

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD OAXACA

**MAestrÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACION Y APROVECHAMIENTO DE
RECURSOS NATURALES**

(PRODUCCIÓN Y PROTECCIÓN VEGETAL)

PROTOCOLO DE TESIS

ESTERILIZACIÓN DE HUEVOS Y EFECTO DE LARVAS *Lucilia sp*
(DIPTERA:CALLIPHORIDAE)
EN BIOFILMS DE *Pseudomona aeruginosa*.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

ALICIA FONSECA MUÑOZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALFONSO VÁSQUEZ LOPEZ

DR. RAFAEL PÉREZ PACHECO

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

Diciembre 2011



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 30 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: **"Esterilización de huevos y efecto de larvas de *Lucilia sp* en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*"**

Presentada por el alumno:

Fonseca Apellido paterno	Muñoz materno	Alicia nombre(s)
		Con registro: A 1 0 0 2 2 4

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE 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. Alfonso Vázquez López



Dr. José Antonio Sánchez García

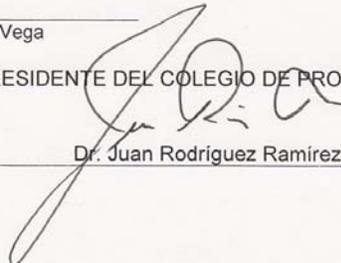


Dr. Néstor Bautista Martínez



Dr. Jaime Ruiz Vega

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



Dr. Juan Rodríguez Ramírez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION 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 de Juárez el día 30 del mes noviembre del año 2011, el (la) que suscribe **Fonseca Muñoz Alicia** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **A100224**, adscrito al 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 de los Dr. Rafael Pérez Pacheco y Alfonso Vásquez López y cede los derechos del trabajo titulado: "**Esterilización de huevos y efecto de larvas de *Lucilia sp* en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa***", 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 **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó afonsem@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Fonseca Muñoz Alicia



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

RESUMEN

Las heridas crónicas son comúnmente asociadas a la formación de biofilms, formados de bacterias resistentes a antibióticos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, de ahí la necesidad de búsqueda de nuevas alternativas para combatir las infecciones tales como el uso de larvas estériles de mosca *Lucilia sericata* (Diptera:Calliphoridae) que pueden tener tres mecanismos de acción: secretan enzimas digestivas que disuelven selectivamente el tejido necrótico, desinfectan la herida, y estimulan la cicatrización de la herida. Las larvas utilizadas en este tratamiento deben ser esterilizadas en fase huevo y aplicadas en sus primeros instares larvales para combatir bacterias resistentes a los antibióticos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, por lo tanto los objetivos de este trabajo fueron evaluar diez métodos de esterilización en huevos de *Lucilia cuprina* y la evaluación del efecto de la homogeneización y secreciones-excreciones de larvas *Lucilia sericata* en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. La cría de moscas se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Entomología en Ciencias Forenses (F.L.I.E.S. Texas A&M University). Los resultados obtenidos muestran que: *Cochliomyia macellaria* presentó un alto índice de eclosión (+/-91%) en todos los tiempos; sin embargo, *Lucilia sericata* mostró un bajo índice de eclosión en todos los tratamientos (+/-48%). En cuanto a los diez tratamientos, el tratamiento con más alta tasa de eclosión fue NaClO con un 86.85%, seguido de ETOH 70% con un 74.36% de eclosión, las tasas más bajas de eclosión fueron NaClO/Formaldehído (50.08%) y Formaldehído (59.84%). En cuanto a los más altos índices de esterilidad, los presentaron Lysol 10% con 99.70%, seguido de

NaClO/Formaldehído con 99.50% y NaClO con un 97%, el más bajo índice de esterilidad lo presentó la Formalina 5% con 71%. Por lo tanto el NaClO puede utilizarse en el proceso de esterilización asegurando un alto índice de eclosión. En cuanto el efecto de las larvas en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*, Se realizaron homogeneizaciones de 50 y 100 larvas; así mismo, disoluciones de SE de 50 y 100 larvas, se concentraron durante 24 horas en *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. El homogeneizado de las larvas estériles alimentadas con hígado estériles no redujo el biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, en cuanto al estéril disminuyó entre 21 y 48%. Los SE de larvas estéril y no estériles disminuyeron de un 66 a un 75%, el cual los hace una buena alternativa en la reducción del biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Chronic wounds are commonly associated with the formation of biofilms, formed of antibiotic-resistant bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, for that reason is the importance to find new ways to control such infections, one way is the use of sterile larvae of *Lucilia sericata* fly (Diptera:Calliphoridae) where the three larval mechanisms of action are: secrete digestive enzymes that selectively dissolve necrotic tissue, disinfect the wound, and thus stimulate wound healing. The larvae used in this treatment should be sterilized in the process are applied in their egg and larval instars first to fight antibiotic-resistant bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, therefore the objectives of this study were to evaluate ten methods of sterilization in the eggs of *Lucilia cuprina* and evaluation of the effect of homogenization and secretions, excretions of *Lucilia sericata* larvae in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. The breeding of flies was taken on the premises of Entomology Research Laboratory of Forensic Science (FLIES Texas A & M University). The results obtained show that: *Cochliomyia macellaria* showed a high rate of hatching of (+ / -91%) at all times, however *Lucilia sericata* showed a low rate of emergence in all treatments of a (+ / -48%) . As for the ten treatments, treatment with higher hatching rate was with NaClO with a (86.85%), followed by a 70% ETOH (74.36%) of hatching, the hatching rates were lowest NaClO / Formaldehyde (50.08%) and formaldehyde (59.84%). As for the higher rates of infertility, 10% had Lysol (99.70%), followed by NaClO / Formaldehyde with (99.50%) and NaClO with a (97%), the lower the rate of infertility presented Formalin 5 % with (71%). Therefore the NaClO can be used in the sterilization process to ensure a high rate of hatching. As the effect of larvae in biofilms of

Pseudomonas aeruginosa, homogenization were performed 50 and 100 larvae, and the same solutions of SE 50 and 100 larvae were concentrated for 24 hours in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. The homogenate of the larvae fed sterile sterile liver did not reduce the biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PA14, as the sterile decreased between 21 and 48%. The SE of sterile and non sterile larvae decreased from 66 to 75%, which makes them a good alternative in reducing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que a pesar de la distancia siempre han estado en todo momento y me han apoyado en todo momento de mi vida.

A mi mama, la mujer que más admiro en la vida por su gran fortaleza, enseñanza y su apoyo indescriptible hacia mis proyectos en la vida.

Al Dr. Hugo E. Sarmiento Jiménez por invaluable apoyo durante todos estos años, su confianza, sus enseñanzas y sobre todo por su gran amistad. Gracias de todo corazón por su gran apoyo en permitirme desarrollarme en una etapa más de mi vida.

Al Dr. Rafael Pérez Pacheco por creer en el proyecto desde un inicio y apoyarme en cada momento de mis estudios, su confianza, sus conocimientos, sus risas, su alegría y su valiosa amistad.

Al Dr. Alfonso Vásquez López, Dr. José Antonio Sánchez García y al Dr. Néstor Bautista Martínez por sus grandes enseñanzas, comentarios, tiempo y sobre todo por su invaluable amistad durante todo este tiempo.

Al Dr. Jeffery A. Tomberlin por brindarme su gran amistad, su confianza, sus enseñanzas y su apoyo total en la realización de mi proyecto durante mi estancia en el laboratorio de FLIES en la Universidad de Texas A&M.

A la Dra. Tawni L. Crippen y Dra. Cynthia Sheffield por su tiempo depositado en el proyecto, sus comentarios, sus grandes enseñanzas y su confianza depositada en mí durante el tiempo depositado en su laboratorio USDA.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca (CIIDIR-Oaxaca) y todo lo que lo integra por permitirme crecer en mi formación profesional.

Al laboratorio F.L.I.E.S de la Universidad de Texas A&M College Station E.U. por permitirme desarrollar

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado en el tiempo de realización de mis estudios de maestría.

A mis queridos compañeros de la maestría que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante este tiempo convivir dentro y fuera del salón de clase: Julian, Sr. Gonzalo, Juan, Ninfa, Astrid, Carlos, Alejandro, Nancy, Paulina, Oscar, Gloria, Sabino y Edgar.

A mis compañeros del laboratorio de F.L.I.E.S. de la Universidad de Texas A&M y U.S.D.A. por su gran apoyo, enseñanzas y sobre todo por su amistad durante mi estancia, que me hicieron muy alegre mi estancia : Adrienne, Charity, Wengi Lu, Meaghan, Aline, Christine and Micah.

A los miembros del Hospital San José por su apoyo en mis estudios.

A Iván de Jesús Díaz Rodríguez por tu tiempo, esfuerzo, paciencia, apoyo, consejos y sobre todo por el gran amor que me has mostrado en este tiempo.

Al Lic. Gonzalo Meixuero Díaz por ser un gran apoyo, sus consejos, tiempo y su gran amistad en cada momento de mi desarrollo profesional.

A mis amigos de la vida que siempre han estado en cada momento de mi vida, me han apoyado en la alegría y tristeza, me han mostrado lo bello de la vida y sobre todo están en cada momento que los necesito.

CONTENIDO	Página
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	VI
AGRADECIMIENTOS.....	VIII
INDICE DE FIGURAS.....	XIV
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	3
HIPÓTESIS.....	4
CAPITULO II. ESTERILIZACIÓN EXTERNA DE HUEVOS DE MOSCA <i>Lucilia cuprina</i> (DIPTERA:CALLIPHORIDAE)	
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
OBJETIVOS.....	9
REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
Familia Calliphoridae.....	9
<i>Lucilia cuprina</i>	12
<i>Lucilia sericata</i>	13
<i>Cochliomyia macellaria</i>	14
<i>Chrysomya rufifacies</i>	15
Métodos de esterilización de huevos de mosca.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Área de estudio.....	17
Material Biológico.....	17
Cría de la moscas.....	17
Bioensayos.....	20
Desaglutinación de los huevos.....	20
Inmersión en agua estéril.....	20
Agentes desinfectantes.....	21
Desinfección de huevos con agitación y enjuagues.....	24

Análisis estadístico	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Tasa de eclosión en inmersión en agua estéril.....	26
Nivel de eclosión de <i>Cochliomyia macellaria</i>	26
Nivel de eclosión de <i>Cryomya rufifacies</i>	27
Nivel de eclosión de <i>Lucilia cuprina</i>	28
Nivel de eclosión de <i>Lucilia sericata</i>	29
Productos desinfectantes con <i>Lucilia cuprina</i>	31
Tasa de eclosión y nivel de esterilización de <i>Lucilia cuprina</i>	36
Desinfección con agitación y con enjuague.....	36
CONCLUSIONES	40
CAPITULO III. ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA FORMACION DE BIOFILMS <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14 DE LARVAS ESTERILES Y NO ESTERILES <i>Lucilia sericata</i> (Diptera:Calliphoridae).	
RESUMEN.....	42
INTRODUCCIÓN.....	43
OBJETIVOS.....	45
REVISIÓN DE LITERATURA.....	45
Generalidades de las heridas.....	45
Etiología de las heridas.....	46
Tratamiento de úlceras y/o heridas necrosadas.....	47
Larva terapia.....	48
Mecanismos de acción larval en heridas.....	49
Secreciones-excreciones de las larvas.....	51
Formación de Biofilms	51
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	52
Estadística.....	52
MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
Área de estudio.....	53
Material Biológico.....	53
Cría de la mosca.....	53
Obtención de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	54
Obtención de las larvas estériles y no estériles.....	54
Homogeneización de las larvas.....	55

Ensayos en Biofilms <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14.....	55
Secreción/Excreción de larvas instar II	55
Ensayos en biofilms <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14.....	55
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 58
Homogeneizado de 50 y 100 larvas.....	58
Secreciones y Excreciones de 50 y 100 larvas.....	59
 CONCLUSIONES	 64
 IV. CONCLUSIONES GENERALES	 65
V. LITERATURA CITADA	65
VI. APENDICE	73

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Capítulo II

Figura 1. Jaula entomológica para crianza y oviposición de adultos.....	18
Figura 2. Colecta de huevos de moscas.....	19
Figura 3. Esterilización de huevos de mosca.....	19
Figura 4. Eclosión de los huevos de las moscas a las 24 horas.....	20
Figura 5. Cajas de medio de cultivo de agar sangre posterior a los tratamientos.....	24
Figura 6. Agentes desinfectantes con agitación.	25
Figura 7. Porcentaje de eclosión de huevos de <i>Cochliomyia macellaria</i> posterior a los diferentes tiempos (minutos) de sumersión en agua destilada ($p < .05$).....	27
Figura 8. Porcentaje de eclosión de huevos de <i>Crysomya rufifacies</i> posterior a los diferentes tiempos (minutos) de sumersión en agua destilada ($p < .05$).....	28
Figura 9. Porcentaje de eclosión de huevos de <i>Lucilia cuprina</i> posterior a los diferentes tiempos (minutos) de sumersión en agua ($p < .05$).....	29
Figura 10. Porcentaje de eclosión de huevos de <i>Lucilia sericata</i> posterior a los diferentes tiempos (minutos) de sumersión en agua destilada ($p < .05$).....	30
Figura 11. Porcentaje de eclosión de huevos de <i>Chrysomya rufifacies</i> y <i>Cochliomyia macellaria</i> , <i>Lucilia cuprina</i> y <i>Lucilia sericata</i> posterior a los diferentes tiempos (minutos) de sumersión en agua destilada ($p < .05$).....	30
Figura 12. Porcentaje de eclosión de las diferentes agentes desinfectantes en huevos de <i>Lucilia cuprina</i> ($p < .05$).....	31
Figura 13. Cantidad de Unidades Formadoras de Colonias U.F.C. de las diferentes agentes desinfectantes en huevos de <i>Lucilia cuprina</i> ($p \leq .05$)	35

Figura 14. Porcentaje de eclosión de las diferentes agentes desinfectantes en
huevos de *Lucilia cuprina* con agitación ($p < .05$).37

Figura 15. Porcentaje de eclosión de las diferentes agentes desinfectantes en
huevos de *Lucilia cuprina* enjuague ($p < .05$).....38

Capítulo III

Figura 1. Contenedor alimento estéril para oviposición (Scott Lab rearing USA) y
con huevos de mosca *Lucilia sericata*.....56

Figura 2. Larvas estériles y no estériles otorgadas por el Dr. Ronald Sherman
(Monarch Labs, California).....57

Figura 3. Contenedor con larvas no estériles alimentadas con dieta proporcionada
por el Dr. Aaron Tarone (Texas A&M).....57

Figura 4. Viales de extracción de S/E de larvas estériles y no estériles.....58

Figura 5. Efecto del homogeneizado de 50 y 100 larvas instar II estériles y
no estériles con biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 a las 24 h
de tratamiento.....59

Figura 6. Efecto de las secreciones/excreciones de 50 y 100 larvas instar II
estériles y no estériles con biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 a las
24 h de tratamiento.....60

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La curación de heridas crónicas en el ser humano es un reto importante de la salud pública a nivel mundial, debido a que las técnicas empleadas son de alto costo y en algunos casos son pocos efectivos. En México no existen estadísticas que indiquen la proporción de personas con algún tipo de herida crónica, pero se calcula que el 15% de los diabéticos desarrollan una o dos úlceras durante el curso de la enfermedad (Frykberg *et al.*, 2000; Frykberg *et al.*, 1999). Tan solo en el año 2000 la Secretaria de Salud reportó 75,000 amputaciones por pie diabético (Medyweb, 2006).

Un factor que incide en el retraso de la cicatrización de las heridas es el crecimiento bacteriano y se agrava el problema si tomamos en cuenta que algunas bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* han presentado resistencia a los antibióticos, debido a esta razón se han buscado novedosos tratamientos que sean eficaces y de bajo costo; uno de ellos es la larvaterapia que ha mostrado ser un método eficaz en el manejo de heridas necrosadas sobre todo para aquellas infectadas con bacterias resistentes a los antibióticos, tal es el caso de *Staphylococcus aureus* (Sherman, 2002; Thomas *et al.*, 1999).

En la larvaterapia se emplean larvas estériles de la mosca *Lucilia sericata* para tratar heridas necrosadas. Se ha documentado que el efecto bactericida de las excreciones/secreciones de las larvas es poco efectivo contra las bacterias Gram-negativas en particular contra *Pseudomonas* spp. y *Proteus* spp. (Cazander *et al.*, 2009; Jaklic *et al.*, 2008; Kerridge *et al.*, 2005; Steenvoorde y Jukema, 2004). Otros estudios muestran que existe una acción bactericida de las larvas en contra de *Escherichia coli* (Bexfield, 2008).

Estas larvas también han mostrado un efecto tóxico contra de *Pseudomonas aeruginosa* (Andersen, 2010). La larvaterapia está aprobada por la Food and Drug Administration (FDA por sus siglas) y ha beneficiado a miles de pacientes en todo el mundo (Sherman et al., 2000).

La familia Calliphoridae contiene más de 1000 especies, en 150 géneros, de los cuales se encuentran distribuidos en todo el mundo (Henning, 1973), también es conocida como el colonizador inicial en los cadáveres, entre sus especies más representativas se encuentran *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), *Chrysomya rufifacies* (Macquart), *Lucilia sericata* y *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae).

La necesidad de esterilización de huevos de mosca, resistencia de cepas bacterianas en heridas necrosadas y el aumento del número de pacientes con heridas infectadas son factores que hacen indispensable la búsqueda de tratamientos alternativos, por estas razones, en el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos evaluar diez diferentes tratamientos descritos como agentes desinfectantes en los huevos de *Lucilia cuprina* y evaluar el efecto de la homogeneización y secreción/excreción de larvas estériles y no estériles de segundo instar en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* PA14.

II. OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar diferentes métodos de esterilización de huevos de cuatro especies de moscas (Diptera:Calliphoridae).
- Evaluar el efecto de la homogeneización y secreciones-excreciones de larvas de la mosca *Lucilia sericata* (Diptera:Calliphoridae)

III. HIPÓTESIS

Hipótesis Alternativas (Ha)

- Al menos uno de los tratamientos de esterilización tienen efecto en huevos de *Lucilia cuprina*.
- Al menos una dosis de las homogeneizaciones y secreciones-excreciones de las larvas estériles y no estériles de las larvas de la mosca *Lucilia sericata* tienen un efecto antibacterial en *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms.

Hipótesis Nulas (H0)

- Todos los tratamientos evaluados en el presente estudio tienen el mismo efecto de esterilización en huevos de *Lucilia cuprina*.
- Todas las dosis de larvas evaluadas en este estudio tendrán el mismo efecto inhibitorio en el crecimiento de las colonias, *Pseudomonas aeruginosa*

II. ESTERILIZACIÓN EXTERNA DE HUEVOS DE MOSCA *Lucilia cuprina* (DIPTERA:CALLIPHORIDAE)

RESUMEN

La necesidad de encontrar nuevas herramientas que puedan combatir las infecciones resistentes a antibióticos crece día con día en el ámbito médico, es por ello que el uso de nuevas herramientas tales como larvas de dípteros (Calliphoridae) son aceptados en el manejo de heridas necrosadas, por ello el presente estudio tuvo como objetivos: evaluar la viabilidad de la sumersión en agua esteril a diferentes tiempos de huevos de cuatro especies de dípteros (Calliphoridae): *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata*, *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), *Chrysomya rufifacies* (Macquart), y evaluar diez diferentes tratamientos descritos como agentes desinfectantes en los huevos de *Lucilia cuprina*. La cria de moscas se realizó en el Laboratorio de Investigación en Entomología en Ciencias Forenses (F.L.I.E.S. Texas A&M University), y el proceso de esterilización de huevos en las instalaciones de laboratorio microbiología ambiental del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (U.S.D.A.), durante el periodo de enero a junio de 2011. Los resultados obtenidos muestran que: *Cochliomyia macellaria* mostró un alto índice de eclosión +/-91% en todos los tiempos; sin embargo, *Lucilia sericata* mostró un bajo índice de eclosión +/-48% en todos los tratamientos. En cuanto a los diez tratamientos, el tratamiento con mas alta tasa de eclosión fue con NaClO con un 86.85%, seguido de ETOH 70% con un 74.36% de eclosión, las tasas más baja de eclosión fueron NaClO/Formaldehido 50.08% y Formaldehido 59.84%. En cuanto a los más altos índices de esterilidad, los presentaron Lysol 10% con 99.70%, seguido de NaClO/Formaldehido

con 99.50% y NaClO con un 97%, el más bajo índice de esterilidad los presentó Formalina 5% con 71%. Por lo tanto el NaClO puede utilizarse en el proceso de esterilización garantizando un alto índice de eclosión.

INTRODUCCIÓN

El uso de larvas de moscas (Díptera: Calliphoridae) juega un papel importante en el área forense y médica, pero cabe destacar que en esta última no todas las especies causan efectos benéficos en las heridas, solamente algunas especies han sido descritas. Desde tiempos antiguos la infestación de heridas con larvas o gusanos, fue descrita, pero el primero en descubrir sus beneficios para el tratamiento de las heridas necrosadas se llevo a cabo por William Baer (1931). A partir de ese momento el uso de larvas se extendió, no obstante en la década de 1940 las larvas se dejaron de usar como consecuencia de la aparición de los antibióticos. Sin embargo, en los 80's se retomo su importancia debido a la resistencia bacteriana a los antibióticos (Sherman *et al.*, 1988). Siendo a la fecha una herramienta efectiva en el tratamiento de infecciones que fue aprobada por la F.D.A. (Food and Drugs Administration) en 1994 (Sherman *et a.*, 2000). La terapia larval funciona de tres principales maneras: desinfección, desbridamiento y la estimulación de la cicatrización de las heridas (Mumcuoglu., 2001).

La superficie externa de los huevos de las moscas están contaminados con bacterias (Lam *et al.*, 2007), los cuales requieren ser esterilizados previamente al tratamiento (Baer., 1931). Sin embargo, previas investigaciones mencionan dificultades en la esterilización en fase larval (Livingston, 1936), de ahí la gran necesidad de búsqueda de nuevos métodos de esterilización de huevos. Los primeros intentos de esterilización se llevaron a cabo con Baer (1931) utilizando cloruro de mercurio , alcohol y acido clorhídrico; sin embargo, no hay datos acerca de la tasa de eclosión ni eficiencia de esterilización. Simmons (1934) esterilizó huevos de *Lucilia sericata* con formalina al 5 % y al 1% con hidróxido de sodio, pero este tratamiento desafortunadamente no mata bacterias tales como *Clostridium*

perfringens o *C tetanii*. Estudios posteriores han usado una variedad de materiales, incluyendo Lysol al 3% (Sherman., 1995; Sherman., 1996), etanol 70% (Brookes., 1961; Moorer., 2003; Mohd Masari *et al*, 2005), hipoclorito de sodio (Teich., 1986) cloruro de mercurio (Mackerras., 1933), hidróxido de sodio (Brookes., 1961), formalina (Figuerola *et al.*, 2007), cloruro de zepheran (Brookes., 1961), clorhexidina (Mohd Masari *et al.*, 2005), el formaldehído (Horn *et al.*,1976; Jaklic *et al.*,2008) y la luz UV (Mohd Masari *et al.*, 2005).

La gran variedad de técnicas de esterilización de huevos, junto con las diferencias en la eficiencia y la tasa de eclosión sugiere la necesidad de validar diferentes métodos, es por ello que el presente estudio se divide en dos partes: el primero, es la evaluación de la tasa de eclosión posterior a la sumersión en agua esteril durante diferentes tiempos (1, 3, 5, 7 y 10 min) comparando cuatro especies de Calliphoridae: *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), *Chrysomya rufifacies* (Macquart) , *Lucilia sericata* y *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), y el segundo, es la validación de diez técnicas de esterilización con dos especies ampliamente reconocidas por su gran actividad dentro de las heridas y/o larvaterapia, *Lucilia cuprina* (Diptera:Calliphoridae)

OBJETIVOS

- Evaluar la tasa de eclosión de los huevos de *Lucilia sericata*, *Lucilia cuprina*, *Cochliomyia macellaria* *Chrysomya rufifacies* sumergidos a diferentes tiempos en agua estéril.
- Evaluar la eficiencia de la esterilización de los diez diferentes desinfectantes y agitación descritos en *Lucilia cuprina*
- Evaluar la tasa de eclosión de huevos de *Lucilia cuprina* con agitación y enjuagues.

REVISIÓN DE LITERATURA

Familia Calliphoridae

La familia Calliphoridae contiene más de 1000 especies en 150 géneros (Rognes., 1991), son localizadas a nivel mundial (Byrd *et al.*, 2010) son conocidas como conocidas como: moscardones, moscas panteoneras, moscas verde botella, carroñeras y moscas azules entre otros, desde los tiempos antiguos son conocidas como una de las familias más abundantes, algunos pasajes históricos revelan la importancia de las moscas a través del tiempo, tal es la biblia, Éxodos 8:21. 24. “ Mas si no quieres dejar ir a mi pueblo, he aquí que yo enviare un enjambre de moscas sobre ti y tus siervos.....” (Greenberg., 1973), el Hortus sanitatus, uno de los más antiguos libros de medicina publicado en Mainz 1491 (Greenberg., 1973), los papiros egipcios el desarrollo de las larvas ya se conocía en 1550 A.C., Por otro lado en la “Iliada” de Homero, Aquiles mostró su temor a los moscardones, por el hecho de ovipositar sus huevos sobre cadáveres y producir larvas que dejaban el cuerpo irreconocible

(Rognes., 1991; Henning., 1973). La invasión de heridas por larvas ha sido usada por aborígenes australianos y por los mayas en México y Centroamérica. (Weil *et al.*, 1933) En 1557, en la batalla de S. Quintin, el primero en observar sus beneficios fue Ambrosio Pare (Massari., 2008) Los primeros en usarlas intencionadamente fueron los médicos del ejército americano confederado J. Jones y JF. Zacharias durante la guerra civil norteamericana. (Chernin., 1986; Massari., 2008). En 1928, el Dr. WS. Baer, ortopedista de Johns Hopkins que había observado estos beneficios en soldados heridos, fue el primero en usarlas como antisépticos vivientes por lo que se le considera el padre de la terapia larval pues en su tiempo la convirtió en el tratamiento de elección para heridas crónicas. (Wollina *et al.*, 2000).

Durante la década de 1930, el uso de larvas tuvo un gran auge y se utilizaba en Estados Unidos, Canadá y Europa (Robinson., 1935). Ante la aparición de los antibióticos, el uso de larvas se dejó de usar. Pero no fue hasta la década de 1980 donde volvió a surgir el gran interés por el uso de larvas para la desbridación de heridas, esto debido a la aparición de multi-resistentes bacterias a la meticilina como *Staphylococcus aureus* (Nigam *et al.*, 2006),

En 1989, se retomó la LT de forma científica y depurada por el Dr. R. Sherman en California iniciando así la era de la LT moderna. (Jones., 2000). En el 2004, Food and Drug Administration autorizó al Dr. Sherman la producción y la comercialización de larvas para el desbridamiento de heridas necrosadas, a partir de este momento su comercialización y su investigación ha llevado el interés de su estudio.

Este grupo de dípteros son principalmente atraídos por tejidos en descomposición, excremento, animales muertos, material vegetal, heridas expuestas (Byrd *et al.*, 2010) causando miasis. Estos dípteros son de importancia desde el punto de vista forense y médico, en cuanto a la primera su importancia radica en la biología de sus primeros estadios inmaduros, que sirven como herramienta en la determinación del intervalo post-mortem (Catts & Goff 1992), y en cuanto a la segunda se utilizan larvas estériles de varias especies para la desbridación de heridas necrosadas. Actualmente se conocen dos tipos de miasis: la benigna y maligna, la benigna es aquella en donde las larvas exclusivamente se alimentan del tejido muerto, respetando el tejido sano, un ejemplo de ello es la larvaterapia conocida también como miasis inducida, por otro lado, la miasis maligna es aquella en la que las larvas se alimentan tanto de tejido muerto como el sano (Sherman., 2000), en algunos casos causan severos daños a sus hospederos alimentándose de su tejido sano, tal es el caso de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae) (Napoleón *et al.*, 2009).

Las moscas que causan miasis se dividen en tres grupos principales: obligatoria, facultativa y accidental, los parásitos obligados son aquellos que solo se pueden desarrollar en hospederos vivos, los facultativos se pueden desarrollar tanto en hospederos vivos como muertos, (Sherman *et al.*, 2000) y la accidental es cuando los huevos o larvas son ingeridas a través de alimentos o bebidas llamado también “Pseudomiasis” (Manrique *et al.*, 1999).

La mayoría de estos dípteros son de apariencia metálica, con colores tales como verde botella, azul y negro brillante. Los insectos adultos miden aproximadamente entre 6 y 12 mm de largo como promedio, esto dependiendo de la especie y la alimentación en el estadio larval, los dípteros pueden llegar a su lugar de ovoposición por dos procesos: el

primero consiste en la detección de químicos a través de receptores en sus antenas (olfato) y el segundo en búsqueda visual. (Byrd *et al.*, 2010). Las hembras pueden ovipositar entre 150 a 200 huevos de 1.5 mm x 0.4 mm en lotes de color amarillo-blanco, en forma de bola de arroz, estos son ovipositados en cavidades tales como nariz y boca, aberturas corporales y heridas expuestas, la fase larval consiste en tres estadios (I, II y III), las larvas llegan a alcanzar un tamaño de 8 a 23 mm, con una coloración crema (Byrd *et al.*, 2010), su fase pupal puede durar entre 6 y 8 días dependiendo de la temperatura y la humedad hasta llegar a su fase adulto.

Lucilia cuprina

La mosca *Lucilia curprina* (Diptera:Calliphoridae) es conocida comúnmente como moscardones australianos, moscas bronce botella (Byrd *et al.*, 2010), *Lucilia cuprina* es comúnmente encontrada en Norte América, Asia, Australia y África. Estos dípteros habitan durante el periodo de primavera a otoño, con una temperatura promedio de 29° C, los adultos son atraídos principalmente por la carroña, excremento y algunas veces de fruta en descomposición, los adultos miden de 6 a 8 mm de longitud, son de un color amarillo-verde cobrizo opaco, su cuerpo es de forma ovalada, son insectos holometábolos, las hembras llegan a ovipositar dos o tres lotes de huevos, con alrededor de 200 huevos por lote, los huevos generalmente se convierten en larvas en un periodo de 12-24 horas, aunque en ocasiones es menor dependiendo de las condiciones ambientales, las larvas llegan a crecer un promedio de 10-15 mm de longitud en un periodo de tres días, posteriormente desarrollan su fase pupal en lugares secos y emergen dando lugar a moscas adultas.

Después de emerger las moscas de la pupa, necesitan proteínas para que sus órganos reproductores Las moscas adultas normalmente no viajan largas distancias,

Lucilia cuprina se utiliza a menudo como una herramienta muy útil para ayudar a los profesionales forenses y médicos, es conocida por ser una de las primeras moscas en colonizar cadáveres ayudando así formando un intervalo post-mortem, por otro lado, en el médico se ha descrito por la eficiencia de sus larvas en la desbridación de heridas causándoles una miasis benigna llamada también como larvaterapia (Aaron *et al.*, 2009)

Lucilia sericata

Las moscas *Lucilia sericata* (Díptera: Calliphoridae) conocidas comúnmente como moscardones, mosca verde botella, es una mosca de tamaño mediano, y su cuerpo presenta coloración metálica. Como todos los insectos son organismos ectotermos con una distribución cosmopolita, encontrándose principalmente en zonas tropicales. Son insectos holometábolos que pasan por los estados de huevo, larva (tres estadios), pupa y adulto. Los huevos generalmente presentan una coloración amarillenta, éstos son de aproximadamente 1.5 X 0.4 mm y al ser depositados tienen forma parecida a minúsculos granos de arroz. Alrededor de Las hembras ovipositan en lotes de 223 por promedio, en todo su ciclo de vida llegan a poner entre 3000 huevos (Wall., 1993; Fleischmann *et al.*, 2004). La eclosión de los huevos, en condiciones favorables ocurre alrededor de siete a ocho horas después de la ovoposición. La larva pasa a través de tres estadios de desarrollo (larva I, larva II y larva III). Las larvas viven en sustancias orgánicas en descomposición, pero en ocasiones parasitan en organismos vivos. Se ha descrito la presencia de sus larvas en humanos, sobre

heridas necrosadas. Actualmente las larvas son aplicadas a heridas necrosadas para su desbridación y al tratamiento se le conoce con el nombre común de *larvaterapia*.

***Cochliomyia macellaria* (Fabricius)**

Las moscas *Cochliomyia macellaria* mejor conocidas como gusanos barrenador secundario, son consideradas parasitos facultativos, ya que suelen estar presente como un invasores secundarios en los casos de miasis (Harrison *et al.*, 1968). Se localizas principalmente en climas cálidos y húmedos, por lo tanto no son comunes en climas fríos (Byrd *et al.*, 2010), La importancia de esta mosca radica en el ámbito forense, ya que *C. macellaria*, se encuentran dentro de los primeros colonizadores en los cadáveres, así como también en la carroña, las cuales juegan un papel importante como clave en el intervalo post mortem en los estudios forenses. A diferencia del gusano barrenador primario *Cochliomyia hominivorax*, *Cochliomyia macellaria* no se alimentan de tejidos vivos, sino que colonizan la herida y se alimentan de tejido necrótico.

Los adultos se distinguen fácilmente de otras especies por sus colores metálicos azul-verdoso, con tres rayas longitudinales oscuras pronunciadas en la superficie del tórax entre la base de las alas, estas bandas no se extienden al abdomen, las larvas tienen tráqueas respiratorias fácilmente visibles en su extremo posterior. Los adultos miden entre cinco y ocho mm de longitud, los adultos llegan a poner de 50 a 200 huevos, las larvas son de color crema y pueden alcanzar 17 mm de longitud en su tercer estadio, posteriormente las larvas pupan y emerge una mosca adulta.

***Chrysomya rufifacies* (Macquart)**

Las moscas *Chrysomya rufifacies* son mejor conocidas como larvas peludas o larvas del ganado. Son originarias de las regiones orientales de Australia y del trópico, son intolerantes a climas fríos, *Chrysomya rufifacies* frecuentemente se encuentra acompañada de *Chrysomya megacephala*, las cuales son muy similares en tamaño (Gennard., 2007). Los adultos miden de 6-12mm de longitud, son insectos holometábolos, la hembra puede ovipositar un promedio de 200 a 350 huevos, sus larvas maduras miden aproximadamente 14 mm de longitud su coloración es amarillenta, sus larvas presentan espinas a los costados de sus tubérculos, de ahí el nombre común, “larvas peludas” *Chrysomya rufifacies* es una de las principales colonizadores de los cadáveres, a menudo en cuestión de horas después de la muerte, la pupación ocurre cerca de la superficie del suelo o de carne en descomposición, posteriormente los adultos emergen renovando el ciclo de esta mosca.

Métodos de esterilización de huevos de moscas

El uso de larvas de mosca para la desbridación actualmente es una herramienta muy usada en el ámbito médico para la desbridación de heridas necrosadas, Mumcuoglu (2001) describe tres funciones de la larva dentro de la herida: desinfección, desbridamiento, y la estimulación de la cicatrización de heridas. En un inicio las larvas utilizadas en los tratamientos no eran estériles, esto trajo consigo resultados negativos, la superficie exterior de los huevos de las moscas son por lo general contaminadas de bacterias por lo cual deben ser esterilizadas previo al tratamiento (Lam *et al.*, 2007; Baer., 1931). Algunos casos a

consecuencia del uso de larvas no estériles los pacientes presentaron tétanos y erisipelas (Weil *et al.*, 1933), de ahí creció la necesidad de buscar medios para la esterilización de huevos de mosca, Livingston (1936) mostró la gran necesidad de esterilizar los huevos de mosca antes del tratamiento, Los primeros intentos de esterilización de huevos fueron llevados a cabo mediante una solución de cloruro de mercurio, alcohol y ácido clorhídrico (Baer., 1931). Simmons (1934) llevo a cabo el método de esterilización de los huevos de *Lucilia sericata* con formalina al 5% e hidróxido de sodio al 1% , pero los resultados no fueron del todo favorables, este método no mataban bacterias como *Clostridium perfringens* o *tetanii C.* Estudios posteriores mencionan una variedad de materiales, tales como enjuagues con etanol al 70% (Brookes., 1961; Moorer., 2003; Mohd Masari *et al.*, 2005), hipoclorito de sodio (Teich., 1986), cloruro de mercurio (Mackerras., 1933), hidróxido de sodio (Brookes., 1961), formalina (Figuroa *et al.*, 2007), cloruro de zepheran (Brookes., 1961, Teich., 1986), clorhexidina (Mohd *et al.*, 2005), el formaldehido (Horn *et al.*, 1976; Jaklic *et al.*, 2008), luz UV (Mohd *et al.*, 2005),y el uso de Lysol 3% durante periodos de 5-6 minutos (Sherman *et al.*, 1996), este último fue aceptado por la FDA en el 2004.

MATERIALES Y MÉTODO

Área de estudio

La cría de moscas se desarrollo en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Entomología en Ciencias Forenses (F.L.I.E.S. Texas A&M University por sus siglas en ingles), localizado en College Station, Texas, Estados Unidos; y el proceso de esterilización de huevos se llevo a cabo en las instalaciones del laboratorio microbiología ambiental 119 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (U.S.D.A. por sus siglas en ingles) localizado en College Station, Texas. Estados Unidos. Durante el periodo de Enero 2011 a Junio 2011.

Material Biológico

Las colonias de moscas *Cochliomya macellaria* y *Chrysomya rufifacies* fueron colectadas de carroña en el Condado de Brazos Texas y otorgadas por Adrienne Brundage de la Universidad de Texas A&M College Station, así mismo las especies *Lucilia sericata* y *Lucia cuprina* fueron colectadas en el 2010 en California y otorgados por el Dr. Aaron Tarone del departamento de entomología Universidad de Texas A&M College Station.

Cría de la moscas

Las moscas se criaron bajo condiciones controladas de luz: obscuridad (12:12 h) con una temperatura de 27° C y una humedad relativa de 50%, en jaulas de polipropileno de 45 cm³ (Bioquip Products, Rancho grande Ca. USA), cada jaula conto con una población de 500 a 600 moscas. Se les proporciono hígado durante los primeros cuatro días de emerger de la

pupa como fuente de proteínas, su alimentación consistió en azúcar granulada (Great Value, Walmart Inc. Bentonville USA) y agua estéril (Figura 1).

La oviposición de las moscas se logró mediante la colocación de 10 gr de hígado fresco de bovino durante 4 horas, las larvas de mosca fueron criadas con 50 gr de hígado de bovino, vermiculita (F1153, Sunshine E.U.) en frascos tapados de vidrio de 1 Litro (E5646,Kerr, E,U) con tapas cubierto de papel (05812,Wypall L30 E.U.) a 27° C. Por otro lado los huevos para experimentación fueron colectados del hígado y des aglutinados antes de su esterilización (Figura 2).



Figura 1. Jaula entomológica para crianza y oviposición de adultos



Figura 2. Colecta de huevos de moscas



Figura 3. Esterilización de huevos de mosca

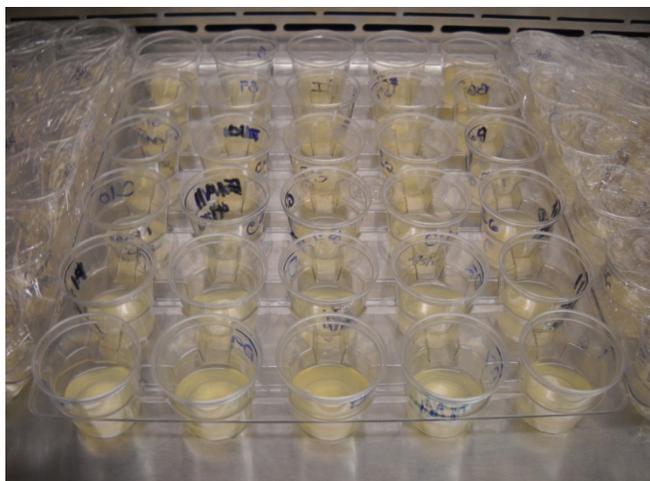


Figura 4. Eclosión de los huevos de las moscas a las 24 horas

Bioensayos

Desaglutinación de los huevos

Los huevos fueron desaglutinados para garantizar la eficiencia máxima del experimento. Los primeros estudios para la des aglutinación se utilizaba sulfito de sodio, pero esto llevó a una tasa de eclosión baja y la eliminación de corion del huevo (Connell., 1991). Por lo tanto, para el presente estudio se utilizó la des aglutinación física los huevos fueron retirados del medio de ovoposición y colocados sobre una tela húmeda negra 25 cm² de área, los huevos fueron manipulados físicamente con un pincel para facilitar su des aglutinación

Inmersión en agua estéril

Para determinar la capacidad de cada especie en inmersión en agua de fue determinado de la siguiente manera: los huevos fueron obtenidos de las diferentes colonias de especies de mosca y desaglutinados , los huevos de las cuatro especies fueron sumergidos en agua

DH₂O de osmosis inversa durante diferentes tiempos (1, 3, 5, 7 y 10 minutos) , cada tratamiento consistió en 35 muestras con 10 huevos cada una, incluyendo el testigo con tres repeticiones cada tratamiento. Los huevos fueron colocados sobre tela negra de 3.5 cm² el cual fue doblada, cada muestra se sumergió en 10 ml de agua de osmosis inversa durante el tiempo de tratamiento correspondiente, posterior al tiempo de cada muestra se seco sobre toallas de papel (20389, Tormatic, Atlanta, E.U.), se colocaron en vasos de plástico de 25 ml y se incubaron a 27° C por 24 horas . Después del tiempo de incubación se observo la tasa de eclosión de cada muestra, mediante un estereoscopio a (39081, Carl Zeiss, Germany).

Agentes desinfectantes

Para poder probar la reacción de los diferentes agentes desinfectantes, se utilizaron huevos de la especie de *Lucilia curprina* donde se escogieron 10 tratamientos citados en la literatura por su alta eficiencia en la esterilización de los huevos (Figura 3), así como también en la alta tasa de eclosión (Figura 4) , los tratamientos utilizados en este experimento fueron:

- a) Sumersión en formaldehido 5% (Aqua Solutions, Texas ,E.U.) por 5 minutos (Simmons., 1934).
- b) Sumersión en Lysol 3% (Reckitt Benckiser, Estados Unidos) por 5 minutos Mackerras ., 1933; Sherman ., 1996).
- c) Sumersión en Lysol 3% por 10 minutos (Mackerras ., 1933; Sherman et al., 1995).

- d) Sumersión en Hipoclorito de sodio “bleach” (Home Life, MN, E.U) 0.05% por 5 minutos, posteriormente sumersión en formaldehido 5% por 5 minutos (Mumcuoglu *et al.*, 2001).
- a) Sumersión en formaldehido 5% por 5 minutos (Horn *et al.*, 1976; Jacklic *et al.*, 2008).
- b) Enjuague con etanol 70% posteriormente enjuague con Cloruro de benzalconio 0.8 (Brookes *et al.*, 1961).
- c) Tres enjuagues de Hipoclorito de sodio “Bleach” diluido 1:50 (Teich., 1986).
- d) Enjuague de Cloruro de benzalconio + enjuague con ethanol 70%; (Connell., 1981).
- e) Enjuague y evaporación por 5 minutos en etanol 95% + sumersión en Sporgon por 5 minutos (Crippen *et al.*, 2006).
- f) Sumersión en formaldehido 10% por 5 minutos (Figuroa *et al.*, 2007).

El hipoclorito de sodio (bleach) , etanol al 95% y 75% fueron diluidos con agua estéril, sin embargo el sporgon fue trabajado en su formulación comercial , cada tratamiento consistió en 10 muestras con 30 huevos cada una, esto para garantizar una alta probabilidad de la diversidad genética y aumentar al máximo la eficiencia. Los huevos desaglutinados fueron colocados en papel filtro de 13 mm 20.0 µm (1213801, Magna) y colocados dentro de filtros para jeringa reusables de 13mm (16514, Biotech Alemania).

Se utilizaron jeringas estériles de 10 ml para utilizar los diferentes desinfectantes a probar, posteriormente los huevos fueron lavados con solución salina durante dos veces con 10 ml c/u (Figura 3). Para colectar una muestra de bacterias presentes en la superficie externa del huevo se realizo un pre-lavado, los huevos desaglutinados fueron sumergidos en 1ml de

caldo soya tripticaseina (TSB, Difco Saprks MD) a temperatura ambiente, , para cada uno de los tratamientos se realizó un post-lavado por inmersión de los huevos en 1 ml de TSB, tanto el pre-lavado con TSB y el post lavado en TSB se realizaron una serie de diluciones 10^{-7} y se sembraron 100 μ l de cada uno en cajas petrí con agar sangre (KORD-VALMARK, Canada) y fueron incubados durante 18-24 horas a 30 ° C para poder calcular su carga bacteriana (Figura 5). La carga bacteriana en el UFC (Unidades formadoras de colonias) se determinó después de la incubación. Después del pre lavado y post lavado los huevos fueron colocados en contenedores con agar nutritivo (NA) y fueron incubados durante 24 horas a 27° C, los huevos fueron observados mediante un estereoscopio para poder tomar la tasa de eclosión.

Una alícuota de pre y post lavado de cada tratamiento, se enriqueció mediante la incubación durante 24 horas a 37° C para asegurar la detección de las células bacterianas bramando el umbral de la galvanoplastia de 10 U.F.C. Enriquecido la alícuota se realizaron una siembra de 100 μ l de cada una en cajas con agar sangre y se incubaron durante 18-24 horas a 37° C. Diez huevos de cada tratamiento montaron y se tiñeron con permanganato de potasio para visualizar el corion del huevo (Kom *et al.*, 2004).

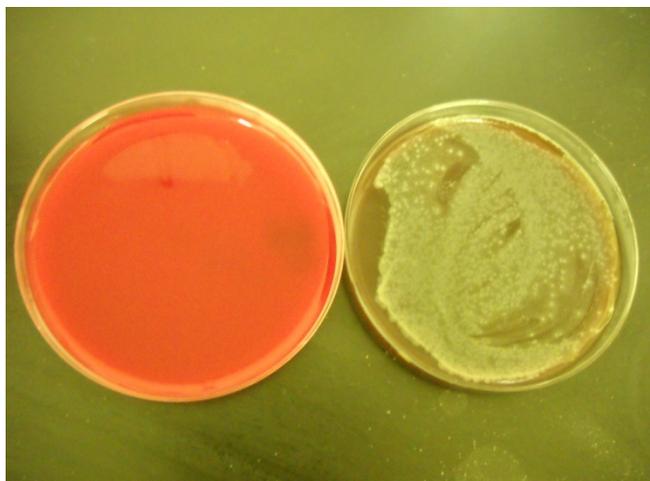


Figura 5. Cajas de medio de cultivo de agar sangre posterior a los tratamientos.

Desinfección de huevos con agitación y enjuagues.

En el proceso de desinfección con agitación y enjuague se probaron las siguientes agentes: sporgon, NaClO .5%, lysol y solución salina, cada tratamiento consistió en 10 muestras con 30 huevos cada una, esto para garantizar una alta probabilidad de la diversidad genética y aumentar al máximo la eficiencia, la metodología fue seguida como la anterior descrita en agentes desinfectantes, las muestras fueron agitadas (Rotoshake, Genie Scientific Industries USA) durante 5 minutos con cada tratamiento, en cuando al proceso de enjuague las muestras fueron enjuagadas por tres veces con 10 ml c/u, ambos tratamientos fueron enjuagados dos veces con solución salina y posteriormente colocados en pequeños contenedores con agar para su eclosión (Figura 6).



Figura 6. Agentes desinfectantes con agitación.

Análisis estadístico

A los datos de tratamientos de inmersión se les aplicó un Análisis de varianza, para determinar el efecto de los tratamientos y la prueba de medias Tukey (∞ 05%) para definir cual es el mohor trataminieto. Los datos de UFC se analizaron mediante regresión logística y enriquecimiento de datos fueron analizados por regresión logística exacta (SPSS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La esterilización de los huevos de mosca utilizados con fines terapéuticos es de suma importancia, evitando así posibles complicaciones a consecuencia del uso de larvas no estériles tales como: tétanos y erisipelas (Weil et al., 1935), por ello con el nivel de inmersión en agua des ionizada, la esterilización de los productos desinfectantes y las pruebas de agitación se obtuvieron los siguientes resultados.

Tasa de eclosión en inmersión agua estéril

Los huevos de moscas *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), *Chrysomya rufifacies* (Macquart), *Lucilia sericata* y *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), fueron sumergidos en diferentes tiempos (1,3, 5, 7 y 10 min) en agua. Cabe mencionar que este estudio se realizo con la finalidad de observar si el agua causa mortalidad en los huevos de mosca y así poder utilizar los diez diferentes tratamientos de esterilización.

Nivel de eclosión de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius)

Los resultados de los diferentes tiempos de sumersión (1, 3, 5, 7 y 10 min) de *Cochliomyia macellaria* no mostraron diferencia significativa entre ellos ($p < .05$), en los 3 y 5 minutos se mostró un 93 % de tasa de eclosión (Figura 7), sin embargo a 1 minuto y 5 minutos mostraron una tasa de eclosión del 90%, por último a los 10 minutos mostraron un 89% de eclosión, cabe mencionar que no existen estudios previos que muestren la sumersión de los huevos de mosca *Cochliomyia macellaria*.

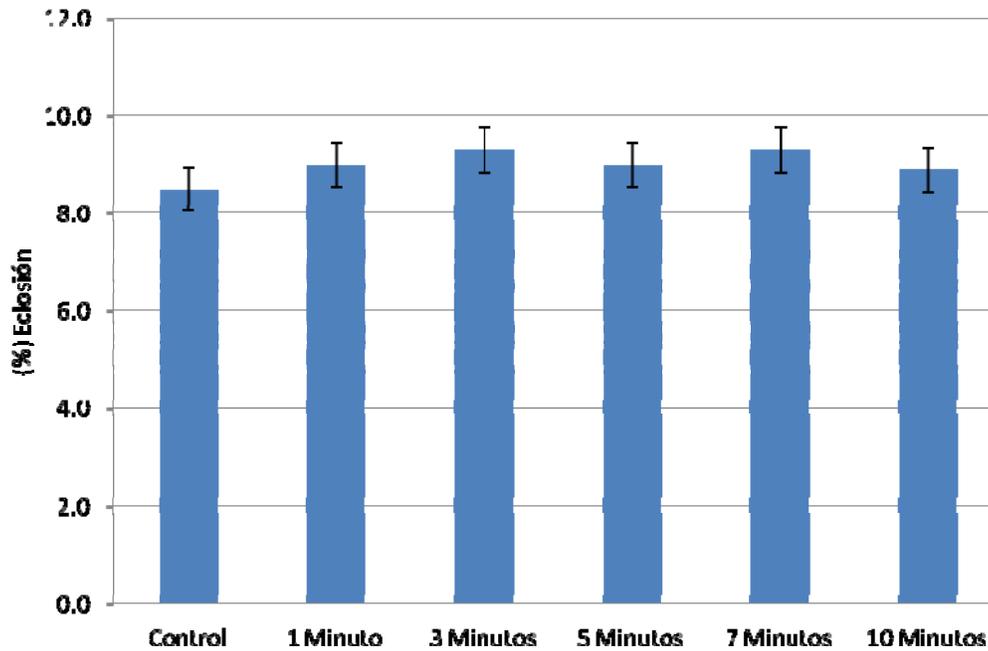


Figura 7. Porcentaje de eclosión de huevos de *Cochliomyia macellaria* posterior a los diferentes tiempos (minutos) de sumersión en agua destilada ($p < .05$).

Nivel de eclosión de *Chrysomya rufifacies* (Macquart)

Los niveles de eclosión de *Chrysomya rufifacies* (Macquart) no mostrando diferencia significativa ($p < .05$), los resultados obtenidos muestran que a teniendo a los 3 y 7 minutos un 93% de eclosión, así mismo a 1 y 5 minutos se obtuvieron un 90%, en cuanto a los 10 minutos el que más bajo nivel de eclosión presentó con un 89% (Figura 8).

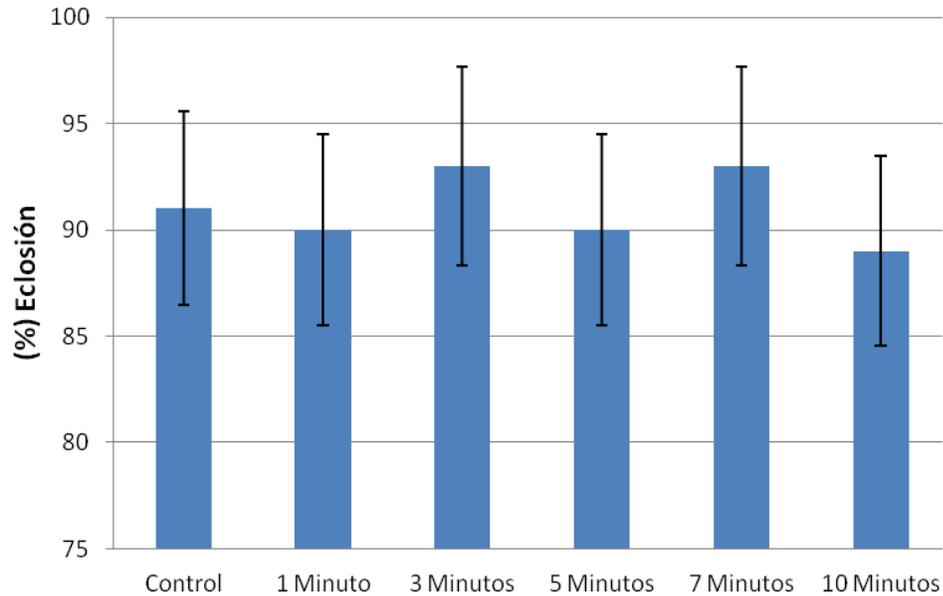


Figura 8. Porcentaje de eclosión de huevos de *Crysomya rufifacies* posterior a los diferentes tiempos (minutos) de sumersión en agua destilada ($p < .05$).

Nivel de eclosión de *Lucilia cuprina*

El índice de eclosión de huevos de *Lucilia cuprina* mostraron diferencia significativa ($p < .05$), a los 10 minutos de sumersión presento un 73% de nivel de eclosión, seguido de 7 minutos con un 68%, en un 1 minuto se obtuvo un 65%, y para 3 y 5 minutos se obtuvo un 63%. (Figura 9) Cabe mencionar que en comparación con *Chrysomya rufifacies* y *Cochliomyia macellaria*, *Lucilia cuprina* tiene una menor tasa de eclosión. Por lo tanto el promedio de tiempo de eclosión de *Lucilia cuprina* es de 66% (Figura 11).

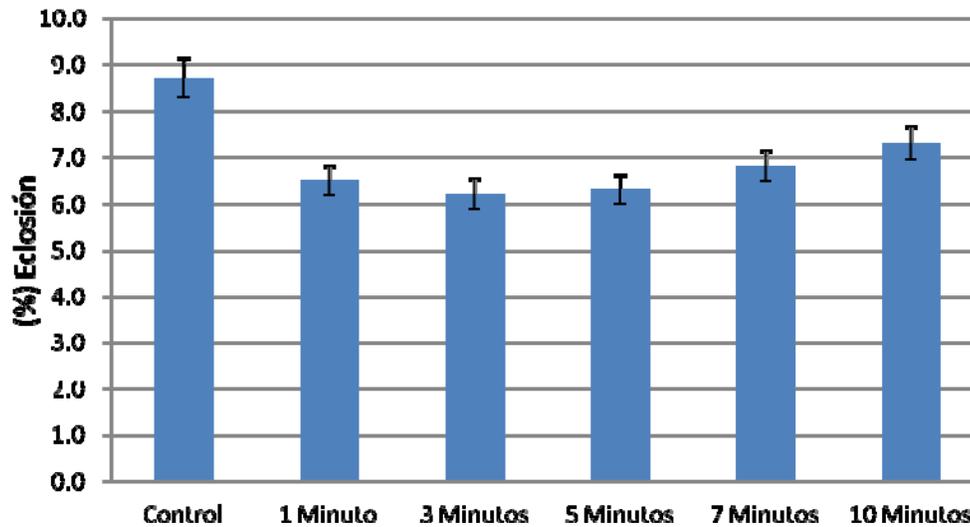


Figura 9. Porcentaje de eclosión de huevos de *Lucilia cuprina* posterior a los diferentes tiempos (minutos) de sumersión en agua ($p < .05$).

Nivel de eclosión de *Lucilia sericata*

El índice de eclosión de huevos de *Lucilia sericata* no mostraron diferencia significativa ($p < .05$), los resultados muestran que a los 7 minutos de sumersión presentó un nivel de eclosión de 51% , seguido de 5 minutos con un 49%, 3, 5 y 7 minutos presentaron un 47% (Figura 10). El promedio total de tiempo de eclosión de *Lucilia sericata* es de 48% de eclosión (Figura 11), la cual la coloca por debajo de *Chrysomya rufifacies*, *Cochliomyia macellaria* y *Lucilia cuprina*.

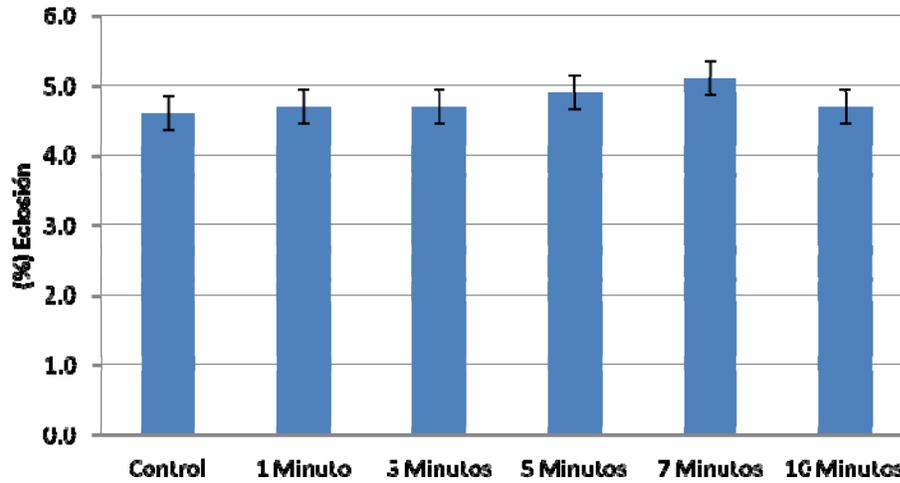


Figura 10. Porcentaje de eclosión de huevos de *Lucilia sericata* posterior a los diferentes tiempos (minutos) de sumersión en agua destilada ($p < .05$).

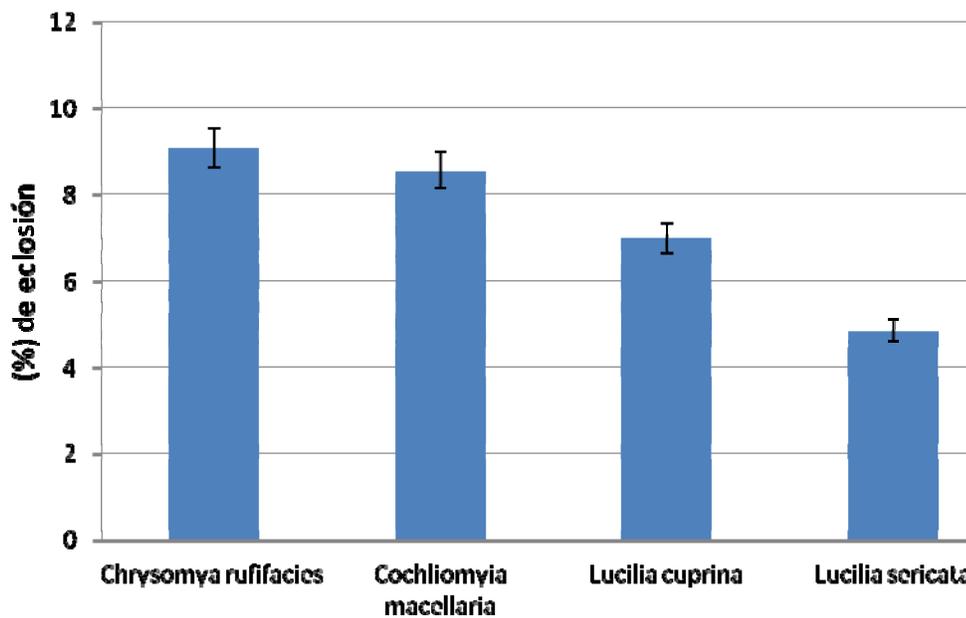


Figura 11. Porcentaje de eclosión de huevos de *Chrysomya rufifacies* y *Cochliomyia macellaria*, *Lucilia cuprina* y *Lucilia sericata* posterior a los diferentes tiempos (minutos) de sumersión en agua destilada ($p < .05$).

Productos desinfectantes con *Lucilia cuprina* Tasa de eclosión y Nivel de esterilización de *Lucilia cuprina*

Teich (1986) menciona la efectividad en esterilización de huevos de la familia *Calliphoridae* utilizando tres enjuagues de Hipoclorito de sodio (1:50), pero no describe la tasa de eclosión, en cuanto a los resultados obtenidos en el presente estudio, los enjuagues con NaClO tuvieron la más alta tasa de eclosión con un 87% (Figura 12), sin embargo obtuvieron un promedio de contaminación post tratamiento de 2.1×10^7 UFC (Cuadro 1) (Apéndice)

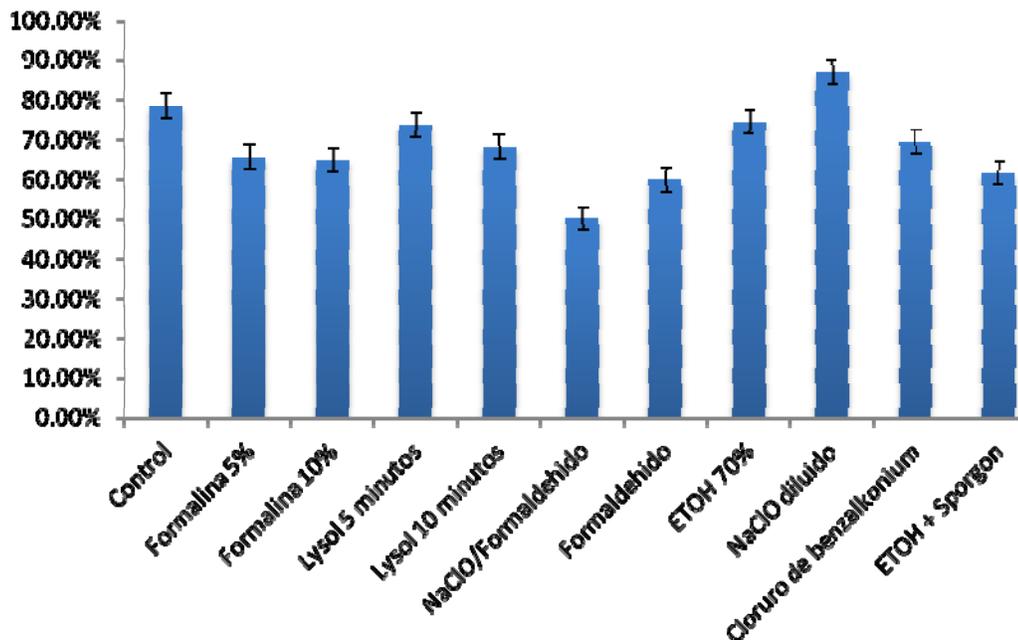


Figura 12. Porcentaje de eclosión de las diferentes agentes desinfectantes en huevos de *Lucilia cuprina* ($p < .05$).

Sherman *et al.*, (1996) menciona la efectividad del método de esterilización con Lysol 3% durante 5 minutos seguido de dos lavados con solución salina en huevos de *Lucilia sericata*, sin embargo, la tasa de eclosión no es mencionada, en los resultados obtenidos se

obtuvo un promedio de 74 % de tasa de eclosión de *Lucilia cuprina* (Figura 12), así mismo el porcentaje de contaminación de los huevos post tratamiento fue de 1.4 % 10^7 UFC (Cuadro 1).

Crippen *et al.*, (2004), al evaluar una combinación de tratamiento con un ETOH 75% con agua estéril y obtuvo una disminución en las poblaciones de bacterias en las superficies de los escarabajos. En cuanto a los resultados obtenidos con ETOH 70% se obtuvo un 12.1 % 10^7 UFC (Cuadro 1), colocándolas dentro de las más contaminadas y no siendo un método de esterilización tan recomendable para las larvas, por otro lado, su tasa de eclosión la coloca dentro de los mejores métodos con un promedio de 74% de sobrevivencia. Brookes (1961) menciona efectividad del enjuague con ETOH 70% posteriormente enjuagado con Cloruro de benzalconio 0.8 en huevos de *Phormia regina*, en cuanto a nuestros resultados se obtuvo un porcentaje de contaminación de los huevos post tratamiento fue de 2.1 % 10^7 UFC (Cuadro 1), así mismo se obtuvo un 69% de eclosión en los huevos de *Lucilia cuprina* (Apéndice).

Cuadro 1. * Medias con letras distintas son significativamente diferentes, con nivel de significancia de ($P < 0.001$)

Tratamiento de desinfección	Pre lavado	Post lavado	
	Media UFC +/- Error Estándar	Media UFC	+/- Error Estándar
Formalina 5% 5 min	5332.5755 b +/- 1.631	495.5156a +/-	1.631
Formalina 10% 5 min	5332.5755 b +/- 1.630	9.5658a +/-	1.630
Lysol 5 min	5332.5755 b +/- 1.196	1.4388a +/-	1.196
Lysol 10 min	5332.5755 b +/- 0.000	0a	0.000
NaClO + Formaldehido	5332.5755 b +/- 1.238	1.6540a +/-	1.238
Formaldehido 5 min	5332.5755 b +/- 1.422	3.1869a +/-	1.422
ETOH 70%	5332.5755 b +/- 1.903	12.1609a +/-	1.903
NaClO 5%	5332.5755 b +/- 1.381	2.1005a +/-	1.381
ETOH + Cloruro de Benzalkonio	5332.5755 b +/- 1.356	2.1112a +/-	1.356
ETOH + Sporgon	5332.5755 b +/- 1.827	20.0624a +/-	1.827

Sherman *et al.*, (1995) y Mackerras (1933) describen el uso de Lysol 3% por 10 minutos como método de esterilización en moscas *Lucilia sericata* señalando un gran efecto de esterilización, en cuanto a los resultados del presente estudio con *Lucilia cuprina*, Lysol 3% durante por 10 minutos mostró un 0% 10^7 UFC (Cuadro 1), lo cual la coloca como el mejor método de esterilización reportado, sin ningún índice de contaminación en los huevos estériles. En cuanto a su índice de eclosión se obtuvo un 69 % de sobrevivencia de los huevos, hasta ahora puede colocarse como el mejor método de esterilización reportado, así mismo la especie utilizada fue *Lucilia cuprina*, esto abre futuras investigaciones con otras especies como *Lucilia sericata* (Apéndice).

Simmons (1934) reporta la eficacia en el uso de Formalina 5% por 5 minutos en lotes de 200 a 300 huevos de *Lucilia sericata*, sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio con huevos de *Lucilia cuprina* mostraron un 495.1 % 10^7 UFC (Cuadro 1) (Figura 12) y un 66% de eclosión de los huevos, colocándose como la más contaminada de todos los tratamientos y no indicada como un método de esterilización de huevos. Por otro lado, Figueroa et al., (2007) reportó una gran eficacia en la esterilización de huevos de *Lucilia sericata* con 0.5 de hipoclorito de sodio y formalina al 10%, en cuanto a nuestros valores obtenidos con *L. cuprina*, se obtuvo un promedio de contaminación post tratamiento de 9.5% 10^7 UFC (Cuadro 1), este último tratamiento en comparación con formalina al 5%, obtuvo una reducción significativa en cuanto a la contaminación del post tratamiento de sus colonias (Apéndice).

Crippen et al., (2006) reporta una eficiencia del 98% en la esterilización externa de escarabajos con enjuague y evaporación por 5 minutos en etanol 95% y posteriormente con Sporgon durante 5 minutos, en cuanto a nuestros resultados con este método aplicado en huevos de mosca *L. cuprina*, se obtuvo un porcentaje de contaminación post tratamiento de 20.6% 10^7 UFC (Cuadro 1) (Figura 13), y una tasa de eclosión de 62% lo cual no la coloca una buena opción en el proceso de esterilización de huevos de mosca.

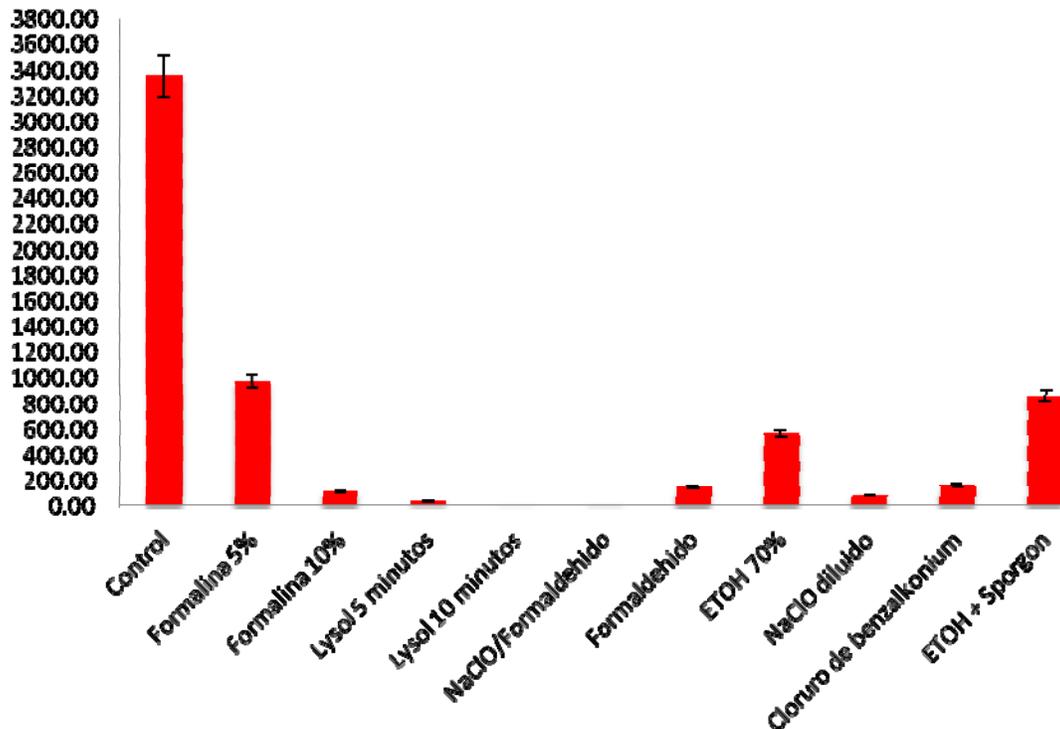


Figura 13. Cantidad de Unidades Formadoras de Colonias U.F.C. de las diferentes agentes desinfectantes en huevos de *Lucilia cuprina* ($p \leq .05$)

Mumcuoglu *et al.*, (2001) reporta eficacia en la esterilización de huevos de *Lucilia cuprina* con Hipoclorito de sodio 0.05% por 5 minutos, posteriormente sumersión en formaldehido 5% por 5 minutos, sin embargo, en nuestro estudio el índice de contaminación post tratamiento mostró un 20.0 % 10^7 UFC (Cuadro 1) (Figura 13) y un 50% de tasa de eclosión con este tratamiento, lo cual lo coloca como un tratamiento no indicado en el proceso de esterilización de huevos.

Desinfección con agitación

Tasa de eclosión con agitación y con enjuague.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los diez tratamientos descritos previamente se obtuvieron un alto índice de contaminación lo cual pudiera deberse a la falta de agitación en las muestras durante cada procedimiento, por ello se tomaron los tratamientos con los más altos índices de contaminación y el que menos tuvo, a si mismo se trabajaron por medio de agitación durante 5 minutos y enjuagados tres veces con solución salina estéril para descartar que la contaminación se debía de gravedad el que propiciara que los tratamientos no llegaran a superficies que los huevos no tenían expuestos. Los resultados contaminados solo se tomaron como positivos y negativos.

Los resultados obtenidos en cuanto a sporgon con agitación mostraron un 56% (Figura 14), sin embargo con enjuagues se obtuvo un 57% (Figura 15), por lo tanto no se mostró diferencia significativa entre los resultados, en cuanto a los cultivos con agitación se encontró un 53% de contaminación en agitación y un 63% en enjuague. Estos resultados colocan a sporgon como un método no es indicado en el proceso de esterilización de huevos de *Lucilia cuprina*

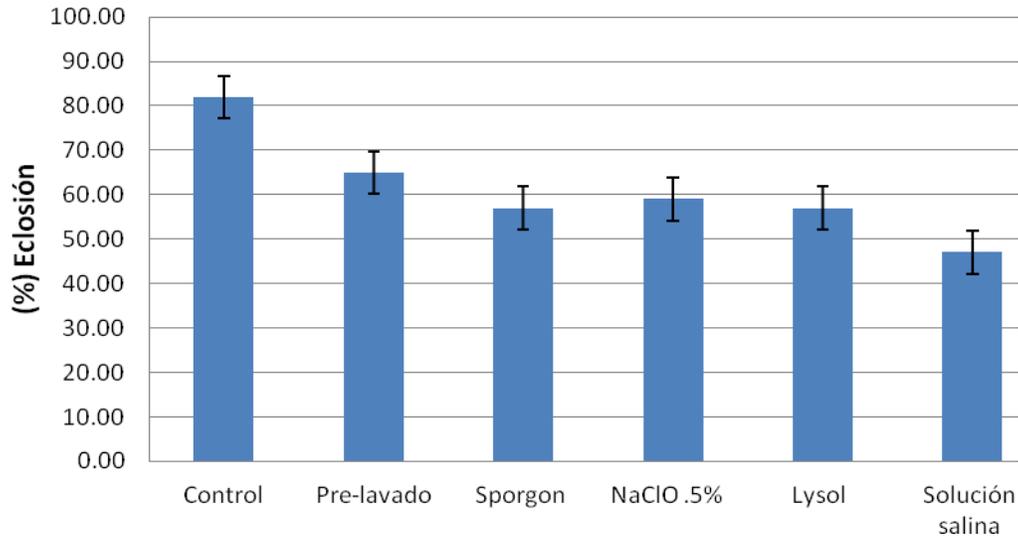


Figura 14. Porcentaje de eclosión de las diferentes agentes desinfectantes en huevos de *Lucilia cuprina* con agitación ($p < .05$).

En cuanto a NaClO con agitación y con enjuague los resultados no mostraron diferencia significativa, los huevos con agitación obtuvieron un promedio de contaminación post tratamiento de 93% y con enjuague un 87% (Cuadro 2), de acuerdo a estos resultados, hacen de NaClO un tratamiento no indicado en el proceso de esterilización de los huevos de moscas, tanto por su nivel de mortalidad como su índice de contaminación.

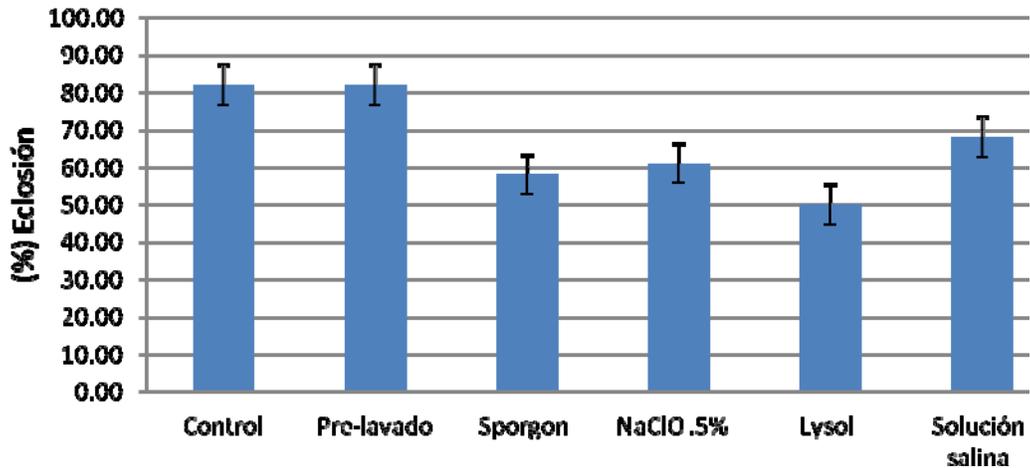


Figura 15. Porcentaje de eclosión de las diferentes agentes desinfectantes en huevos de *Lucilia cuprina enjuague* ($p < .05$).

La tasa de eclosión de huevos con agitación de Lysol fue 55% (Figura 14), sin embargo, el tratamiento con Lysol con tres enjuagues que se obtuvo una tasa de eclosión de 50%, por lo tanto no hay diferencia significativa en los tratamientos con y sin agitación, en cuanto al índice de contaminación post-tratamiento con agitación fue de 33% y con enjuague un 40% (Cuadro 2), por lo que no son indicadas en el proceso de esterilización de huevos.

Cuadro 2. Porcentaje de contaminación de las diferentes agentes desinfectantes en huevos de *Lucilia cuprina* con agitación y enjuague.

Tratamiento	No. Positivos Contaminados	Positivos (%) Contaminados
Control	30	100
Sporgon con agitación	16	53
Sporgon enjuague	19	63
NaClO .5% con agitación	28	93
NaClO .5% enjuague	26	87
Lysol con agitación	10	33
Lysol enjuague	12	40
Solución salina con agitación	30	100
Solución salina enjuague	29	96

Se mostró una diferencia significativa en la tasa de eclosión de con y sin agitación en cuanto a la solución salina (Figura 15) por lo que se mostró un alto índice de mortalidad en los huevos con agitación, en cuanto al promedio de contaminación post-tratamiento con agitación se obtuvo un 100% y un 96% en huevos con enjuague (cuadro 2).

CONCLUSIONES

- No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la tasa de eclosión de huevos de mosca sumergidos en agua en los diferentes tiempos con *Chrysomya rufifacies* y *Cochliomyia macellaria*. Sin embargo, los valores de *Lucilia cuprina* y *Lucilia sericata* si mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$).
- Los resultados de la presente investigación demuestran el potencial de desinfección de Lysol (10 y 5 minutos) y NaClO +Formaldehido como alternativas para la esterilización de los huevos de *Lucilia cuprina*. Por otro lado, Formalina 5%, ETOH 70% +Sporgon y ETOH 70% tuvieron bajo nivel de esterilización de huevos por lo tanto, no se recomienda como agentes esterilizantes.
- El nivel de eclosión diez tratamientos, demostró que NaClO diluido tuvo un nivel de eclosión de 87%, seguido de Lysol 5 minutos (74%) lo cual los coloca como los mejores métodos de de esterilización, sin embargo el que menor nivel de eclosión presentó fueron NaClO + Formaldehido con un 50% de eclosión, por lo cual no garantiza su viabilidad.

- En cuanto a los tratamientos con agitación lysol fue el mejor tratamiento el cual mostró un 76% de esterilidad el cual es una buena alternativa en el proceso de esterilización de huevos, sin embargo NaClO mostró un efecto contrario en el proceso de agitación con un 3% de efectividad.

III. Efecto de larvas *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) en *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms

RESUMEN

Las heridas crónicas son comúnmente asociadas a la formación de biofilms, formados de bacterias resistentes a antibióticos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, he de ahí la necesidad de búsqueda de nuevas alternativas para combatir las infecciones tales como el uso de larvas estériles de mosca *Lucilia sericata* (Diptera:Calliphoridae) sus tres mecanismos de acción larval son: secretan las enzimas digestivas que disuelven selectivamente el tejido necrótico, de desinfectar la herida, y por lo tanto estimular la cicatrización de la herida. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la homogeneización y secreción/excreción (SE) de 50 y 100 larvas instar II estériles y no estériles en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Se realizaron homogeneizaciones de 50 y 100 larvas, así mismo disoluciones de SE de 50 y 100 larvas, se concentraron durante 24 horas en *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. El homogeneizado de las larvas estériles alimentadas con hígado estériles no redujo el biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, en cuanto al estéril disminuyó entre 21 y 48%. Los SE de larvas estéril y no estériles disminuyo de un 66 a un 75%, el cual los hace una buena alternativa en la reducción del biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

La curación de heridas crónicas en el ser humano es un reto importante de la salud pública a nivel mundial, debido a que las técnicas empleadas son de alto costo y en algunos casos son pocos efectivos. En México no existen estadísticas que indiquen la proporción de personas con algún tipo de herida crónica, pero se calcula que el 15% de los diabéticos desarrollan una o dos úlceras durante el curso de la enfermedad (Frykberg *et al.*, 2000; Frykberg *et al.*, 1999). Tan solo en el año 2000 la Secretaría de Salud reportó 75,000 amputaciones por pie diabético (Medyweb, 2006). Las heridas son en general susceptibles a la infección debido al desarrollo de comunidades bacterianas dentro y alrededor de la herida, Un factor que incide en el retraso de la cicatrización de las heridas es la formación de biofilms (BF) .Debido a este crecimiento bacteriano se agrava el problema si tomamos en cuenta que la formación de biofilms de algunas bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* ha presentado resistencia a los antibióticos se ha mostrado que *Pseudomonas aeruginosa* aumenta el tamaño de la herida cuando esta se encuentra colonizándola (Gjodsbol *et al.*, 2006). Debido a esta razón se han buscado novedosos tratamientos que sean eficaces y de bajo costo; uno de ellos es la larvaterapia que ha mostrado ser un método eficaz en el manejo de heridas necrosadas sobre todo para aquellas infectadas con bacterias resistentes a los antibióticos, tal es el caso de *Staphylococcus aureus* (Sherman, 2002; Thomas *et al.*, 1999). En la larvaterapia se emplean larvas estériles de la mosca *Lucilia sericata* para tratar heridas necrosadas. El mecanismo de acción de las larvas en las heridas incluye la debridación del material necrótico, la desinfección de la herida por inducir la

muerte de bacterias y la estimulación del crecimiento de tejido sano (Mumcuoglu *et al.*, 2001).

Se ha documentado que el efecto bactericida de las excreciones/secreciones de las larvas es poco efectivo contra las bacterias Gram-negativas en particular contra *Pseudomonas* spp. y *Proteus* spp. (Cazander *et al.*, 2009; Jaklic *et al.*, 2008; Kerridge *et al.*, 2005; Steenvoorde y Jukema, 2004). Otros estudios muestran que existe una acción bactericida de las larvas en contra de *Escherichia coli* (Bexfield, 2008). *Pseudomonas aeruginosa* han mostrado un efecto tóxico contra larvas *Lucilia sericata* (Andersen, 2010). En México, la técnica se utilizó por primera vez en la División de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en el año 2000 (Contreras *et al.*, 2005) y en la actualidad se ha empleado en todos los continentes. La larvaterapia está aprobada por la Food and Drug Administration (FDA por sus siglas) y ha beneficiado a miles de pacientes en todo el mundo (Sherman *et al.*, 2000). El tratamiento de heridas crónicas con antibióticos es complejo y costoso debido a la presencia de capas de biofilms resistentes a los medicamentos, este problema es de carácter mundial y por eso se buscan alternativas para abatir estas limitantes.

La larvaterapia ha demostrado ser un tratamiento convencional eficaz y de bajo costo para tratar heridas infectadas por diferentes bacterias. La técnica es profiláctica y sustentable por lo que evita que las bacterias adquieran resistencia (Sherman, 2002). El tratamiento de heridas crónicas con antibióticos es complejo y costoso debido a la presencia de capas de biofilms resistentes a los medicamentos, este problema es de carácter mundial y por eso se buscan alternativas para abatir estas limitantes. La resistencia de la formación de biofilms a los medicamentos antimicrobianos, y el aumento del número de pacientes con heridas

infectadas son factores que hacen indispensable la búsqueda de tratamientos alternativos, por estas razones, el objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto de la homogeneización y secreción/excreción de larvas estériles y no estériles de segundo instar en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* PA14.

OBJETIVOS

- Evaluar el efecto de la homogeneización de 50 y 100 larvas instar II estériles y no estériles en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* PA14.
- Evaluar el efecto de secreción/excreción (SE) de 50 y 100 larvas instar II estériles y no estériles en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* PA14.

REVISION DE LITERATURA

Generalidades de las heridas

Las heridas crónicas (úlceras de pierna, pie diabético, úlceras por presión, dehiscencias, etc.) representan un porcentaje alto del gasto en salud. Tan sólo en EUA el costo para cicatrizar una úlcera por presión varía entre 500 y 40,000 USD (Lyder, 2003; Church, 1996) En México no contamos con estadísticas, pero se calcula que el 15% de los diabéticos desarrollan una o dos úlceras durante el curso de la enfermedad (Frykberg *et al.*, 2006).

El manejo de heridas constituye uno de los mayores problemas mundiales de salud pública, en donde las heridas crónicas (úlceras de pierna, pie diabético, úlceras por presión, dehiscencias, etc.) representan un alto porcentaje del gasto en salud. En México no contamos con estadísticas, pero se calcula que el 15% de los diabéticos desarrollan una o

dos úlceras durante el curso de la enfermedad (Frykberg et al., 2000; Frykberg et al., 1999). Tan solo en el año 2000 la Secretaria de Salud reportó 75,000 amputaciones por pie diabético (Medyweb 2006).

Las heridas infectadas son aquellas en las que ha transcurrido el tiempo suficiente como para que los microorganismos comiencen a desarrollar. Por lo general, se caracterizan por inflamación, dolor, exudado purulento y, posiblemente, fiebre asociada a neutrofilia en los últimos estadios de la infección. El tipo de herida varía según la extensión y la irrigación del tejido traumatizado; el número y la patogenicidad de las bacterias inoculadas en la herida; la cantidad y el tipo de desechos presentes; así como la edad y la inmunocompetencia del paciente. Uno de los factores que inciden en el retraso en la cicatrización de las heridas, es el crecimiento bacteriano. Su manejo no sólo es complejo, sino costoso.

Etiología de las heridas

Se entiende por úlcera, toda pérdida de sustancia de la piel debido a una causa local o sistémica y que no cicatriza, y herida, a toda lesión traumática de la piel con solución de continuidad de la misma. En las heridas las causas que la provocan, suelen ser externas, en las úlceras las causas suelen ser internas; por ello, para la curación de estas últimas, además del tratamiento local hay que tratar la causa intrínseca que las origina.

Cuando se produce una herida, el organismo pone en marcha de forma inmediata una serie de mecanismos celulares y químicos buscando la restitución del tejido lesionado hasta conseguir su curación. El proceso de curación pasa por dos fases: la cicatrización y la epitelización.

La fase de cicatrización implica desarrollar un nuevo tejido conectivo y vascular, se realiza en cuatro etapas: exudativa o catabólica, proliferativa o anabólica, reparativa y contracción. Para llegar a la etapa proliferativa en que los fibroblastos y células endoteliales forman tejido de granulación limpio es imprescindible que se haya producido el desbridamiento local de la fase catabólica. En la reparativa, las colagenasas de los fibroblastos, macrófagos y queratinocitos se encargan de reparar. En la última etapa las fibras contráctiles de los miofibroblastos hacen que la superficie de la herida vaya disminuyendo de tamaño. En la fase de epitelización se desarrolla nuevo epitelio. Sin embargo en algunas ocasiones este mecanismo no es suficiente y la herida se cronifica. Las úlceras se clasifican en estadios según el grado de daño tisular: Las úlceras y heridas crónicas sufren una cicatrización por segunda intención. Siempre están contaminadas y con frecuencia infectadas. Las heridas pueden ser agudas o crónicas: limpias, limpias-contaminadas, sucias e infectadas.

Tratamiento de úlceras y/o heridas necrosadas

El tratamiento local de las úlceras o heridas debe incluir: limpieza, desbridamiento, prevención de la infección y la colocación de un apósito. El necesario desbridamiento puede hacerse de forma mecánica, química, enzimática, quirúrgica o por larvas de mosca. En cuanto a los apósitos, en la actualidad, existen numerosos modelos (secos, húmedos, hidrocoloides, hidrogeles, alginatos, poliuretanos, dextranómeros y otros), pero son poco conocidos los apósitos de larvas de mosca.

Larvaterapia

La Larvaterapia es el uso de larvas estériles de la mosca *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) para la desbridación de heridas. El proceso con la utilización de larvas de mosca sobre heridas provoca tres efectos 1) desbridación del material necrótico, 2) desinfección de la herida por inducir la muerte de bacterias contaminantes y 3) estimulación del crecimiento de tejido sano. Aunque, las larvas de muchas especies de moscas producen miasis humana, sólo algunas se han utilizado con fines medicinales, en especial de la familia Calliphoridae, siendo la mosca verde *Lucilia sericata* la más estudiada hasta el momento.

Los efectos benéficos de las larvas en el manejo de heridas, han sido reconocidos desde hace siglos. Existe información en donde los aborígenes australianos usaron larvas para limpiar las heridas (Fleischmann *et al.*, 2004). Ambrosio Paré en el siglo XVI fue el primero en describir que la infestación con larvas de mosca en heridas infectadas no era nociva. William S. Baer, en el año 1928, lo convierte en un tratamiento popular para el control de infecciones y el manejo de heridas, sin embargo, a principios de los años 40 con la llegada de los antibióticos y de las técnicas modernas de cirugía, cayó en desuso. En 1988 Ronald Sherman, ante el aumento en las resistencias bacterianas y el elevado costo de la atención de pacientes con úlceras crónicas, retoma esta técnica con excelentes resultados y bajo costo (Sherman *et al.*, 1988). En México se utilizó por primera vez en la División de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en el año 2000 (Contreras *et al.*, 2005). En la actualidad su uso se ha generalizado a todos los continentes, el

tratamiento está aprobado por la FDA y ha beneficiado a miles de pacientes en todo el mundo (Sherman, 2000).

Desde su reintroducción a la terapia de las heridas con tejido necrótico, se ha publicado un sin número de reportes sobre su eficacia y uso, ya que en comparación con los métodos convencionales de desbridación, acelera la cicatrización, mejora las características del lecho de la herida y elimina el tejido necrótico.

Mecanismos de acción larval en heridas

Aunque la terapia tiene por objeto principal la desbridación del tejido necrótico (destrucción del tejido necrótico), se han descrito otros mecanismos como la desinfección de las heridas y la promoción de la formación de tejido de granulación, que han popularizado su uso en todo el mundo. Las secreciones o excreciones de las larvas contienen enzimas que degradan el tejido necrótico, liberando así a la herida de material inviable y contaminado (Sánchez *et al.*, 2004; Sherman RA & Pechter EA ,1998; Stoddard *et al.*, 1995; Brin *et al.*, 2007). Entre las enzimas degradadoras que se han aislado de las larvas se encuentran tripsina, leucinaminopeptidasa, carboxipeptidasa, triptasa, peptidasa y lipasa (Thomas *et al.*, 1999; Vistnes *et al.*, 1981). Una de las mas estudiadas actualmente es la quimio tripsina I larval, la cual se ha incluso utilizado en forma de gel experimentalmente en escaras de úlceras venosas con buen resultado como agente desbridante (Telford *et al.*, 2010).

Posteriormente las larvas absorben este material pre digerido (Brin *et al.*, 2007). La principal ventaja de este método es que, por tratarse de una especie de larvas necrófagas, no dañan el tejido viable. Los microorganismos que se encuentran presentes en el lecho de la

herida son también eliminados por competencia por el mismo sustrato, por destrucción en el tracto digestivo de la larva y por sustancias en las secreciones de las larvas que inclusive llegan a lisar biopelículas (Wollina *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2009). Las secreciones de las larvas contienen además sustancias como carbonato de calcio, urea, alantoína, amonio, y otros no bien caracterizados que favorecen la granulación del tejido y la migración celular (Mumcuoglu *et al.*, 1998; Mumcuoglu, 2001; Thomas *et al.*, 1997). Existen evidencias de que la hormona de muda del insecto, 20-hidroxiecdisona, estimula el crecimiento de fibroblastos, y se ha sugerido que la proliferación de tejido dentro de la herida, estimulado por la aparición de factores de crecimiento, puede proporcionar a las larvas una mejor nutrición (Thomas *et al.*, 1999).

Finalmente, todo esto es potenciado por la capacidad de las larvas que tienen para movilizarse sobre los tejidos en la herida y acceder a túneles o zonas en las que no era evidente la presencia de profundización (Wollina *et al.*, 2000; Mumcuoglu *et al.*, 1998). Esto evita la necesidad de hacer grandes incisiones que dañarían inevitablemente tejido sano. Así como también, las secreciones de las larvas estimulan el crecimiento de fibroblastos *in vitro* (Petre, 1997), las larvas secretan enzimas que destruyen las bacterias en el intestino del insecto (Mumcuoglu, 2001; Bonn D, 2000), además también secretan sustancias antibióticas (ácido fenilacético y fenilacetoaldehído). Entre otras sustancias reportadas se encuentran: alantoína y urea asociadas a propiedades cicatrizantes, amonio y carbonato de calcio, que alcalinizan el medio disminuyendo el crecimiento bacteriano (Sherman, 2002). Las larvas también estimulan el desarrollo de tejido de granulación (Sherman, 2002, Wollina *et al.*, 2002).

Secreciones/excreciones de las larvas

Algunos estudios muestran que el efecto bactericida de las excreciones/secreciones de las larvas, Thomas (1999) fue de los primeros en demostrar que las secreciones larvales de *Lucilia sericata* tiene propiedades antibacteriales frente a una amplia variedad de bacterias, incluyendo SARM. son efectivas en bacterias Gram-positivas, tales como *Staphylococcus aureus* (Bexfield *et al.*, 2008, Bowling *et al.*, 2007; Cazander *et al.*, 2009a), por otro lado son menos efectivas en contra de bacterias Gram-negativas, en particular contra *Pseudomonas spp* y *Proteus spp* (Cazander *et al.*, 2009; Jaklic *et al.*, 2008; Kerridge *et al* 2005). Huberman en el 2007, demostró que las secreciones larvales de *Lucilia sericata*, poseen propiedades antibacterianas frente a *Klebsiella pneumoniae*. Por otro lado, Bexfield en el 2008, reveló una acción bactericida de las larvas en contra de *Escherichia coli*. Sin embargo, en el estudio de Van del Plas, en el 2008, se evaluó el efecto de las excreciones/secreciones larvales tiene un efecto mayor en *Staphylococcus aereus* que en *Pseudomonas aeruginosas* in vitro, sobre los biofilms. Andersen (2010), mostró que el efecto de excreciones/secreciones en altas dosis inhibe el Quorum-sensing de *Pseudomonas aeruginosa*, así como también el efecto tóxico de la ingesta de *Pseudomonas aeruginosa* en larvas in vivo.

Formación de Biofilms

Las biofilms se forman por la adherencia de las células de las bacterias a las superficies a través de una matriz exopolímera. Esta matriz es importante en la formación y la estructura del biofilm, así como sobre la protección de las células bacterianas, ya que evita antibióticos y xenobióticos tengan acceso a las células en el interior del biofilm. (Costeron *et al.*, 1995). Los biofilms pueden estar formados por una o más especies de bacterias, Se

ha observado que la resistencia de los biofilms a los antibióticos es mayor en comparación con lo que normalmente se observa con las células planctónicas. De hecho, cuando las células existen en un biofilm, pueden convertirse en 10-1000 veces más resistentes a los efectos de los antibióticos agentes. Cada vez es más claro que los biofilms tienen un enorme impacto en la medicina. Los Biofilms pueden formarse en muchos implantes médicos como catéteres, prótesis de cadera y lentes de contacto, pero principalmente en las heridas expuestas, debido a su aumento de la resistencia a los antimicrobianos, estas infecciones a menudo sólo puede ser tratada mediante la eliminación del implante, lo que aumenta el trauma para el paciente y el alto costo del tratamiento. El desarrollo de la resistencia de los biofilms no ha sido comprendido hasta ahora, pero estudios recientes han utilizado una gran variedad de modelos y sistemas para determinar cómo y por qué los biofilms son tan resistentes a los agentes antimicrobianos.

***Pseudomonas aeruginosa* PA14**

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram-negativa en forma de bastón, mono flagelado que tiene una versatilidad nutricional increíble. Tiene una longitud de 1.5 μm y alrededor de 0.5-1.0 μm de ancho, es un aerobio obligado, lo que significa que requiere de oxígeno y utiliza la respiración aeróbica como la elección del metabolismo. Debido a su capacidad de sintetizar arginina, *P. aeruginosa* también pueden proliferar en condiciones anaeróbicas.

Estadística

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante una t de student para diferenciar tratamientos a través del programa estadístico SPSS (Versión .17) para Windows.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio

El presente estudio se llevo a cabo durante un periodo comprendido de tres meses (Marzo-Junio 2011) en tres diferentes laboratorios de investigación, la cría de la mosca se llevo a cabo en las instalaciones del laboratorio de Entomología Forense F.L.I.E.S de la Universidad de Texas A&M College Station Departamento de Entomología, la preparación de la comida de las larvas se llevo a cabo en el laboratorio de Entomología Genética de la Universidad de Texas A&M, la inoculación de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PA14 se llevo a cabo en las instalaciones del laboratorio 514 del departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Texas A&M, College Station, la fase de prueba de Biofilm se llevo a cabo en las instalaciones del laboratorio de Microbiología ambiental 119 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (U.S.D.A por sus siglas en ingles)

Material Biológico

Cría de la mosca

Las moscas *Lucilia sericata* fueron colectadas en el 2010 en California y otorgadas por el Dr. Aaron Tarone del departamento de entomología Universidad de Texas A&M College Station se criaron bajo condiciones controladas de luz: obscuridad (12:12 h) con una temperatura de 27° C y una humedad relativa de 50%, en jaulas de polipropileno de 45 cm³ (Bioquip Products, Rancho grande Ca. USA), cada jaula conto con una población de 500 a 600 moscas. Se les proporciono hígado durante los primeros cuatro días de emerger de la pupa como fuente de proteínas, su alimentación consistió en azúcar granulada (Great

Value, Walmart Inc. Bentonville USA) y agua estéril. La oviposición de las moscas se logro sobre agar.

Obtención de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PA14

Pseudomonas aeruginosa PA14 fue facilitada por el Dr. Thomas Wood en el laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad de Texas A&M, College station,

Obtención de las larvas estériles y no estériles

Obtención de larvas estériles

Las larvas estériles de tercer instar fueron otorgadas por el Dr. Ronald Sherman (Monarch Labs, California), las larvas fueron alimentadas con alimento estéril basado en hígado (Sherman *et al.*, 1995) (Figura 2).

Obtención de larvas no estériles

Los huevos de mosca *Lucilia sericata* fueron facilitados por el laboratorio de FLIES Texas A&M College del laboratorio FLIES, las moscas ovipositaron sobre alimento estéril para oviposición (Scott Lab rearing USA) (Figura 3) y colocadas en frascos de plásticos de 500 ml con alimento rico en carbohidratos proporcionado por el Dr. Aaron Tarone del departamento de Entomología, Texas A&M.

Homogeneización de las larvas

Para la homogeneización fueron contadas 50 y 100 larvas instar II estériles (SJ) y no estériles (NSJ) de manera separada y fueron colocadas en 3ml de solución buffer (PBS por sus siglas en ingles), posteriormente fueron homogeneizadas durante 1 minuto con Ultra-Turraz T25, posterior a la homogeneización la solución fue centrifugada a 2000 xg 10 min, posteriormente se extrajo la alícuota, se dividió en viales de 200 µl y refrigerada a -80° C.

Secreción/Excreción de larvas instar II

Para la obtención de S.E. se colocaron 50 y 100 larvas instar II estériles (SSE) y no estériles (NSSE) fueron colocados en 3 ml de PBS (Suchi *et al.*, 2009) fueron colocadas en una incubadora a 37° C durante 1 hr en oscuridad y posteriormente se tomaron alícuotas de la solución y divididas en viales de 200 de 200 µl y refrigerada a -80° C.

Ensayos en biofilms *Pseudomonas aeruginosa* PA14

Para este estudio, se utilizaron las larvas de *Lucilia sericata* estadio II y biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Los biofilms se cultivaron en caldo LB durante 24 horas a 37° C y se tomaron lectura en OD. 618 nm (Genova, Techne, USA). Los biofilms fueron separados de la superficie por ultrasonidos (MBEC, USA) , 135 µl del mismo fue agregada en la micro placa (Corning, Polystirene, NY) y fue incubada durante 24 horas a 35° C (Vortemp 56, labnet USA).Posteriormente a las 24 h de incubación se preparó la micro placa con los tratamientos, se incluyó un testigo con antibiótico Gentamicin (G1264. Sigmaaldrich. USA) y un testigo absoluto, se incubo a 37° C. por 24 horas. Las bacterias del biofilm fueron contados utilizando un colorante luminiscente así como también el nivel de control de las bacterias fueron contados por medio de una serie de disoluciones 10⁷. Los

resultados se calcularon correlacionando el número de bacterias por placa y el de luminiscencia (Victor 3V Multilabel counter, PerkinElmer USA). Este número se utilizó para transformar la cuenta de luminiscencia en el número de bacterias. En comparación, se realizó una curva estándar gentamicina (G1264, Sigmaaldrich, USA). La concentración de la curva fue de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a 4 $\mu\text{g/ml}$, en el más alto nivel se logró una disminución del 75% en el número de bacterias de biofilm.

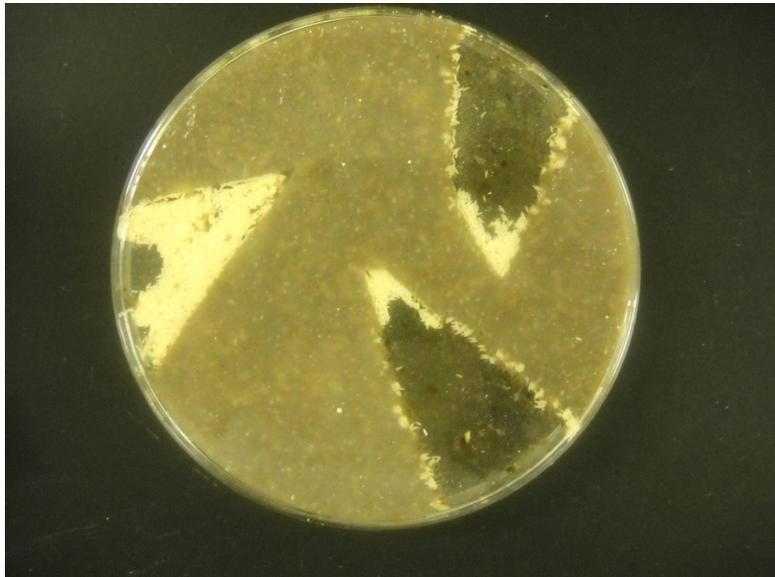


Figura 1. Contenedor alimento estéril para oviposición (Scott Lab rearing USA) y con huevos de mosca

Lucilia sericata.



Figura 2. Larvas estériles y no estériles otorgadas por el Dr. Ronald Sherman (Monarch Labs, California)



Figura 3. Contenedor con larvas no estériles alimentadas con dieta proporcionada por el Dr. Aaron Tarone (Texas A&M)

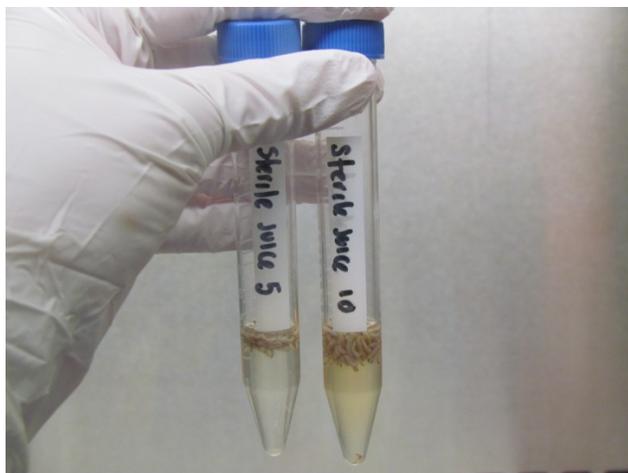


Figura 4. Viales de extracción de S/E de larvas estériles y no estériles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Homogeneizado de 50 y 100 larvas

La adición de una alícuota del homogeneizado de 50 larvas estériles dio como resultado un aumento en el crecimiento de bacterias de un 66%, del mismo modo la alícuota del homogeneizado de 100 larvas estériles mostraron un aumento del 29%. Creemos que este aumento en el crecimiento de las bacterias es el resultado de la dieta del hígado residual en las larvas estériles. Ya que fueron alimentados en base al método de Sherman *et al.*, (1995). Además, la alícuota del homogeneizado de 50 y 100 de larvas no estériles mostraron una reducción del material de biofilm de 48% y 21% , en comparación con los niveles de control. (Figura 5).

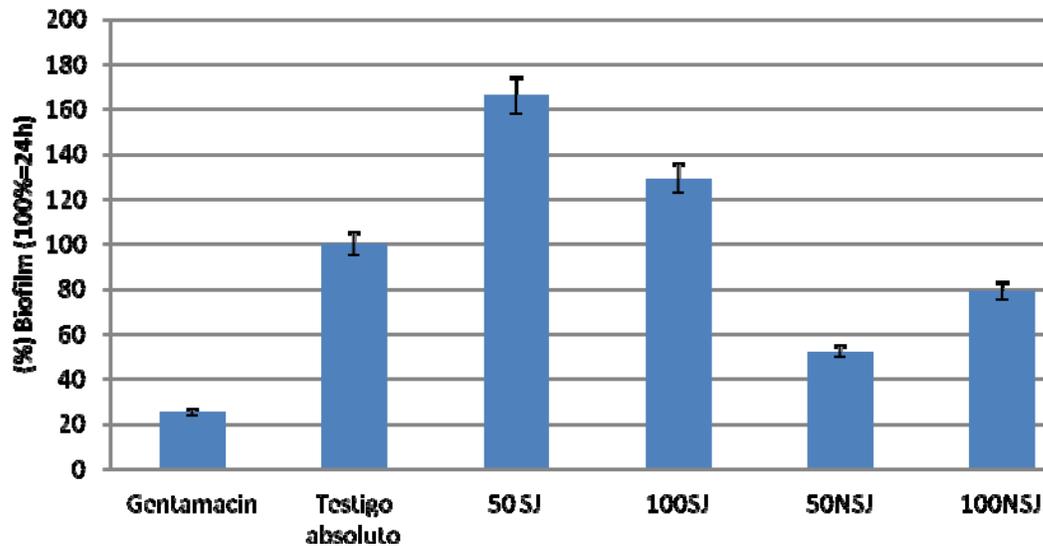


Figura 5. Efecto del homogeneizado de 50 y 100 larvas instar II estériles y no estériles con biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 a las 24 h de tratamiento.

Secreciones y excreciones de 50 y 100 larvas

La solución que contiene las secreciones y excreciones (SE) de larvas estériles o no estériles, mostró una actividad que las larvas no estériles no homogeneizados. Con un 75% de reducción se obtuvo a partir de la adición de 50 larvas no estériles, no obstante, la adición de SE de larvas no estériles mostraron una reducción del 73% de las bacterias del biofilm. La adición de derivados de las SE de 50 y 100 larvas estériles, dio como resultado una reducción en las bacterias del biofilm del 68% y 66% respectivamente (Figura 5). Por lo tanto, no hubo diferencias significativas entre los resultados obtenidos al utilizar 50 frente a 100 larvas estériles o no estériles.

Cazander *et al.*, (2010), al evaluar las secreciones/ excreciones (S.E) de las larvas *Lucilia sericata* estériles encontró que en altas dosis de S.E. muestran gran inhibición de Quórum

Sensing en *Pseudomona aeruginosa*, además, *Pseudomonas aeruginosa* causa toxicidad a larvas in vitro. Sin embargo en el presente estudio se utilizó *Pseudomona aeruginosa* PA14 mostrando una reducción del 75% de dosis de 50 larvas no estériles seguidas de 73% de dosis de 50 larvas estériles (Figura 6), esto las coloca como una opción para la disminución de *Pseudomona aeruginosa* en las heridas, pero quizás con mas dosificación podría actuar de mejor manera.

Andersen *et al.*, (2010) mostró que el efecto de excreciones/secreciones en altas dosis inhibe el Quorum-sensing de *Pseudomonas aeruginosa*, así como también el efecto tóxico de la ingesta de *Pseudomonas aeruginosa* en larvas in vivo, sin embargo en el presente estudio no se trabajaron con larvas in vivo, solamente la homogeneización y las secreciones/excreciones, obteniendo un mayor incremento en el homogeneizado a comparación de las secreciones/excreciones.

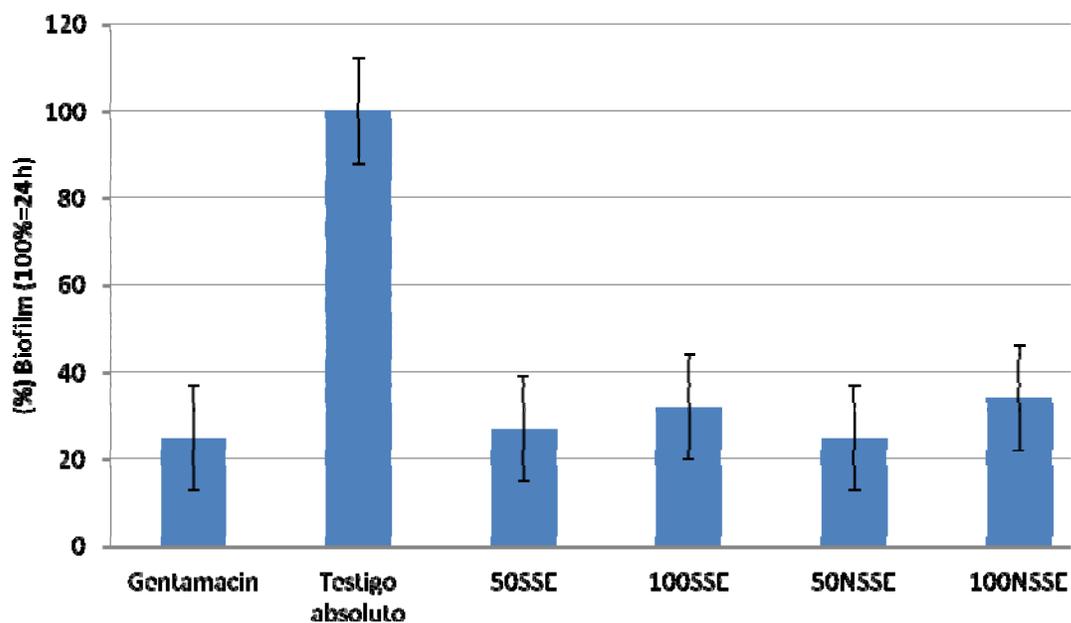


Figura 6. Efecto de las secreciones/excreciones de 50 y 100 larvas instar II estériles y no estériles con biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 a las 24 h de tratamiento.

El objetivo principal de este estudio fue probar nuevas formas para el tratamiento de heridas colonizadas con bacterias resistentes a los antibióticos tales como *Pseudomonas aeruginosa* a través de homogeneización y Secreción/Excreción de las larvas de *Lucilia sericata* instar II. Además de que el uso de larvas estériles ha sido contraindicado en heridas colonizadas con *Pseudomonas aeruginosa*. (Cazander *et al.*, 2009; Van der Plas *et al.*, 2008). El nuevo método utilizado en este estudio fue el uso de homogeneizado para el tratamiento de biofilms. Esto fue comparado utilizando una solución de secreciones / excreciones (SE) de las larvas. En nuestra investigación nosotros también encontramos que el uso de ambos homogeneizados y SE de larvas no estériles disminuyeron el biofilm, además, el SE de larvas estériles también disminuyó el crecimiento de biofilms. Estas similitudes entre los resultados de las dos especies pertenecientes a la familia Calliphoridae, podrían abrir nuevas puertas a nuevas especies de dípteros (Calliphoridae) que podrían ser usados para el manejo de heridas.

La alimentación de las larvas estériles utilizadas en este experimento fue con hígado estéril basado en el método de Sherman (1995), el cual da maduración a las larvas es similar a las reportadas con otros medios, en nuestros resultados la homogeneización de 50 y 100 larvas estériles fueron negativos, incrementaron en un 66% y 29% el nivel de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, esto lo aunamos al alto índice nutritivo que las larvas contenían al ser homogeneizadas y así poder actuar como coadyuvante en el crecimiento de *Pseudomonas* de lo contrario el homogeneizado de 50 y 100 larvas instar II

no estériles presentaron una disminución del 48% y 21%, las cuales no fueron alimentadas de la misma forma que las estériles.

Van der plast *et al.*, (2008) reporta que tan solo con 0.2 μg de SE puede prevenir la formación de *S. aureus* biofilm y con 2 μg de ES rápidamente desintegra los biofilms. En contraste. El ES promovió inicialmente la formación de *Pseudomonas aeruginosa* biofilm , pero después de 10 horas el biofilm comenzó a desintegrarse aunque requirió 10 veces más dosis que *S. aureus* biofilms. A diferencia en nuestra investigación, es que por primera vez se trabaja con larvas no estériles, además se trabajó solamente con dosis de 50 y 100 larvas durante 24 horas con *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, donde los efectos del homogeneizado de larvas no estériles muestra una diferencia de 17% entre sus dosis, se presencia una gran reducción por parte del homogeneizado de 50 larvas que el de 100 larvas.

Van der plast *et al.*, (2010) muestra que los antibióticos tales como Vactomicina y Daptomicina aumenta la formación de biofilm *S. aureus* , mientras que la Clindamicina reduce el tamaño de *S. aureus*. La adición de Secreciones/ Excreciones (SE) de larvas *Lucilia sericata* estériles a antibiótico incubado con biofilm causó la ruptura completa del biofilm. En cuanto a nuestra investigación con *Pseudomonas aeruginosa* se trabajó con antibiótico Gentamicina 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ presentó una reducción del 75% del total del biofilm en un periodo de 24 horas lleva a futuras investigaciones si las S.E. de larvas estériles presentaron un 76% esto hace que en su conjunto podrán romper completamente el biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.

Las heridas colonizadas por *Pseudomonas aeruginosa* es contraindicación para el uso de larvas o bien pueden ser utilizadas en mayor escalas con un gran número de cambios en los apósitos y de larvas frecuentemente (Steenvoorde y Jukema, 2004; Van der Plas *et al*, 2008). Pero hay que tener en cuenta que el tratamiento de heridas colonizadas con *Pseudomonas aeruginosa* involucra tiempo y costos, por ello el presente estudio crea la posibilidad de utilizar larvas en forma homogeneizada para poder combatir la infección y evitar que las larvas mueran a consecuencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

CONCLUSIONES

- El homogeneizado de las larvas estériles alimentadas con hígado estériles no redujo el biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, esto debido a la homogeneización con los residuos de hígado estéril,
- El homogeneizado de larvas no estériles mostro una disminución en el biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA 14, entre 21 y 48%.
- El SE de ambas estéril y no estériles larvas disminuyo de un 66 a un 75% , el cual los hace una buena alternativa en la reducción del biofilm.

IV. CONCLUSIONES GENERALES

- Los resultados de la presente investigación demuestran el potencial de desinfección de Lysol (10 y 5 minutos) y NaClO +Formaldehido como alternativas para la esterilización de los huevos de *Lucilia cuprina*. Por otro lado, Formalina 5%, ETOH 70% +Sporgon y ETOH 70% tuvieron bajo nivel de esterilización de huevos por lo tanto, no se recomienda como agentes esterilizantes.
- El nivel de eclosión demostró que NaClO tuvo un nivel de eclosión de 87%, seguido de Lysol 5 minutos (74%) lo cual los coloca como los mejores métodos de esterilización, sin embargo el que menor nivel de eclosión presentó fueron NaClO + Formaldehido con un 50% de eclosión, por lo cual no garantiza su viabilidad.
- El homogeneizado de las larvas estériles alimentadas con hígado estériles no redujo el biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, esto debido a la homogeneización con los residuos de hígado estéril,
- El homogeneizado de larvas no estériles mostro una disminución en el biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PA 14, entre 21 y 48%.
- El SE de ambas estéril y no estériles larvas disminuyo de un 66 a un 75% , el cual los hace una buena alternativa en la reducción del biofilm.

V. LITERATURA CITADA

Aaron G Paul, Nazni W Ahmad, HI Lee, Ashraff M Ariff, Masri Saranum, Amara S Naicker, Zulkiflee Osman.2009. Maggot Debridement Therapy With *Lucilia Cuprina*: A Comparison With Conventional Debridement In Diabetic Foot Ulcers *Int Wound J*;6: 39–46.

S. Andersen, B. Joergensen, T. Bjarnsholt, H. Johansen, T. Karlsmark, M. Givskov and K. A. Krogh. 2010. Quorum-sensing-regulated virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* are toxic to *Lucilia sericata* maggots. *Microbiology*, 156: 400–407.

Anders S. Andersen, Dorthe Sandvang, Kirk M. Schnorr, Thomas Kruse, Søren Neve, Bo Joergensen, Tonny Karlsmark and Karen A. Krogh.2010. A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J Antimicrob Chemother*, 65: 1646–1654

Angel, K. Grassberger, M. Huemer, F. & Stackl, W. 2000. Maggot therapy in Fournier's gangrene First results with a new form of treatment. *Aktuelle Urologie*, 31: 440-443.

Baer , W. S. 1931. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blow fly). *J Bone Joint. Surg. Am.* 13: 438-75.

Bexfield, A. Bond, A. E. Roberts, E. C. Dudley, E. Nigam, Y. Thomas, S. Newton, R. P. & Ratcliffe, N. A. 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: 325–33.

Nigam Y, Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe NA.2006. Maggot therapy: the science and implication for CAM. Part I-History and bacterial resistance. *Evid Based Complement Alternat Med*,3: 223-7.

Brin, Y.S. Mumcuoglu, K.Y. Massarwe, S. Wigelman, M. Gross, E. Nyska, M. 2007. Chronic foot ulcer management using maggot debridement and topical negative pressure therapy. *J Wound Care.* 16:111-113.

Bonn, D. 2000. Maggot therapy: an alternative for wound infection. *Lancet.* 356: 1174

Bowling, F. L. Salgami, E. V. & Boulton, A. J. 2007. Larval therapy: a novel treatment in eliminating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from diabetic foot ulcers. *Diabetes Care.* 30:370-371.

Bradley, M. Cullum, N. Sheldon, T.1999. Systematic reviews of wound care management: dressings and topicalagents in the healing of chronic wounds. *Health Technol. Assess.* 3:1-135.

- Brookes, V. J. 1961. Partial purification of a proteolytic enzyme from an insect, *Phormia regina*. *Biochimica et Biophysica Acta* 46: 13-21.
- Byrd, J.H. and J.C. Allen. 2001. The development of the black blow fly, *Phormia regina* (Meigen). *Forensic Sci. Int.* 120: 79-88.
- Byrd, J. H. and Castner J .L. 2010. Insects of Forensic Importance. *J. Med. Entomol.* 33: 43-46.
- Catts E P, Goff M L. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annu Rev Entomol* 37: 253-272.
- Cazander, G. van Veen, K. E. Bernards, A. T. & Jukema, G. N. (2009a). 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.
- Cazander, G. van Veen, K. E. Bouwman, L. H. Bernards, A. T. & Jukema, G. N. (2009b). The influence of maggot excretions on PAO1 biofilm formation on different biomaterials. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467: 536–545.
- Connell, T. D. 1981. A New Technique for Surface Sterilization of Insect Eggs. *Journal Of The Kansas Entomological Society* 54: 124-128.
- Contreras, R. J. Fuentes, S. A. Karam, M. Escamilla, M.L. Dominguez, C. J.2005. Larval debridement therapy in Mexico. *Wound Care Canada Journal.* 3: 1-5.
- Chernin E. Surgical maggots. *South Med J* 1986; 79: 1143-5
- Church, J.C.1996. The traditional use of maggots in wound healing, and the development of Larva therapy (biosurgery) in modern medicine. *J Altern Complement Med.* 2: 525-27.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korver, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 15: 711–745.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318–1322.
- Deonier, C. C. 1940. Carcass temperatures and their relation to winter blowfly populations and activity in the southwest. *J. Econ. Entomol.* 33: 166-170.
- Figuroa, L. Flores, J. Rodriguez, S. 2007. Método de cultivo de larvas de moscas *Lucilia sericata* para terapia larval. *Parasitol. Latinoam* 62: 79-82.
- Fleischmann, W. Grassberger, M. Sherman, R. 2004. *Maggot Therapy A Handbook of Maggot-Assisted Wound Healing.* USA: Thieme.
- Frykberg, R.G. Armstrong, D.G. Giurini, J. et al. 2000. Diabetic foot disorders: a clinical practice guideline. American College of Foot and Ankle Surgeons. *J Foot Ankle Surg.*

6: 33-35.

Frykberg, R.G. 1999. Epidemiology of the diabetic foot: ulcerations and amputations. *Adv. Wound Care.* 3:139-41.

Frykberg, R.G. Zgonis, T Armstrong DG et al. 2006. Diabetic foot disorders. A clinical practice guideline. *J. Foot Ankle Surg.* 45:51-66.

Gjødsbøl, K., Christensen, J. J., Karlsmark, T., Jørgensen, B., Klein, N. E. & Krogh, K. A. (2006). Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J.* 3: 225–231.

Greenberg, B. 1973. *Flies and disease.* 2 vols. Princeton, NJ: Princeton University Press
Greenberg, B. and M. L. Szyska. 1984. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 77: 488-517.

Harris, L.G. Bexfield, A. Nigam, Y. Rohde, H. Ratcliffe, N.A. Mack, D. 2009. Disruption of *Staphylococcus epidermidis* biofilms by medicinal maggot *Lucilia sericata* excretions/secretions. *Int. J. Artif. Organs.* 32:555-564.

Harrison, B. A. and W. G. Pearson. 1968. A case of aural myiasis caused by *Cochliomyia macellaria* (Fabricius). *Military Med.* 133: 484-488.

Hennig, W. 1973. Diptera (Zweiflügler). *Handb. Zool.* Pp. 337.

Horn, K. L., A. H. Cobb, Jr, and G. A. Gates. 1976. Maggot Therapy for Subacute Mastoiditis. *Arch Otolaryngol* 102: 377-379

Huberman, L. Gollop, N. Mumcuoglu, K.Y. Block, C. Galun, R. 2007. Antibacterial properties of whole body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots. *J. Wound Care.* 3:123-7.

Hultmark, D. Weisner, A. Dunphy, G.B.. Marmaras, V.J. Morishima, J. Sugumaran, M. Yamakawa, M. 1998, *Techniques in Insect Immunology*, SOS Publications, New Jersey, pp. 103–107.

Jaklic, D. Lapanje, A. Zupancic, K. Smrke, D. Gunde-Cimerman, N. 2008. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J. Med. Microbiol.* 5:617-25.

Jones M. Larval therapy. *Nurs Stand* 2000; 14: 47-51.

Kettle, D.S. 1995. *Medical and Veterinary Entomology.* Second Edition. Department of Entomology. University of Queensland. Australia. Pp 85

Kerridge A. Lappin-Scott, H. Stevens, J.R. 2005. Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med. Vet. Entomol.* 3:333-7.

Kom Sukontason, Kabkaew L. Sukontason, Somsak Piangjai, Noppawan Boonchu, Hiromu Kurahashi, Michelle Hope, Jimmy K. Olson. 2004. Identification of forensically important fly eggs using a potassium permanganate staining technique. *Micron* 35: 391–395

Lam, K., D. Babor, B. Duthie, E. M. Babor, M. Moore, and G. Gries. 2007. Proliferating bacterial symbionts on house fly eggs affect oviposition behaviour of adult flies. *Animal Behaviour* 74: 81-92.

Lewis, R. Whiting, O. Terriet, G.A. 2001. rapid and systematic review of the clinical effectiveness and costeffectiveness of debriding agents in treating surgical wounds healing by secondary intention. *Health Technol. Assess.* 5: 5-14.

Livingston, S. K. 1936. The Therapeutic Active Principle of Maggots: With a Description of its Clinical Application in 567 Cases. *J Bone Joint Surg Am* 18: 751-756

Lyder, C.H. 2003. Pressure ulcer prevention and management. *JAMA*. 289:223-226.

Mah, T.F., and O'Toole, G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9: 34–39

Pablo Manrique-Saide, Roger I. Rodríguez-Vivas, Manuel Quiñones Rodríguez, Rubén Quiroz-Aparicio. 1999. Un caso de pseudomiasis por larvas de *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) en un bovino. *Rev Biomed* 1999; 10:173-176.

MEDIWEB. Pie Diabético. 2006. Sistemas WEB en salud ideados de médicos para médicos. Pie diabético .2006. <http://www.mediweb.com.mx/scripts/viewart.php?id=131>.
Meydenbach J, ed. 1491. *Ortus Sanitatis* (Hortus Sanitatis). Compiled chiefly from the German *Hortus Sanitatis*, J. von Cube. Moguntia. Mainz: Jacobus Meydenbach. 454 pg.

BioQuip Products, 2011. <http://www.bioquip.com>

Mackerras, M. J. 1933. Observations on the nutrition of maggots of Australian blow-flies. *Journal Of Experimental Biology*. 10: 237-246.

Mumcuoglu, K. Y., J. Miller, M. Mumcuoglu, M. Friger, and M. Tarshis. 2001. Destruction of Bacteria in the Digestive Tract of the Maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol* 38: 161-166.

Mumcuoglu, K.Y. 2001. Clinical applications for maggots in wound care. *Am. J. Clin Dermatol*. 2: 219-27.

Mumcuoglu, K.Y. Ingber, A. Gilead, L. et al. 1998. Maggot therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diab. Care*. 21: 2030-31.

Mohd Masari, S., W. Nazni, H. Lee, T. Rogayah, and S. Subramaniam. 2005. Sterilisation of *Lucilia cuprina* Wiedemann maggots used in therapy of intractable wounds. *Trop Biomed* 22: 185-189.

- Moorer, W. R. 2003. Antiviral activity of alcohol for surface disinfection. *International Journal of Dental Hygiene* 1: 138-142
- Nabity, P.D. Higley, L.G. and Heng-Moss, T.M. 2007. Light-Induced Variability in Development of Forensically Important Blow Fly *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 2: 351-358.
- Napoleón de la Ossa, Luis Eduardo Castro, Lila Visbal, Ana María Santos, Esther Díaz, Claudia M.E. Romero-Vivas. 2009. Miasis cutánea por *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae) en el Hospital Universidad del Norte, Soledad, Atlántico. *Biomédica*; 29:12-7.
- E.R. Pavillard, E.A. Wright. 1957. An antibiotic from maggots, *Nature*. 180: 916–917.
- Prete, P.E. 1997. Grown effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblast: mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sci.* 60: 505-10.
- Rognes, Knut. 1991. Blowflies (Diptera, Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark. Scandinavian Science Press, pp.272.
- Robinson W. 1935. Progress in maggot therapy in the United States and Canada in the treatment of suppurative diseases. *Am J Surg.* 29 : 67–71.
- R., Treudler, R. & Simon, J. C. 2008. Maggots do not survive in pyoderma gangrenosum. *Dermatology.* 217: 241–243.
- Sánchez, M.C. Chuaire, L. Narváez, S.R. Segura, N.A. 2004. Biocirugía: Utilización de larvas de insectos necrófagos en la curación de heridas. *Rev. Cienc. Salud.* 2:156-164.
- Sherman, R.A. Wyle, F.A. 1996. Low-cost, low maintenance rearing of maggots in hospitals, clinics and schools. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54: 38-41.
- Sherman, R.A. Sherman, J. Gilead, L. Lipo, M. Mumcuoglu, K.Y. 2001. Maggot debridement therapy in out-patients. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 82:1226-9.
- Sherman, R.A. Hall, M. J. R. Thomas, S. 2000. Medicinal maggots: An ancient remedy for some contemporary afflictions. *Ann Rev Entomol.* 45: 55-81.
- Sherman, R. A. 2002. Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound Rep. Reg.* 10: 208-14.
- Sherman, R.A. 2002. Maggot therapy for foot and leg wounds. *Low Extrem. Wounds.* 1:135-42.
- Sherman, R.A. 2000. Maggot therapy - The last five years. *Eur. Tissue Repair Soc.* 7:97-8.

Sherman, R.A. Pechter, E.A. 1998. Maggot therapy: a review of the therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. *Med. Vet. Entomol.* 2:225-230.

Simmons, S. W. 1934. Sterilization of blowfly eggs: In the culture of surgical maggots for use in the treatment of pyogenic infections. *The American Journal of Surgery.* 25: 140-147.

Stoddard, S.R. Sherman, R.A. Mason, B.E. Pelsang, D.J. Sherman, R.M. 1995. Maggot debridement therapy. An alternative treatment for nonhealing ulcers. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* 85:218-221.

Shuchi Arora, Lim Chu Sing, Carl Baptista. 2009. Antibacterial activity of *Lucilia cuprina* maggot extracts and its extraction techniques. *Inter. Journal of Integrative Biology.* 9: 43-48.

Teich, S. 1986. Maggot Therapy for Severe Skin Infections *Southern Medical Journal* 79: 1153-1155.

Telford ,G. Brown, A.P, Seabra, R.A. et al. 2010. Degradation of eschar from venous leg ulcers using a recombinant chymotrypsin from *Lucilia sericata*. *Br J Dermatol.* 3:45-47.

Thomas, S. Andrews, A.M. Hay, N.P. Bourgoise, S. 1999. The antimicrobial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *Journal of Tissue Viability* 9: 127-132

Thomas, S. Jones, M. Andrews, A. 1997. The use of fly larvae in the treatment of wounds. *Nurs. Stand.* 12: 54-9.

Van der Plas, M.J. Jukema, G.N. Wai, S.W. Dogterom-Ballering, H.C. Legendijk, E.L. et al. 2008. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 117-22.

Van der Plas MJA, van der Does AM, Baldry M et al. 2007. Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. *Microbes Infect,* 9: 507-14.

Vistnes, L.M. Lee, R. Ksander, G.A. 1981. Proteolytic activity of blowfly larvae secretions in experimental burns. *Surgery.* 90:835-841.

Weil JC, Simon RJ, Sweadner WR. 1933. A biological, bacteriological and clinical study of larval or maggot therapy in the treatment of acute and chronic pyogenic infections. *Am J Surg;* 19: 36-48

Wollina, U. Liebold, K. Schmidt, W. et al. 2002. Biosurgery supports granulation and debridement in chronic wounds- clinical data and remittance spectroscopy measurement. *Int. J. Dermatol.* 41: 635-9

Wollina, U. Karte, K. Herold, C. Looks, A. 2000. Biosurgery in wound healing--the renaissance of maggot therapy. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 14:285-289.

Wall Richard. 1993. The Reproductive Output of the Blowfly *Lucilia sericata*. J. Insecr Ph.wiol. 39:9, pp. 743-750,

VI. APENDICE



Control



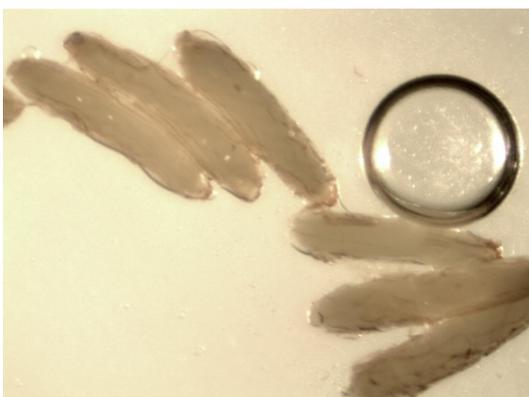
Formalina 5%



Formalina 10%



ETOH 70%



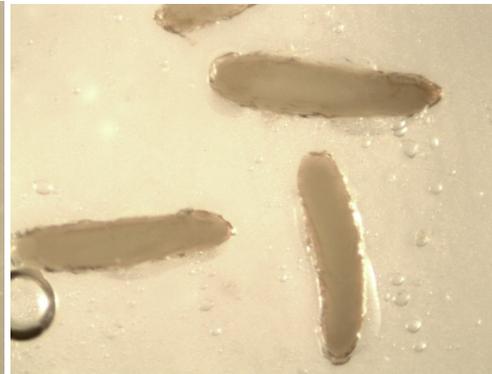
Cloruro de benzalkonio



NaClO + Formaldehido



NaClO



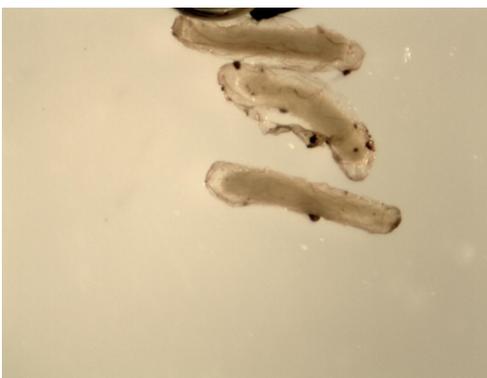
ETOH + Sporgon



Formaldehido



Lysol 5 min



Lysol 10 min



Solución salina