Dermatol 2001; 2: 219–227.
- Paul AG, Ahmad NW, Lee HL, Ariff AM, Saranam M, Naicker AS, Osman Z. Maggot debridement therapy with *Lucilia cuprina*: a comparison with conventional debridement in diabetic foot ulcers. Int. Wound J 2009; 6: 39–46.
- Preuss SF., Stenzel MJ, Esriti A. The successful use of maggots in necrotizing fasciitis of the neck: A case report. Head Neck 2004; 26: 747–750.
- Steenvoorde PG, Jukema GN. The antimicrobial activity of maggots: in-vivo results. J Tissue Viability 2004; 14: 97–101.
- Steenvoorde P, Jacobi C, Wong C, Jukema G. Maggot Debridement Therapy in Necrotizing Fasciitis Reduces the Number of Surgical Debridements. Wounds 2007; 19: 73-78.
- Subrahmanyam M, Ugane SP. Honey dressing beneficial in treatment of Fournier's gangrene. Indian J Surg 2004; 66:75-77.

- Sherman RA, Wyle F, Vulpe M. Maggot therapy for treating pressure ulcers in spinal cord injury patients. *J Spinal Cord Med* 1995; 18: 71–74.
- Sherman RA. Maggot therapy in modern medicine. *Infect Med* 1998;15:651-6.
- Sherman RA, Hall MJR, Thomas S. Medicinal maggots: An ancient remedy for some contemporary afflictions. *Ann Rev Entomol* 2000; 45: 55-81.
- Sherman, RA. Maggot therapy for foot and leg wounds. *Int J Low Extrem Wounds* 2002; 1:135-42.
- Sherman RA. Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; 10: 208–214.
- Sherman RA. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care* 2003; 26: 446–451.
- Sherman RA. Maggot therapy takes us back to the future of wound care: new and improved maggot therapy for the 21st century. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3: 336–44.
- Sherman RA. Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here? *Evid Based Complement Alternat Med* 2014: 592419.
- Spirnak JP, Resnick MI, Hampel N, Persky L. Fournier’s gangrene: report of 20 patients. *J Urol* 1984; 131:289-91.
- Tantawi TI, Williams KA, Villet MH. An accidental but safe and effective use of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) in maggot debridement therapy in Alexandria, Egypt. *J Med Entomol* 2010; 47:491–4.
- Teich S, Myers RA. Maggot therapy for severe skin infections. *South Med J* 1986; 79:1153–55.
- Temiz M, Cetin M, Aslan A. A: Fourniers gangrene caused by *Candida albicans*. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42: 707-711.
- Wayman J, Nirojogi V, Walker A, Sowinski A, Walker MA. The cost effectiveness of larval therapy in venous ulcers. *J Tissue Viability* 2000;10: 91-94
- Wollina U, Karte K, Herold C, Looks A. Biosurgery in wound healing – the renaissance of maggot therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2000; 14: 285-289.

CAPITULO IV

Tasa de oviposición de tres especies de moscas (Diptera:Calliphoridae) con tres sustratos

Oviposition rate of three species of blowflies (Diptera:Calliphoridae) with three substrates

RESUMEN

Los dípteros son los primeros colonizadores de los cadáveres, de los cuales una de las familias más importantes es la Calliphoridae la cual contiene más de 1000 especies en 150 géneros distribuidos en todo el mundo. *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata* y *Cochliomya macellaria* son utilizadas como herramientas en el proceso legal de la intervalo post mortem (IPM). En el presente estudio se determinó el porcentaje de oviposición de las tres especies (1 hembra 2 machos) con hígados frescos de res, pollo y cerdo durante fotoperiodos 12:12 horas (luz/obscuridad) con cambios entre cada fotoperiodo en un periodo de 15 días, el conteo de huevos se desarrollo mediante dilución volumétrica. Los resultados mostraron que *Lucilia sericata* obtuvo el más alto porcentaje de oviposición 29.55% en hígado de pollo durante el día, de la misma forma el hígdo de pollo fue el que más atracción tuvo con un 35.51% durante el día. En cuanto a los fotoperiodos el más alto porcentaje de oviposición fue durante el día teniendo 57.92%. La oviposición en los califóridos es diferente entre cada especie, esto dependiendo de las condiciones de sustrato y fotoperiodo en las que se encuentren cada especie.

Palabras clave: Tasa de oviposición, Calliphoridae, *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata* *Cochliomya macellaria*

ABSTRACT

The use of arthropods in criminal investigations is of great importance in forensic studies. The dipterans are the first colonizers of the corpses, where one of the most important families is the Calliphoridae which contains more than 1000 species in 150 genera distributed throughout the world. *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata* and *Cochliomya macellaria* are used as tools in the legal process of the post mortem interval (IPM). In the present study the percentage of oviposition of the three species (1 female 2 males) with fresh livers of beef, chicken and pork during photoperiods 12:12 hours (L/D) with changes between each photoperiod in a period of 15 was determined. days, the egg count was developed by volumetric dilution. The results showed that *Lucilia sericata* obtained the highest percentage of oviposition 29.55% in chicken liver during the day, in the same way chicken liver was the most attractive with 35.51%. The highest percentage of oviposition into photoperiods was during the day having 57.92% over night. The oviposition of the califorids under laboratory conditions is different between each specie, depending on the substrate and photoperiod.

Key words: oviposición, Calliphoridae, *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata* *Cochliomya macellaria*

INTRODUCCIÓN

La entomología forense juega un papel fundamental en la estimación del intervalo post mortem (I.P.M) los dípteros son considerados los primeros colonizadores, en los cadáveres, algunas moscas de la familia Calliphoridae son atraídas durante el proceso de descomposición cadavérica (Byrd y Castner, 2010) y son estudiadas por aportar información en los estudios criminales. La familia Calliphoridae tiene descritas alrededor de 1100 especies con una amplia distribución a nivel mundial (Merritt y De Jong 2015). Los géneros *Calliphora* spp, *Cochliomyia* spp, *Chrysomya* spp y *Lucilia* spp son de las más representativas. Algunas especies representativas son *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata* y *Cochliomyia macellaria* ya que son utilizadas como herramientas en el proceso legal, además de que también tienen importancia médica en el uso de la larvaterapia (Masiero y Thyssen 2016; Masiero et al. 2015; Sherman 2002; Sherman et al. 2000; Paul et al. 2009; Tantawi et al. 2010). Las moscas *Lucilia sericata* (Meigen) son conocidas comúnmente como moscas verde botella, presentan un color verde metálico, habitan en zonas tropicales y son de distribución cosmopolita, las hembras ovipositan alrededor de 223 huevos teniendo en todo su ciclo de vida aproximadamente 3000 huevos (Wall 1993; Fleischmann et al. 2004). Las moscas *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) son conocidas como gusanos barrenadores secundarios causantes de miasis (Harrison et al., 1968), estas moscas son localizadas principalmente en climas cálidos y húmedos (Byrd et al., 2010), las hembras pueden llegar a ovipositar de 50 a 200 huevos, son reconocidas por su gran importancia en la coolinización de los cadáveres y en la estimación del I.P.M. (Boatright y Tomberlin 2010). Las moscas *Lucilia cuprina* (Wiedemann) mejor conocidas como moscas bronce (Byrd et al., 2010) son ampliamente distribuidas principalmente en América del norte, Australia, Asia y África, las hembras llegan a ovipositar en lotes alrededor de 200 huevos. *L. cuprina* es gran importancia en el ámbito médico por ser una de las primeras especies en colonizar los cadáveres. La importancia de conocer la biología de las moscas de la familia Calliphoridae ha traído consigo el uso de sustratos alimenticios naturales para el crecimiento y atracción de ellas, algunos estudios muestran atracción de moscas con vísceras de cerdo, res y pescado (Bunchu et al. 2008; Boonchu et al. 2003), pulmón, corazón y cerebro de cerdo (Kaneshrajah y Turner, 2004; Byrd y Castner 2001); cerdo (Ames y Turner 2003) e incluso dietas artificiales (Byrd y Castner 2001; Tachiban y Numata 200; Sherman y Tran 1995) todos han sido sugeridos como métodos de atracción y crecimiento en moscas. Otro aspecto importante es la conducta durante la oviposición es el fotoperíodo tanto diurno como nocturno (Amendt et al., 2017), los califóridos pueden llegar a ovipositar en lugares oscuros como chimeneas y bodegas (Erznclioğlu, 1996). Sin embargo en estudios previos de

oviposición y atracción de califóridos no muestran la oviposición individual. Es por ello la necesidad de contribuir en el conocimiento de la atracción y oviposición de moscas *Lucilia sericata*, *Lucilia cuprina* y *Cochliomyia macellaria* con tres sustratos naturales de hígado de res, cerdo y pollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría de las moscas

Las moscas *L. sericata*, *L. cuprina* y *C. macellaria* fueron criadas alrededor de 200 a 300 moscas adultas, en cajas de plástico de 30 cm³ con luz:oscuridad (12:12) horas, con una temperatura de 27 +/- 2 °C con una humedad relativa de 50% , cada caja conto con alrededor de 200 a 300 moscas.

Un total de 1 hembra y 2 machos de cada una de las especies fueron removidas al azar mediante una aspiradora (AC/DC Aspirator, BioQuimp USA) a partir del primer día en emerger de la pupa, se colocaron en una caja de acrílico de 40 cm³ con azúcar y agua *ad libitum*, a cada caja se les colocaron 10 g de hígado fresco de res, cerdo y pollo en cajas petrí por separado, los cuales fueron obtenidos diariamente en mercados locales y refrigerados a 4° C, cada uno de los sustratos fueron colocados y removidos por frescos cada 12 horas simulando el fotoperiodo luz: oscuridad a 26 +/- 2° C y 70% de humedad relativa, las jaulas fueron separadas unas a otras con 30 cm de distancia entre ellas para evitar interfirieran las especies. Los tratamientos fueron rotados de posición entre cada experimento tanto enfrente como atrás de la caja experimental con cinco repeticiones por cada especie (Figura 1). Entre cada experimento se limpiaron las jaulas con detergente inoloro y se dejaron al aire libre durante 24 horas para evitar olores que interfirieran con los experimentos con cinco repeticiones por cada especie durante 15 días.

Conteo de huevos

Los huevos fueron removidos con pinceles y colocados sobre tela de organza delicadamente en 30 ml de agua estéril, posteriormente mediante movimientos circulares se fueron separando los grumos con ayuda de un pincel hasta la separación de todos (Figura 2). Posteriormente mediante el método de dilución volumétrica modificado del propuesto por Perez et. al. (2004) se tomaron muestras de 10 ml para el cálculo de los huevos en cada sustrato y fueron contabilizados en cajas petri con una cuadrícula diseñada y modificada del descrito por Ody et al. (2017).

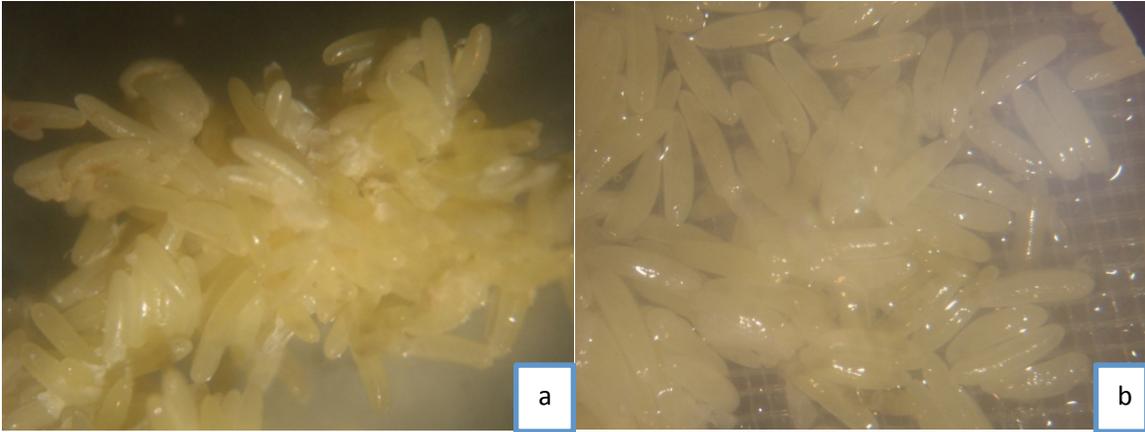


Figura 2. a) Huevos aglutinados y b) Huevos desaglutinados.

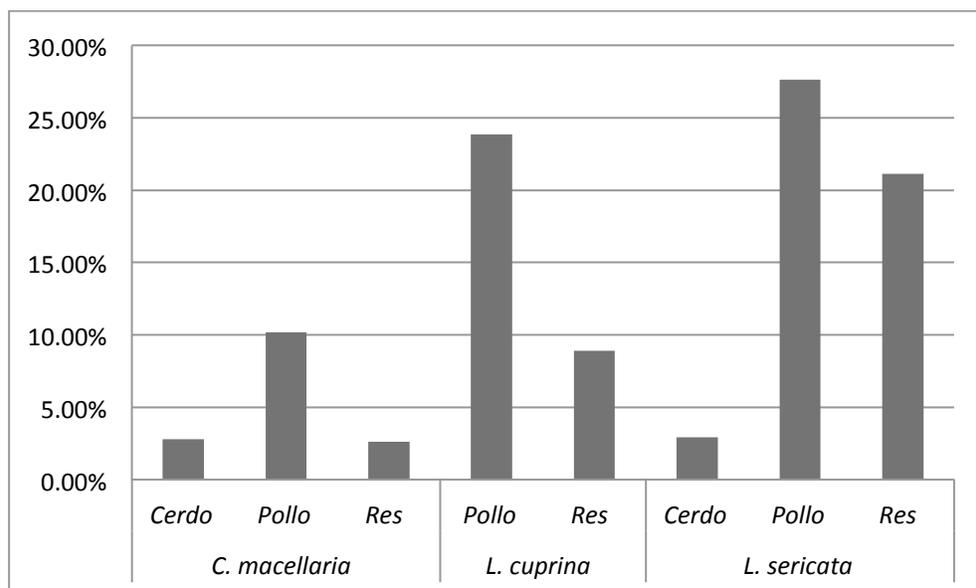
Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de correspondencia multinomial para modelar la conducta de la especie respecto a las variables "sustratos, especies y fotoperiodo" con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con el programa JMP v7, SPSS v21.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de oviposición de Cochliomyia macellaria, Lucilia cuprina y Lucilia sericata.

Los porcentajes del total de oviposición en los tres sustratos estudiados con las tres especies estudiadas mostró que *Lucilia sericata* fue la que obtuvo más índice de oviposición con un total de 51.68%, seguida de *Lucilia cuprina* con un 32.75% y *Cochliomyia macellaria* con un 15.57%.



Gráfica 1. Porcentaje de oviposición de *Cochliomyia macellaria*, *Lucilia cuprina* y *Lucilia sericata*

El porcentaje de oviposición de las tres especies estudiadas *Cochliomyia macellaria*, *Lucilia cuprina* y *Lucilia sericata* en cuanto a los sustratos naturales utilizados, el hígado de pollo fue el más atractivo en dos especies *L. sericata* y *L. cuprina*, sin embargo el hígado de cerdo fue el menos atractivo siendo este último escaso en *L. cuprina*, en cuanto a *L. sericata* y *C. macellaria* fue para ambas un alrededor de 2.5%. Sin embargo el sustrato de res fue más representativo para *Lucilia sericata* con 21.14% seguido de *L. cuprina* con 9%, sin embargo *C. macellaria* fue la que menos atracción tuvo con res (Gráfica 1).

En cuanto al porcentaje de oviposición total de las tres especies y su atracción en los sustratos naturales estudiados, se encontró que el pollo fue el más atractivo con un 61% de atracción

total de las tres especies, seguido de res con 32% y el menos atractivo fue el cerdo con 5.7%. Es similar al estudio realizado por Kaneshrajah y Turner (2004) en el que describieron que el hígado de cerdo no fue efectivo con el crecimiento de *Calliphora vicina* a diferencia de tejidos como el pulmón, riñón, corazón o cerebro de cerdo. En nuestro estudio solo se trabajó con hígados, será una buena recomendación para futuros estudios trabajar con diferentes tejidos de pollo, cerdo y res.

Sin embargo Zhu et al. (2013) mostró diferencias significativas con diferentes compuestos volátiles del hígado de pollo con moscas como atrayentes en oviposición de *C. macellaria*, relacionado a nuestro estudio se confirmó ya que fue el hígado de pollo el que más porcentaje de oviposición y atracción tuvo con *C. macellaria*. Cabe mencionar que en otros estudios como el realizado por

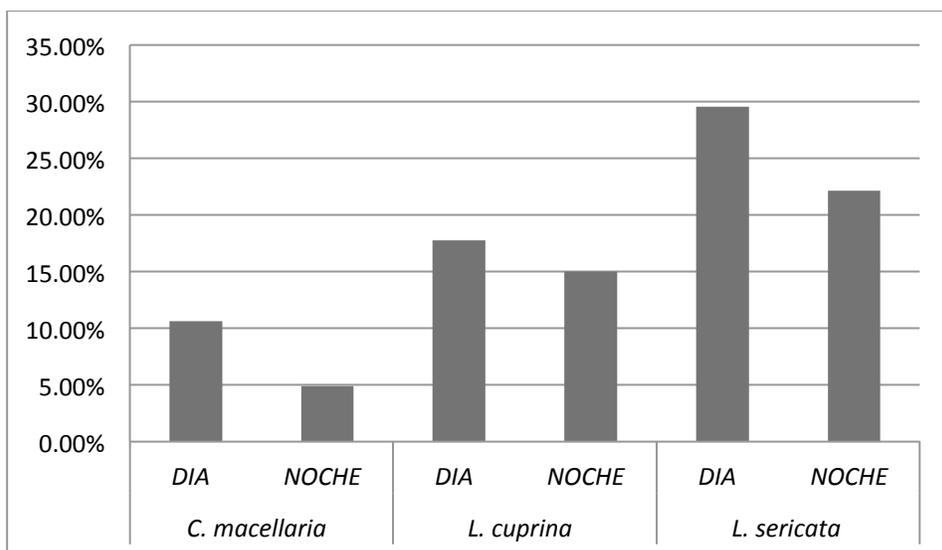
La oviposición es importante en este proceso de descomposición, antes de que el tejido se disque y se vuelva poco habitable para el desarrollo larval (Forbes y Carter 2015), además es de suma importancia el tipo de tejido con el que se estudia, un ejemplo de ello es el trabajo descrito por Boonchu et al. (2003) donde mostró que las vísceras de cerdo son muy atractivas con las moscas de importancia forense, teniendo un 35% seguida de filete de pescado 30%, en su estudio mostró que los de menor atracción fueron vísceras de pescado 12%, vísceras de res 9%, carne de puerco 8.4% y carne de res 5.4%.

Un factor decisivo en el proceso de oviposición puede ser la presencia de huevos y/o larvas de otras especies, tal es el estudio realizado por Yang y Shiao (2012) en el que describieron que las hembras de *C. megacephala* no ovipositan cuando está la presencia de larvas de otras especies tales como *C. rufifacies* y las hembras de esta última actúan en forma contraria ante la presencia de larvas de *C. megacephala*.

Porcentaje de oviposición y atracción de *C. macellaria*, *L. cuprina* y *L. sericata* durante fotoperiodos.

Algunos factores influyen en la colonización de los cadáveres que pueden influir en la determinación del intervalo post mortem (IPM), uno de ellos pueden ser los fotoperiodos, ya que algunos reportes describen la oviposición de los califóridos únicamente de día, sin embargo son pocos los que mencionan la importancia de conocer la oviposición en la noche. Algunos estudios como el hecho por Greenberg (1990) en su estudio reportó que *Lucilia sericata*, *Calliphora vicina* y

Phormia regina ovipositan durante las noches y puede alterar la estimación del intervalo postmortem con un periodo de hasta 12 horas en los casos de homicidios. En nuestro estudio se observó que la oviposición de las especies estudiadas mostraron un porcentaje mayor de oviposición durante el día que en la noche, en ambos casos *Lucilia sericata* fue la que mayor porcentaje de oviposición tuvo en los dos fotoperiodos teniendo un 29.55 % seguido de *L. cuprina* con 17.74% de día y de noche con 15.01%, sin embargo *C. macellaria* fue la que menos presencia y porcentaje de oviposición tuvo en relación con las dos especies (Grafica 2).

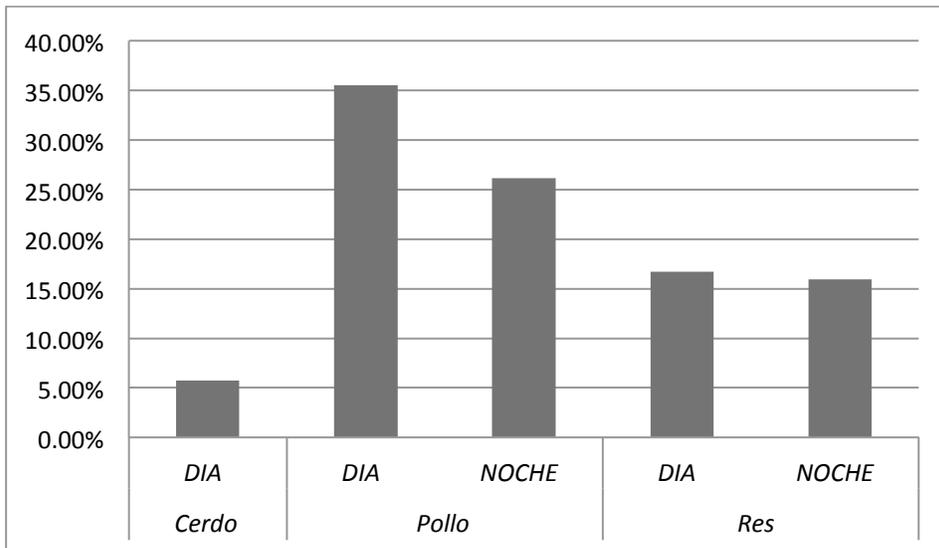


Grafica 2. Porcentaje de oviposición durante los fotoperiodos (día y noche) con las tres especies *Lucilia sericata*, *Lucilia cuprina* y *Cochliomyia macellaria*

De acuerdo con Williams et al (2017) la oviposición nocturna puede estar restringida por un conjunto de condiciones ambientales, tipo y tamaño de la carcasa, ya que estos factores pueden variar de una especie a otra, probablemente entre poblaciones específicas, en nuestro estudio solo se realizó con condiciones controladas de laboratorio, por lo que se sugiere que se desarrolle en un ambiente natural con las diversas variables.

La temperatura influye en la oviposición de los califóridos (Erznclioğlu, 1996; Davies 2006). En un estudio realizado por Amendt et al. (2008) mostró que la oviposición nocturna de los califóridos bajo condiciones de laboratorio puede ocurrir con 25° C, en nuestro estudio realizado se manejó con una media de 25° C, por lo que en los resultados también pudo influir en esa atracción de las moscas, otro factor importante son los sustratos empleados donde se muestra el porcentaje de

oviposición en los fotoperiodos con los tres sustratos cerdo, pollo y res utilizados por las tres especies estudiadas, se observó que el más atrayente fue el pollo en ambos fotoperiodos por las tres especies, donde presenta un 35% de oviposición durante el día (Gráfica 3).



Grafica 3. Porcentaje de oviposición durante los fotoperiodos con hígado de res, cerdo y pollo.

Correspondencia de sustratos, especies y fotoperiodos

La correlación entre las variables: sustrato, especie y fotoperiodo describe a *Lucilia sericata* como la especie que mas tendencia tuvo con el hígado de pollo y en el día. Sin embargo no se encontró una tendencia, dependencia ni asociación con el hígado de cerdo durante el día y la noche con ninguna especie estudiada

Algunos artrópodos para favorecer la supervivencia de la descendencia mediante la oviposición, algunos factores que favorecen la respuesta de ellos pueden estar restringida por la memoria, locomoción y su percepción sensorial (Mac y Pianka, 1996).

Las moscas de la familia Calliphoridae son ampliamente distribuidas y estudiadas debido a su impacto en investigaciones criminales y acción sanitaria. Sin embargo las hembras de los califóridos tienen conductas diferentes de acuerdo a algunos factores entre ellos pueden ser el tipo de sustrato, temperatura y fotoperiodo, todo depende de los factores medio ambientales y las condiciones de cada una de las especies, por ello en el presente estudio se realizó con tres especies *Lucilia sericata*, *Lucilia cuprina* y *Cochliomyia macellaria* las tres de importancia forense, sin embargo no se habían realizado ningún estudio de manera individual con las especies descritas, tres

sustratos naturales y fotoperiodos. Por ello el presente trabajo contribuyo en conocer mas sobre la conducta de las moscas individuales y su porcentaje de oviposición en los fotoperiodos.

CONCLUSIONES

- La mosca *Lucilia sericata* mostró un alto porcentaje de oviposición en el hígado de pollo seguida de *Cochliomyia macellaria en res* y la que menos mostró fue *Lucilia cuprina*.
- El hígado de pollo fue el que más atrajo a las tres especies estudiadas durante el día y la noche, seguido de res durante el día. Sin embargo el hígado de cerdo no tuvo ningun porcentaje de oviposición durante la noche en ninguna especie.
- Las tres especies tuvieron más porcentaje de oviposición durante el día a diferencia de la noche.

LITERATURA CITADA

- Amendt J, Zehner R, Reckel F. 2008. The nocturnal oviposition behaviour of blow flies (Diptera: Calliphoridae) in Central Europe and its forensic implications, *Forensic Sci. Int.* 175 61–84.
- Ames C, Turner B. 2003. Low temperature episodes in the development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. *Med Vet Entomol* 17:178–186
- Boatright SA, Tomberlin JK. 2010. Effects of temperature and tissue type on the development of *Cochliomyia americana* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 47:917–923
- Bunchu, N., K. L. Sukontason, J. K. Olson, H. Kurahashi, and K. Sukontason. 2008. Behavioral responses of *Chrysomya megacephala* to natural products. *Parasitol. Res.* 102: 419-429.
- Boonchu N, Piangjai S, Sukontason KL, Sukontason K. 2003. Comparison of the effectiveness of baits used in traps for adult fly collection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34:630–633
- Byrd JH, Castner JL (2001) *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press, Boca Raton
- Byrd J, Castner JL. 2010. Insects of Forensic importance, in: *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, 2nd edition, J.H. Byrd and J.L. Castner (eds.), Boca Raton: CRC Press. pp. 41–126
- Davies L. 2006. Lifetime reproductive output of *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* in outdoor caged and field populations; flight versus. egg production? *Med. Vet. Entomol.* 20 453–458.
- Erznelioglu, Z. 1996. *Blowflies*, Slought, U.K., Richmond Publishing Co.

- Fleischmann, W. Grassberger, M. and Sherman, R. 2004. *Maggot Therapy A Handbook of Maggot-Assisted Wound Healing*. USA: Thieme.
- Forbes L, Carter D. 2015. Processes and Mechanisms of Death and Decomposition of vertebrate carrion. In: *Carrion ecology, evolution, and their applications*, Benbow M, Tomberlin J and Tarone A. CRC Press: Boca Raton, FL, pp. 13-30.
- Greenberg B, Nocturnal oviposition behaviour of blow flies (Diptera: Calliphoridae), J. *Med Entomol.* 27 (5) (1990) 807–810.
- Harrison, B.A. and Pearson, W.G. 1968. A case of aural myiasis caused by *Cochliomyia macellaria* (Fabricius). *Military Med.* 133: 484-488.
- Mac A, Pianka ER. 1966. On the optimal use of a patchy environment. *Am. Nat* 100:603–9
- Masiero F, Thyssen P.2016. Evaluation of conventional therapeutic methods versus maggot therapy in the evolution of healing of tegumental injuries in Wistar rats with and without diabetes mellitus. *Parasitol Res* 115: 2403-2407.
- Masiero FS, Nassu MP, Soares MP, Thyssen PJ.2015. Histological Patterns in healing chronic wounds using *Cochliomyia macellaria* (Diptera:Calliphoridae) larvae and other therapeutic measures. *Parasitol Res* 111: 2865-2872.
- Merritt RW, Grant D. 2015. Arthropod Communities in Terrestrial Environments. in: *Carrion ecology, evolution, and their applications*. M.E. Benbow, J.K. Tomberlin, A.M. Tarone, CRC Press; Boca Raton, FL pp. 66-91.
- Ody H, Bulling MT, Barnes KM. 2017. Effects of environmental temperature on oviposition behavior in three blow fly species of forensic importance. *Forensic Science International* 275:138-143.
- Paul A. G. Ahmad N. W. Lee H. L. Ariff A. M. Saranum M. Naicker A. S. Osman Z. . 2009. Maggot debridement therapy with *Lucilia cuprina*: a comparison with conventional debridement in diabetic foot ulcers. *Int. Wound J.* 6: 39–46.

- Phasuk Jumnongjit, Tharawoot Thitima, Chanpaisaeng Jariya. 2013. Seasonal abundance of Blow flies (Diptera: Calliphoridae) in three urban parks of Bangkok Thailand. Kasetsart Journal Natural Science; 47:828-834
- Sherman, R.A. 2002. Maggot therapy for foot and leg wounds. Low Extrem. Wounds. 1:135-42.
- Sherman, R.A., Hall, M.J R. and Thomas, S. 2000. Medicinal maggots: An ancient remedy for some contemporary afflictions. Ann Rev Entomol.45: 55-81.
- Sherman, R. A. and J. M.-T. Tran (1995) A simple, sterile food source for rearing the larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Med. Vet. Entomol. 9: 393–398.
- Tachibana and Numata, 2001. An artificial diet for blow fly larvae, *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae). Applied Entomology and Zoology, 36 pp. 521-523
- Tantawi T, Williams K, Villet M. An accidental but safe and effective use of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) in maggot debridement therapy in Alexandria, Egypt. J Med Entomol. 2010;47(3):491–4.
- Urech R. Green P. E. Rice M. J. Brown G. W. Duncalfe F. Webb P. . 2004 . Composition of chemical attractants affects trap catches of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina* , and other blowflies . J. Chem. Ecol. 30 : 851 – 866 .
- Williams KA, Wallman JF, Lessard BD, Kavazos CRJ, Mazungula DN, Villet MH. 2017. Nocturnal oviposition behavior of blowflies (Diptera: Calliphoridae) in the southern hemisphere (South Africa and Australia) and its forensic implications. Forensic Sci Med Pathol 13:123–134
- Zhu J. J. Chaudhury M. F. Tangtrakulwanich K. Skoda S. R. . 2013 . Identification of oviposition attractants of the secondary screwworm, *Cochliomyia macellaria* (F.)

released from rotten chicken liver . J. Chem. Ecol. 39 : 1407 – 1414

Wall, R. 1993. The Reproductive Output of the Blowfly *Lucilia sericata*. Journal of Insect Pharmacology. 39:9, pp. 743-750.

Yang S-T, Shiao S-F. 2012. Oviposition preferences of two forensically important blow fly species, *Chrysomya megacephala* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae), and implications for postmortem interval estimation. J Med Entomol: 49(2):424–35.