

Estudio comparativo de la eficacia de la larvaterapia (LT) para desbridar y controlar la carga bacteriana en úlceras venosas comparado con desbridamiento quirúrgico y aplicación de un antimicrobiano tópico

José Contreras-Ruiz^{1*}, Adán Fuentes-Suárez¹, Sara Arroyo-Escalante², David Moncada-Barrón²,
María Cristina Sosa-de-Martínez³, Ernesto Maravilla-Franco⁴ y Judith Guadalupe Domínguez-Cherit⁵

¹Sección de Clínica Interdisciplinaria de Cuidado de Heridas y Estomas, División de Dermatología; ²Laboratorio de Microbiología. Hospital General Dr. Manuel Gea González; ³Departamento de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría; ⁴Laboratorio de Microbiología; ⁵Departamento de Dermatología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Ciudad de México, México

Resumen

La LT es el uso de larvas estériles de la mosca *Lucilia sericata* para desbridar tejido necrótico. Observaciones recientes señalan además que reduce la carga bacteriana de las heridas. Las úlceras venosas son el motivo más frecuente de consulta en las clínicas de heridas y requieren, concomitantemente, del manejo apropiado de la hipertensión venosa, la adecuada preparación del lecho de la herida con desbridamiento del tejido necrótico y el control de posibles infecciones. Para evaluar la eficacia de la LT en úlceras venosas se diseñó un estudio controlado aleatorizado para comparar la LT sola contra el desbridamiento quirúrgico y la aplicación tópica de sulfadiazina de plata (SDP) en 19 pacientes durante 4 semanas. Las variables estudiadas fueron la reducción del área, las características del lecho de la herida, el dolor, el olor, la ansiedad y la carga bacteriana utilizando biopsias cuantitativas de tejido. La LT fue tan eficaz como el desbridamiento quirúrgico asociado a SDP tópica para desbridar la herida y reducir el tamaño de la misma. Se observó una diferencia significativa en la reducción de la carga bacteriana a favor del grupo de LT. El olor y la ansiedad aumentaron en el grupo de LT, sin que hubiese diferencia en la intensidad del dolor entre ambos grupos. En conclusión, el presente estudio sugiere que la LT es tan útil para desbridar y favorecer la cicatrización de la herida como el desbridamiento quirúrgico con cureta en las úlceras venosas, y demostró ser superior en el control de la carga bacteriana.

PALABRAS CLAVE: Úlcera de piel. Úlcera venosa. Úlcera varicosa. Larvaterapia. Desbridamiento. Cicatrización.

Abstract

Maggot debridement therapy (MDT) is the use of medical grade maggots of the fly *Lucilia sericata* for wound debridement. Recent observations show that MDT decreases bacterial burden as well. Venous ulcers are the most commonly seen in wound clinics and require, besides adequate treatment of venous hypertension, proper wound bed preparation with debri-

Correspondencia:

Correspondencia:

*José Contreras-Ruiz

Departamento de Dermatología

Hospital General Dr. Manuel Gea González

Calzada de Tlalpan, 4800

Col. Sección XVI, Del. Tlalpan

C.P. 14080, Ciudad de México, México

E-mail: dermayheridas@gmail.com

dement of necrotic tissue and control of potential infections. To evaluate the efficacy of MDT in venous ulcers a randomized controlled trial was designed to compare MDT to surgical debridement and topical application of silver sulfadiazine (SSD) in 19 patients for 4 weeks. The study variables were area reduction, wound bed characteristics, pain, odor, anxiety and bacterial burden using quantitative tissue biopsies. MDT was effective as surgical debridement associated with topical SSD in the debridement of the wound and in reducing its size. A significant difference was observed in the reduction of bacterial burden in favor of the MDT group. Odor and anxiety increased in the MDT group without any difference in the pain intensity between groups. In conclusion, this study suggests that MDT is as effective as surgical debridement for the debridement of necrotic tissue and promote wound healing in venous ulcers and better at reducing bacterial burden. (Gac Med Mex. 2016;152:78-87)

Corresponding author: José Contreras-Ruiz, ermayheridas@gmail.com

KEY WORDS: Skin ulcer. Venous ulcer. Varicose ulcer. Maggot debridement therapy. Debridement. Wound healing.

Introducción

La LT es el uso de larvas de moscas necrófagas de grado médico para el tratamiento de heridas de difícil cicatrización¹⁻⁵.

Desde la antigüedad, Ambrose Paré describió que la miasis benigna provocada por estas moscas no era dañina para los pacientes con heridas infectadas⁶. Posteriormente, durante la guerra de Crimea, el médico ruso Nikolai Pirogov comenzó a aplicarlas de manera intencionada en pacientes que no eran candidatos a cirugía convencional, dando así inicio a la LT como tal⁷. Por desgracia, poco de este conocimiento permeó a Occidente y hubo que esperar hasta que, en 1931, el ortopedista norteamericano William S. Baer publicara el trabajo realizado en pacientes pediátricos con osteomielitis en la Johns Hopkins, para dar paso a lo que conocemos hoy como la LT moderna⁸. Con el advenimiento de los antibióticos y la asepsia y la antisepsia prequirúrgica, la LT cayó en desuso.

Ante el problema de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos y el aumento en los costos de salud, en 1985 la LT fue retomada por el Dr. Ronald A. Sherman, en Irvine, California (EE.UU.)^{5,9}. A partir de entonces se difundió su empleo en muchos centros, siendo la Clínica Interdisciplinaria de Cuidado de Heridas y Estomas del Hospital General Dr. Manuel Gea González el primer centro en Latinoamérica en implementar su uso como terapia para los pacientes con heridas de difícil cicatrización¹⁰. Gracias a la estrecha colaboración entre los centros de todo el mundo donde se adoptó esta terapia, fue aprobada por la Food and Drug Administration de los EE.UU.¹¹.

El mecanismo de acción se explica porque las larvas compiten por el mismo sustrato que las bacterias, ya que producen diversas sustancias que lisan el tejido

necrótico, tales como serina proteasas, quimiotripsina y nucleasas¹²⁻¹⁶, además de sustancias antimicrobianas como el ácido fenilacético y especies reactivas de amonio, entre otras¹⁷. Más interesante aún es la demostración de péptidos antimicrobianos secretados por las larvas, como lucifensina, lucimicina y otra atacinas, cecropinas, dipterocinas y péptidos ricos en prolina, así como sarcotoxinas¹⁸⁻²³.

De interés clínico es la negativización de cultivos de heridas tratadas con LT²⁴, y la total erradicación de biopelículas y de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en heridas de pacientes tratados con LT¹²⁻²⁵⁻³³.

A pesar de lo anterior, la evidencia del uso de LT como método para desbridar y controlar la sobrecarga bacteriana en las heridas es deficiente. Pocos son los ensayos clínicos controlados que demuestren su utilidad. Los escasos estudios comparativos con que se cuenta dan poca relevancia a la velocidad o al porcentaje de desbridamiento³⁴, o bien son comparados con desbridamiento autolítico utilizando hidrogel³⁵⁻³⁷, el cual dista mucho de ser el método de elección en úlceras venosas más frecuentemente utilizado en nuestro país.

Las úlceras venosas de la pierna constituyen la causa más frecuente de consulta por heridas crónicas. La prevalencia de las úlceras venosas en la población adulta se encuentra entre el 1 y el 3%³⁸. Se caracterizan por ser úlceras localizadas en los maléolos (particularmente internos), de bordes irregulares, con lecho congestivo o necrótico, y altamente exudativas. Los pacientes suelen acudir con tiempos de evolución prolongados y disminución en la calidad de vida por dolor, discapacidad, mal olor e infecciones de repetición³⁹⁻⁴¹. El método de referencia en su tratamiento es el uso de terapia compresiva y el adecuado manejo de la herida con desbridamiento del tejido necrótico, tratamiento de la infección o de la sobrecarga bacteriana, y apósitos para controlar el exudado^{42,43}.

Entre los métodos de desbridamiento para las úlceras venosas se encuentra el quirúrgico con diversos instrumentos, como bisturí, legra o cureta, o hidroescapelo; el mecánico, con uso de fuerzas físicas para la remoción del esfacelo; y el enzimático, mediante colagenasa o geles para favorecer la autólisis. Este último se utiliza cuando la úlcera no está infectada, es dolorosa y no se requiere desbridamiento rápido, pues es sumamente lento.

Hasta este momento no existen estudios que valoren la eficacia del desbridamiento con LT en comparación con el método quirúrgico utilizando legra o cureta, método empleado con mucha frecuencia en las úlceras venosas.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue realizar un ensayo clínico controlado con evaluador ciego para comparar la eficacia de la LT contra el uso de desbridamiento convencional con cureta y posterior aplicación de SDP tópica como método efectivo para desbridar y reducir la carga bacteriana en úlceras venosas crónicas.

Método

Se realizó un estudio clínico experimental, prospectivo, comparativo, aleatorizado, controlado, paralelo, con evaluador y estadístico ciegos⁴⁴.

En un periodo de 12 meses, se incluyeron pacientes de la consulta externa de dermatología de primera vez con diagnóstico de úlcera venosa de más de 6 semanas de evolución, que aceptaran participar y firmaran el consentimiento informado. Se excluyeron los que hubieran utilizado antibiótico tópico 7 días antes o padecieran insuficiencia arterial, diabetes o inmunosupresión de cualquier causa.

Para el cálculo del tamaño de la muestra se supuso que la proporción de pacientes con reducción en la cantidad de tejido necrótico y en la carga bacteriana en el grupo I (LT) sería del 90% de los pacientes, y que en el grupo II (control) sería del 30%⁴⁵, lo que resultó en que cada grupo estaría integrado por 10 individuos⁴⁶.

Previo explicación del estudio y firma de la carta de consentimiento informado, el paciente era asignado a uno de los dos grupos según la aleatorización realizada mediante la función de números aleatorios de Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE.UU.)

Consideraciones éticas

El protocolo fue aprobado por los comités de ética e investigación del Hospital General Dr. Manuel Gea

González con el número 06-35-2003. La investigación se llevó a cabo de acuerdo con los principios de buenas prácticas clínicas y la declaración de Helsinki.

Preparación de las larvas de grado médico

Previo al inicio del protocolo se implementó un bio-terio de moscas de la especie *L. sericata*, tras capturar y clasificar a las moscas con ayuda de una entomóloga. Todas las larvas fueron preparadas en el laboratorio de microbiología del Hospital General Dr. Manuel Gea González con técnica estéril y en campana de flujo laminar. Los huevecillos de las moscas se desinfectaron mediante una modificación de la técnica de Sherman⁴⁷ utilizando orto-ftaldehído (Cidex®, Johnson & Johnson, New Jersey, EE.UU.) Los huevecillos eran lavados durante 8 minutos y luego colocados en cajas estériles con agar sangre. Se realizaron cultivos de control de cada lote para garantizar que no hubiera crecimiento bacteriano. Las cajas permanecían en incubación a 30 °C hasta la eclosión de los huevos, que se dejaron madurar 14 horas antes de ser utilizados.

Aplicación del tratamiento por grupo

A los pacientes del grupo I se les aplicaron las larvas con la técnica modificada por Sherman⁴⁸. Posterior al lavado de la herida con solución fisiológica, se implementó un apósito-jaula que se construye colocando un apósito de hidrocoloide grueso con una perforación en el centro con la forma de la herida. Posteriormente se sembraron unas 10 larvas por centímetro cuadrado de superficie ulcerada dentro de la zona delimitada por el hidrocoloide en el lecho de la herida. Para evitar que las larvas escaparan, se colocó un fragmento de tela de organza estéril encima y sin sobrepasar los bordes del hidrocoloide. Por último se selló perfectamente, primero con cinta adhesiva y luego con pegamento de cianocrilato (Kola Loca®, Industrias Kola Loka S.A. de C.V., Estado de México, México). Se colocaron gasas secas que el paciente debía cambiar cada 4 horas. Las larvas se dejaban durante 48 horas y posteriormente se destapaba la herida, se desechaban, se limpiaba el lecho de la herida con solución fisiológica y se cubría con un apósito no adherente adecuado y vendaje compresivo (véase más abajo) durante los siguientes 5 días, con recambio cuando el apósito se saturara (aproximadamente cada 72 horas). En total, cada paciente recibió cuatro ciclos de LT (Fig. 1).

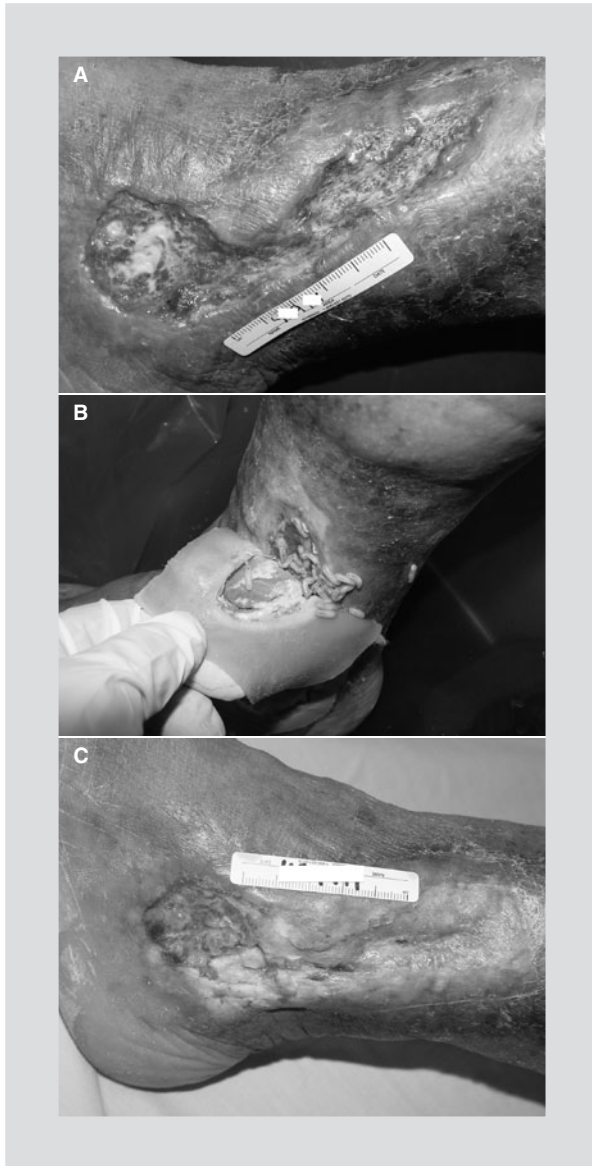


Figura 1. Desbridamiento de una úlcera venosa en un paciente del grupo de LT. **A:** evaluación basal. **B:** el mismo paciente al momento de retirar las larvas. **C:** resultados a las 4 semanas.

El grupo II recibió manejo convencional, consistente en lavado con solución fisiológica y posterior aplicación de una mezcla eutéctica de anestésicos tópicos EMLA® (Astra-Zeneca Pharmaceuticals, Cambridge, Reino Unido). Tomando una legra (cureta) de 4 mm se realizó un curetaje de la superficie de la úlcera para desprender todo el material necrótico que fuese posible, lavando posteriormente con solución fisiológica y secando el exceso de líquido. Al terminar el desbridamiento se aplicó SDP en crema (Argentafil® crema, Valeant Pharmaceuticals, Bridgewater, New Jersey, EE.UU.) como antiséptico tópico, o bien, si el paciente era alérgico a las sulfas, plata nanocrystalina (Acticoat®,

Smith & Nephew, Hull, Reino Unido). Se decidió utilizar un antiséptico de amplio espectro, como la plata ionizada, para tener un comparador válido y estándar para la propiedad antimicrobiana de las larvas. La plata tópica era retirada también a las 48 horas y el paciente recibía un apósito no adherente acorde a la cantidad de exudado que presentaba, y compresión. En total, los pacientes de este grupo recibieron cuatro desbridamientos con cureta y aplicación posterior de plata.

Todos los pacientes del protocolo recibieron terapia estándar con colocación de apósitos convencionales en función de la cantidad de exudado de la herida y se aplicaron vendajes compresivos, considerados el método de referencia en el manejo de la úlcera venosa. Para heridas con poco o ningún exudado se utilizaron apósitos hidrocoloides delgados (Replicare Ultra®, Smith & Nephew, Hull, Reino Unido); para aquellas con exudado moderado, apósitos de espuma hidrocelulares (Allevyn®, Smith & Nephew, Hull, Reino Unido); y para heridas muy exudativas, alginato de calcio (Alginate M®, Smith & Nephew, Hull, Reino Unido) o fibra pura de carboximetilcelulosa (Aquacel®, Convatec, Skillman, New Jersey, EE.UU.), y como apósito secundario gasas absorbentes de algodón si era necesario. La compresión se estandarizó para todos los pacientes con un vendaje compresivo elástico especializado de dos capas (Proguide®, Smith & Nephew, Hull, Reino Unido). Para no alterar los resultados, el día que los pacientes recibían tratamiento con LT o curetaje y plata solo recibían la capa de fijación sin la compresión.

Valoración de la herida

Los pacientes fueron evaluados semanalmente en cinco ocasiones (basal, tres subsecuentes y una final). Las variables subjetivas dolor, olor y ansiedad fueron medidas utilizando una escala visual analógica⁴⁹⁻⁵². El investigador también valoró el olor usando la misma escala.

La evaluación de la herida consistió en la medición de la superficie, la profundidad, la cantidad de exudado y las características del lecho, con el porcentaje de tejido de granulación, fibrina, necrosis u otro, presentes en el lecho de la herida. La medición de la superficie se documentó primero según el método descrito por Kantor y Margolis⁵³, multiplicando el largo mayor y el ancho mayor perpendicular al mismo. Posteriormente todas las heridas fueron fotografiadas y el área se calculó con exactitud mediante el *software* ImageJ®

de los National Institutes of Health de los EE.UU. (Rasband WS. ImageJ®. Bethesda, Maryland, EE.UU.: U.S. National Institutes of Health; <http://imagej.nih.gov/ij/>).

La profundidad de la herida se valoró, de acuerdo con los tejidos involucrados, del 0 al 5: 0 si la herida estaba cerrada, 1 si afectaba solo la epidermis, 2 si afectaba la dermis, 3 si llegaba al tejido celular subcutáneo, 4 si afectaba músculo o tendón, y 5 si afectaba el hueso o la articulación⁵⁴.

Valoración microbiológica

Para evaluar la carga bacteriana se realizaron cultivos cuantitativos de biopsia de tejido de la lesión al inicio, a la mitad y al final del periodo de observación. Las muestras fueron procesadas por el mismo investigador (EMF) en el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se empleó la técnica descrita por Loebl, et al.^{55,56} y las modificaciones de Sapico, et al.⁵⁷: previa limpieza de la herida con una gasa empapada en solución fisiológica se seleccionó el área del centro de la úlcera con la menor cantidad de tejido purulento, de preferencia áreas profundas. Se tomó una biopsia con un sacabocados de 4 mm, excepto si la úlcera era menor de 1 cm², que se consideraba cerrada para los fines de la valoración microbiológica y por disposiciones éticas.

Las biopsias se colocaron en medio de transporte Stuart. El intervalo entre la toma y el cultivo fue menor de 120 minutos. Una vez en el laboratorio de microbiología, la muestra se colocó en solución salina estéril para lavar los restos del medio. Después se pesó y se colocó en un mortero con 1 ml de caldo de tioglicolato y hasta obtener una suspensión razonablemente homogénea. Se tomaron 1, 10 y 50 µl de esa suspensión y se inocularon en nueve placas de cultivo. El inóculo se estrió radialmente para conteo. Para los cultivos aerobios y anaerobios facultativos se usó agar sangre de carnero y agar McConkey. El medio para anaerobios obligados fue el agar de feniletilalcohol⁵⁸.

Las placas aeróbicas se incubaron 48 horas a 37 °C y se revisaron. Las anaerobias también se incubaron a esta temperatura en una atmósfera anaerobia (N₂ 80%, H₂ 10% y CO₂ 10%), utilizando la técnica de vacío-reemplazamiento, y se revisaron a las 48 horas.

Ante cualquier desarrollo se realizaba el conteo de colonias. Se seleccionaron colonias y se sembraron para hacerles pruebas de identificación y sensibilidad antimicrobiana a las 24 horas, utilizando un método semiautomatizado (Vitek®, BioMerieux, Marcy l'Etoile,

Francia). Si no se identificó la bacteria, se realizaron pruebas bioquímicas convencionales. El resultado de los cultivos se reportó en unidades formadoras de colonias por gramo de tejido (UFC/g)^{59,60}.

Evaluación de la seguridad

En todos los pacientes se evaluó la presencia de efectos colaterales. En el grupo I se investigó también la fuga o aplastamiento de las larvas.

En el caso de que la herida aumentara de tamaño en los primeros 14 días se consideró falla en el tratamiento. Si se presentaban datos de infección moderada o grave según los criterios descritos por Lipsky, et al.⁶¹ para pie diabético, al paciente se le indicaba terapia antimicrobiana sistémica y se eliminaba del estudio, al igual que si recibía antibióticos sistémicos por cualquier otra causa.

Análisis de los datos

La información se recolectó en formas diseñadas ex profeso. Para la parte operativa del análisis estadístico se utilizó el paquete de programas de cómputo Biomedical Computer Programs, D-Series (BMDP) (Versión 7).

Como variable explicativa fungió la pertenencia a grupo (grupo I o grupo II). En primer lugar, en función de la escala de medición de las variables involucradas, en cada grupo se describió la información, tanto gráfica como numérica, esto último mediante la realización de estadísticas descriptivas. Respecto a la estadística inferencial, se aplicaron diversas técnicas estadísticas (dos colas con $\alpha = 0.05$) para investigar la presencia de diferencias significativas en las asociaciones a investigar.

Debido a que la variable explicativa fue de tipo categórico, cuando la variable respuesta también era de tipo categórico y estaba medida en escala nominal se realizó la prueba exacta de Fisher. Por el reducido tamaño de la muestra no fue posible contrastar variables que tuviesen más de dos categorías. Cuando la variable respuesta estaba medida en escala de tipo ordinal, o bien de razón, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, y para comparar dentro de cada grupo los resultados obtenidos en el momento final con respecto al inicial se utilizó la prueba de Wilcoxon.

En primer lugar, se realizó una contrastación entre los dos grupos en función de los resultados obtenidos en las variables iniciales del estudio, a fin de investigar la validez interna. A continuación, se procedió a comparar

Tabla 1. Comparación de ambos grupos en el momento inicial

| | Grupo LT | | | Grupo control | | | Mann-Whitney* | p |
|-------------------------|----------|--------|--------|---------------|--------|--------|---------------|-------------------|
| | Mediana | Mínimo | Máximo | Mediana | Mínimo | Máximo | | |
| Edad (años) | 77.5 | 53 | 93 | 56 | 42 | 79 | 74.5 | 0.01 [†] |
| Meses de evolución | 18.5 | 4 | 408 | 84 | 3 | 180 | 31 | 0.25 |
| Largo (cm) | 8.89 | 4 | 11.69 | 7.3 | 1.8 | 12.3 | 49 | 0.45 |
| Ancho (cm) | 3.09 | 2.09 | 10.39 | 3.5 | 0.9 | 7.9 | 42 | 0.89 |
| Área (cm ²) | 23.13 | 9.23 | 105.04 | 28 | 2.16 | 97.17 | 49 | 0.45 |
| Granulación (%) | 25 | 5 | 95 | 30 | 10 | 90 | 35.5 | 0.65 |
| Fibrina (%) | 70 | 5 | 93 | 55 | 10 | 85 | 46.5 | 0.59 |
| Necrosis (%) | 0 | 0 | 20 | 5 | 0 | 15 | 27 | 0.17 |
| Exudado | 6 | 3 | 9 | 6 | 3 | 10 | 39.5 | 0.92 |
| Olor | 2 | 0 | 9 | 2 | 0 | 6 | 49 | 0.43 |
| Dolor | 8 | 0 | 10 | 5 | 0 | 10 | 46 | 0.61 |
| Ansiedad | 5 | 0 | 10 | 5 | 0 | 8 | 42 | 0.89 |

*Con distribución de χ^2 .

†Significancia estadística.

los resultados obtenidos entre ambos grupos en función de las variables de interés primario del estudio, así como de las variables auxiliares a las de interés primario.

Resultados

Durante el transcurso de 12 meses se valoró a 52 pacientes con diagnóstico inicial de úlcera venosa, de los cuales 19 cumplieron con los criterios de selección y fueron incluidos en el estudio de forma aleatoria, quedando 10 pacientes en el grupo de LT y nueve en el grupo control. Dos pacientes del grupo de LT fueron posteriormente eliminados: uno debido a que solo acudió a la primera cita y se perdió al seguimiento, y el otro debido a importante dislalia que le impedía comunicarse y ser valorado adecuadamente. Así, al final del estudio, el grupo I (LT) quedó conformado por ocho pacientes y el grupo II (control) por nueve pacientes.

Al contrastar los valores iniciales obtenidos en cada grupo no se detectaron diferencias significativas entre los grupos, excepto en la mediana de edad, pues los pacientes del grupo de LT eran mayores (mediana 77.5 vs. 56 años) (Tabla 1). El número de úlceras con carga bacteriana por encima de 1×10^6 UFC/g

tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos al inicio.

Al final del periodo de observación de 4 semanas, al realizar un análisis intragrupal mediante la prueba de Wilcoxon ambos grupos presentaron una reducción significativa en las dimensiones de las heridas, con una mejora de las características del lecho, aumento de tejido de granulación y reducción en la fibrina y la necrosis. El exudado disminuyó y el dolor se redujo. En el grupo de LT hubo un aumento de la percepción en el olor de la herida, y la ansiedad solo aumentó ligeramente.

Comparando ambos grupos de forma intergrupar al final de las 4 semanas, se observó que no hubo diferencias significativas en la reducción de las dimensiones de la herida ni en la mejora de las características del lecho, la profundidad o la reducción del dolor. Sin embargo, sí se vio que la cantidad de exudado fue significativamente menor ($p = 0.04$) en el grupo tratado con LT.

En cuanto a los efectos adversos de la terapia, los pacientes reportaron un aumento en el olor ($p = 0.02$) y la ansiedad ($p = 0.02$) con mayor frecuencia en el grupo de LT en comparación con el grupo control (Tabla 2). Ambos tratamientos resultaron igualmente

Tabla 2. Resultados de ambos grupos al final de 4 semanas de tratamiento

| | Grupo LT | | | Grupo control | | | Mann-Whitney* | p |
|-------------------------|------------------------|--------|------------------------|------------------------|--------|------------------------|---------------|-------------------|
| | Mediana | Mínimo | Máximo | Mediana | Mínimo | Máximo | | |
| Largo (cm) | 6.65 | 4.50 | 13.19 | 5.3 | 0 | 11.8 | 37.5 | 0.09 |
| Ancho (cm) | 2.84 | 1.70 | 11.50 | 3.3 | 0 | 8.5 | 34.5 | 0.20 |
| Área (cm ²) | 14.82 | 7.07 | 96.41 | 19.18 | 0 | 78.77 | 36 | 0.14 |
| Granulación (%) | 90 | 40 | 100 | 60 | 0 | 90 | 36.5 | 0.12 |
| Fibrina (%) | 10 | 0 | 60 | 20 | 0 | 100 | 17.5 | 0.35 |
| Necrosis (%) | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 28 | 0.31 |
| Exudado | 2 | 2 | 3 | 3 | 0 | 6 | 40 | 0.04 [†] |
| Olor | 7 | 0 | 10 | 3 | 0 | 6 | 41.5 | 0.02 [†] |
| Dolor | 6 | 0 | 10 | 2.14 | 0 | 5 | 38.5 | 0.07 |
| Ansiedad | 7 | 0 | 9 | 0 | 0 | 5 | 41.5 | 0.02 [†] |
| Carga bacteriana final | 1.16 x 10 ⁶ | 0 | 1.03 x 10 ⁷ | 3.91 x 10 ⁶ | 0 | 8.25 x 10 ⁶ | 14 | 0.05 [†] |

*Con distribución de χ^2 .

†Significancia estadística.

dolorosos a lo largo del estudio ($p = 0.07$). El dolor era moderado (nunca mayor de 6-10) y cedió con el uso de analgésicos convencionales. No se presentó ningún efecto adverso que fuera calificado como grave. Durante el tratamiento con LT, en ocho ocasiones los pacientes reportaron fuga de larvas. Esta fuga fue parcial y se debió al despegamiento del borde del hidrocólide. En todos los casos, la mayoría de las larvas permanecieron en el lecho y solo algunas se reportaron fuera del apósito. Ningún paciente tuvo más de una fuga.

Se aislaron 41 microorganismos diferentes en los cultivos, entre grampositivos, gramnegativos y anaerobios. Todas las bacterias que se encontraron en una concentración mayor de 1×10^6 UFC/g de tejido se consideraron de significancia clínica⁶². Al final del estudio hubo una reducción global más significativa en la carga bacteriana en el grupo tratado con LT en comparación con el grupo control ($p = 0.05$) (Tabla 2). Al separar las bacterias en grampositivas, gramnegativas y anaerobias, esta disminución fue mayor en el grupo de las grampositivas ($p = 0.04$).

Discusión

El resurgimiento del uso de las larvas de grado médico de *L. sericata* para el desbridamiento de las

úlceras venosas es reciente. En Latinoamérica, su utilización se retomó en el año 2001 en el Hospital General Dr. Manuel Gea González. A pesar de su uso cada vez más común en todo el mundo, son pocos los estudios controlados que se han realizado para analizar su eficacia.

El primer estudio realizado en pie diabético neuropático comparó la eficacia de la LT contra el uso de hidrogel⁶³. Las heridas tratadas con LT cerraron en mayor proporción y tuvieron más tejido de granulación a las 10 semanas. Posteriormente se publicaron otros estudios, todos ellos comparando la LT con métodos no quirúrgicos de desbridamiento, principalmente con el uso de hidrogel en pie diabético, úlceras por presión y úlceras de pierna^{34,36,37,64-66}. En general, todos estos estudios concluyen que el tiempo de desbridamiento usando LT es menor y que pudiese favorecer una cicatrización más rápida que con curaciones convencionales usando gasa o hidrogel, con un costo similar. Un estudio de Malasia realizado en pie diabético mostró que la LT fue tan eficaz como el manejo convencional con desbridamiento quirúrgico, aplicación de injertos, colgajos, etc., demostrando así que la LT es un método tan válido como la cirugía para el manejo del pie diabético⁶⁷.

Las úlceras venosas son por mucho las heridas crónicas más frecuentes en la consulta de las clínicas de

heridas alrededor del mundo. En el estudio *Vein Consult Program*, capítulo México, se obtuvo una prevalencia de enfermedad venosa crónica del 71.3%. De estos pacientes, el 1.3% presentaban una úlcera venosa activa y el 1.5% más presentaban una ya cicatrizada⁶⁸. El método de referencia en el tratamiento del paciente con úlceras venosas es la aplicación de compresión adecuada⁴² y la preparación del lecho de la herida mediante desbridamiento del tejido necrótico, tratamiento de la infección superficial o profunda, control adecuado del exudado mediante el uso de apósitos absorbentes no adherentes y, en caso necesario, el uso de terapias avanzadas⁶⁹. Uno de los métodos más utilizados para realizar el desbridamiento del tejido necrótico es el quirúrgico, que puede resultar doloroso, es poco selectivo, puede ocasionar sangrado y puede estar contraindicado, según sea la comorbilidad de cada paciente.

La LT es un método de desbridamiento que tiene la característica de ser altamente selectivo y aportar otros beneficios, como la destrucción de bacterias patógenas, por lo que resulta por demás idóneo para el desbridamiento de las úlceras venosas^{36,37,47,70-74}.

Los hallazgos del presente estudio comparativo aleatorizado en pacientes mexicanos con úlceras venosas sugieren que el uso de LT es tan eficaz como el desbridamiento estándar utilizando cureta, con la ventaja agregada de que la LT redujo significativamente la carga bacteriana, incluso cuando se utilizó en el grupo control un antiséptico de amplio espectro como la SDP.

Al inicio del estudio, los pacientes del grupo de LT eran en promedio mayores que los del grupo control. Sin embargo, esto no debiera afectar los resultados observados, ya que esta variable no se considera un factor que impacte en la cicatrización de los pacientes de acuerdo con estudios ya publicados^{75,76}. En todo caso, los resultados en este grupo debieron haber sido inferiores y no lo fueron.

En ambos grupos se percibió una mejoría importante de las heridas, con reducción del área de 23 a 14 cm² en el grupo de LT y de 28 a 19 cm² en el grupo control. Esto era esperado debido a que en ambos grupos se utilizó terapia convencional siguiendo las guías de manejo, y aunque proporcionalmente el grupo de LT pareciera haber cerrado más, esta diferencia no fue significativa, lo cual puede deberse al tamaño de la muestra y a que el estudio no tuviera el suficiente poder. Además, esta reducción de aproximadamente el 65% en el tamaño de las úlceras en 4 semanas predice que en 12 semanas las úlceras estarán cicatrizadas^{53,77-79}.

También fue clara la reducción en la cantidad de fibrina y necrosis, y el aumento en el tejido de granulación de forma importante en el lecho de la herida, lo que respalda aún más que la LT es tan eficaz como el curetaje de la herida para desbridar y promover la cicatrización. Esto ya había sido observado en múltiples estudios previos en el pie diabético^{73,80-82}.

De manera inesperada, pues las larvas producen gran cantidad de secreciones que se suman al exudado ya existente en la herida, la LT al final del estudio redujo la cantidad de exudado en la herida. Esto pudiese deberse a un efecto indirecto, ya que, al reducirse la cantidad de bacterias en la herida y el tejido necrótico, se reduce la inflamación y con ello el edema y la producción de exudado⁸³.

Como era de esperar y ha sido reportado previamente⁸⁴⁻⁸⁷, los pacientes en el grupo de LT experimentaron un aumento en el olor de la herida y reportaron mayor ansiedad con el tratamiento. Lo anterior parece no tener un impacto real en la aceptación del paciente a la LT, pues esta percepción se reduce de forma importante una vez que se ha iniciado⁸⁴. Para mejorar la aceptación de la LT se han ideado recientemente métodos como la fabricación de pequeños sobres o bolsas que contienen las larvas^{64,86,88}. Incluso se están ensayando geles que contienen las secreciones o extractos de las larvas, manteniendo el beneficio de las larvas libres^{15,89,90}.

El dolor en los pacientes fue el mismo en ambos grupos y siempre se mantuvo alrededor de 6 en una escala visual analógica de 0 a 10. Esto coincide con lo reportado previamente de que las úlceras superficiales que presentan dolor desde un inicio pueden mantenerse igual o aumentar^{91,92}.

Decidimos realizar la terapia de forma ambulatoria dado que previamente se había demostrado su utilidad. Es importante señalar que el uso ambulatorio pudiera reducir los costos de tratamiento, aunque esta variable no fue estudiada.

De los hallazgos más interesantes del presente estudio destaca la significativa reducción de la carga bacteriana en el grupo con LT, en particular de las bacterias grampositivas. Los efectos antimicrobianos de la LT han sido estudiados desde sus inicios. Recientemente se han aislado compuestos antibacterianos e incluso antifúngicos en las secreciones de las larvas^{20-23,93-97}, y se ha demostrado su capacidad para inhibir organismos resistentes y destruir biopelículas^{12,26-31,98,99}. Por lo anterior, y con el fin de no otorgar ninguna ventaja al grupo de LT que pudiese atribuirse a estas propiedades, se decidió utilizar SDP en el

grupo control. Aun utilizando este antimicrobiano de amplio espectro, la LT fue superior en reducir la carga bacteriana (UFC/g de tejido).

En un futuro resultará interesante evaluar el papel de la cirugía en comparación con la LT sin aplicación de SDP.

En conclusión, el presente estudio sugiere que en las úlceras venosas la LT es superior en el control de la carga bacteriana, y tan útil para desbridar y favorecer la cicatrización de la herida, como el desbridamiento quirúrgico con cureta.

Agradecimientos

Biol. Entomol. Alicia Fonseca Muñoz, por su ayuda en la clasificación de las moscas *L. sericata*. Dra. Ana Laura Gutiérrez Aguayo, encargada del bioterio de *L. sericata*. Dr. Ramón Ruiz Maldonado, por el espacio para el bioterio. Dr. Ronald Sherman, por compartir el método de crianza y aplicación. Dr. R. Gary Sibbald, por el manejo de la información bacteriológica. A la empresa Smith & Nephew, por el donativo de los vendajes Proguide® para la estandarización de la compresión.

Financiamiento

Los fondos para la presente investigación se obtuvieron de la Fundación Nacional para la Enseñanza y la Investigación de la Dermatología A.C. Los vendajes compresivos Proguide® que se utilizaron para estandarizar el tratamiento compresivo fueron donativo de la casa comercial Smith & Nephew.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses en la realización de la presente investigación.

Bibliografía

- Asociación Mexicana para el Cuidado Integral y Cicatrización de Heridas. Clinical practice guideline for the treatment of acute and chronic wounds with maggot therapy. Mexico: Asociación Mexicana para el Cuidado Integral y Cicatrización de Heridas A.C.; 2010:43.
- Jones M, Thomas S. Larval therapy. Nurs Stand. 2000;14:47-51; quiz 53.
- Mumcuoglu KY. Maggot debridement therapy. Plast Reconstr Surg. 2007;120:1738-9; author reply 1739.
- Pechter EA, Sherman RA. Maggot therapy: the surgical metamorphosis. Plast Reconstr Surg. 1983;72:567-70.
- Sherman RA, Hall MJ, Thomas S. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. Annu Rev Entomol. 2000;45:55-81.
- Pare A. The apologie and treatise of Ambroise Paré. New York: Dover; 1968:227.
- Sokolov M, Kiyakovskiy F. On typhus and fever in the former Southern Army in the end of 1855 and the beginning of 1856. St. Petersburg: 1857.
- Baer WS. The classic: the treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blow fly). 1931. Clin Orthop Relat Res. 2011;469:920-44.
- Shinkman R. Worms and squirms. Maggots, leeches are making a comeback in modern medicine. Mod Healthc. 2000;30:54-5.

- Contreras-Ruiz J. Maggot debridement therapy in Mexico. Wound Care Canada. 2005;3:42-6.
- Davydov L. Maggot therapy in wound management in modern era and a review of published literature. J Pharm Pract. 2011;24:89-93.
- Harris LG, Nigam Y, Sawyer J, Mack D, Pritchard DI. Lucilia sericata chymotrypsin disrupts protein adhesin-mediated staphylococcal biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2013;79:1393-5.
- Honda K, Okamoto K, Mochida Y, et al. A novel mechanism in maggot debridement therapy: protease in excretion/secretion promotes hepatocyte growth factor production. Am J Physiol Cell Physiol. 2011;301:C1423-30.
- Telford G, Brown AP, Kind A, English JS, Pritchard DI. Maggot chymotrypsin I from *Lucilia sericata* is resistant to endogenous wound protease inhibitors. Br J Dermatol. 2011;164:192-6.
- Telford G, Brown AP, Rich A, English JS, Pritchard DI. Wound debridement potential of glycosidases of the wound-healing maggot, *Lucilia sericata*. Med Vet Entomol. 2012;26:291-9.
- Tellez GA, Acero MA, Pineda LA, Castano JC. [Effect of maggot therapy on minimally necrotic tissues: characterization of larval enzymatic excretion/secretion]. Biomedica. 2012;32:312-20.
- Cazander G, Pritchard DI, Nigam Y, Jung W, Nibbering PH. Multiple actions of *Lucilia sericata* larvae in hard-to-heal wounds: larval secretions contain molecules that accelerate wound healing, reduce chronic inflammation and inhibit bacterial infection. Bioessays. 2013;35:1083-92.
- Cerovsky V, Zdarek J, Fucik V, Monincova L, Voburka Z, Bem R. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. Cell Mol Life Sci. 2010;67:455-66.
- Poppel AK, Koch A, Kogel KH, et al. Lucimycin, an antifungal peptide from the therapeutic maggot of the common green bottle fly *Lucilia sericata*. Biol Chem. 2014;395:649-56.
- Poppel AK, Vogel H, Wiesner J, Vilcinskis A. Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59:2508-14.
- Valachova I, Bohova J, Palosova Z, Takac P, Kozanek M, Majtan J. Expression of lucifensin in *Lucilia sericata* medicinal maggots in infected environments. Cell Tissue Res. 2013;353:165-71.
- Valachova I, Prochazka E, Bohova J, Novak P, Takac P, Majtan J. Antibacterial properties of lucifensin in *Lucilia sericata* maggots after septic injury. Asian Pac J Trop Biomed. 2014;4:358-61.
- Valachova I, Takac P, Majtan J. Midgut lysozymes of *Lucilia sericata* - new antimicrobials involved in maggot debridement therapy. Insect Mol Biol. 2014;23:779-87.
- Courtenay M, Church JC, Ryan TJ. Larva therapy in wound management. J R Soc Med. 2000;93:72-4.
- Bohova J, Majtan J, Majtan V, Takac P. Selective antibiofilm effects of *Lucilia sericata* larvae secretions/excretions against wound pathogens. Evid Based Complement Alternat Med. 2014;2014:857360.
- Cazander G, van Veen KE, Bouwman LH, Bernards AT, Jukema GN. The influence of maggot excretions on PAO1 biofilm formation on different biomaterials. Clin Orthop Relat Res. 2009;467:536-45.
- Cazander G, van de Veerdonk MC, Vandenbroucke-Grauls CM, Schreurs MW, Jukema GN. Maggot excretions inhibit biofilm formation on biomaterials. Clin Orthop Relat Res. 2010;468:2789-96.
- Harris LG, Bexfield A, Nigam Y, Rohde H, Ratcliffe NA, Mack D. Disruption of *Staphylococcus epidermidis* biofilms by medicinal maggot *Lucilia sericata* excretions/secretions. Int J Artif Organs. 2009;32:555-64.
- Jiang KC, Sun XJ, Wang W, et al. Excretions/secretions from bacteria-pretreated maggot are more effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. PLoS One. 2012;7:e49815.
- van der Plas MJ, Jukema GN, Wai SW, et al. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 2008;61:117-22.
- van der Plas MJ, Dambrot C, Dogterom-Ballering HC, Kruithof S, van Dissel JT, Nibbering PH. Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. J Antimicrob Chemother. 2010;65:917-23.
- Bonn D. Maggot therapy: an alternative for wound infection. Lancet. 2000;356:1174.
- Mumcuoglu KY. Clinical applications for maggots in wound care. Am J Clin Dermatol. 2001;2:219-27.
- Dumville JC, Worthy G, Bland JM, et al. Larval therapy for leg ulcers (VenUS II): randomised controlled trial. BMJ. 2009;338:b773.
- Dumville JC, Worthy G, Soares MO, et al. VenUS II: a randomised controlled trial of larval therapy in the management of leg ulcers. Health Technol Assess. 2009;13:1-182, iii.
- Mudge E, Price P, Walkley N, Harding KG. A randomized controlled trial of larval therapy for the debridement of leg ulcers: results of a multicenter, randomized, controlled, open, observer blind, parallel group study. Wound Repair Regen. 2014;22:43-51.
- Soares MO, Iglesias CP, Bland JM, et al. Cost effectiveness analysis of larval therapy for leg ulcers. BMJ. 2009;338:b825.

38. Contreras-Ruiz J, Escotto-Sanchez I, Cobo-Morales JF. Úlceras venosas. En: Contreras-Ruiz J, editor. Abordaje y manejo de las heridas. México: Interistemas Editores; 2013. p. 271-95.
39. Engelhardt M, Spech E, Diener H, Faller H, Augustin M, Debus ES. Validation of the disease-specific quality of life Wuerzburg Wound Score in patients with chronic leg ulcer. *Vasa*. 2014;43:372-9.
40. Price PE, Fagervik-Morton H, Mudge EJ, et al. Dressing-related pain in patients with chronic wounds: an international patient perspective. *Int Wound J*. 2008;5:159-71.
41. Salome GM, Openheimer DG, de Almeida SA, Bueno ML, Dutra RA, Ferreira LM. Feelings of powerlessness in patients with venous leg ulcers. *J Wound Care*. 2013;22:628, 630, 632-628, 630, 634.
42. O'Donnell TFJ, Passman MA, Marston WA, et al. Management of venous leg ulcers: clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery (R) and the American Venous Forum. *J Vasc Surg*. 2014;60:3S-59S.
43. Tang JC, Marston WA, Kirsner RS. Wound Healing Society (WHS) venous ulcer treatment guidelines: what's new in five years? *Wound Repair Regen*. 2012;20:619-37.
44. Sosa-de-Martinez MC, Pablos-Hach JL, Santos-Atherton D. Guía para elaborar el protocolo de investigación. Parte 2. Clasificación del protocolo de investigación. *Acta Ped Mex*. 1994;15:139-45.
45. Sherman RA. Maggot debridement therapy for treating non-healing wounds. *Wound Repair Regen*. 2000;8:327.
46. Cañedo LD, García RH, Méndez RI. Principios de investigación médica. México: Ediciones DIF; 1977. p. 399.
47. Sherman RA, Tran JM, Sullivan R. Maggot therapy for venous stasis ulcers. *Arch Dermatol*. 1996;132:254-6.
48. Sherman RA. A new dressing design for use with maggot therapy. *Plast Reconstr Surg*. 1997;100:451-6.
49. Feinstein AR. An additional basic science for clinical medicine: IV. The development of clinimetrics. *Ann Intern Med*. 1983;99:843-8.
50. Freeman K, Smyth C, Dallam L, Jackson B. Pain measurement scales: a comparison of the visual analogue and faces rating scales in measuring pressure ulcer pain. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2001;28:290-6.
51. Marx RG, Bombardier C, Hogg-Johnson S, Wright JG. Clinimetric and psychometric strategies for development of a health measurement scale. *J Clin Epidemiol*. 1999;52:105-1.
52. Sucker K, Both R, Bischoff M, Guski R, Winneke G. Odor frequency and odor annoyance. Part I: assessment of frequency, intensity and hedonic tone of environmental odors in the field. *Int Arch Occup Environ Health*. 2008;81:671-82.
53. Kantor J, Margolis DJ. Efficacy and prognostic value of simple wound measurements. *Arch Dermatol*. 1998;134:1571-4.
54. Falanga V. Classifications for wound bed preparation and stimulation of chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 2000;8:347-52.
55. Bharadwaj R, Joshi BN, Phadke SA. Assessment of burn wound sepsis by swab, full thickness biopsy culture and blood culture - a comparative study. *Burns Incl Therm Inj*. 1983;10:124-6.
56. Loeb EC, Marvin JA, Heck EL, Curreri PW, Baxter CR. The method of quantitative burn-wound biopsy cultures and its routine use in the care of the burned patient. *Am J Clin Pathol*. 1974;61:20-4.
57. Sapico FL, Canawati HN, Witte JL, Montgomerie JZ, Wagner FWJ, Bessman AN. Quantitative aerobic and anaerobic bacteriology of infected diabetic feet. *J Clin Microbiol*. 1980;12:413-20.
58. Murray F, Benbow M. Diabetic foot ulcer associated with Wegener's granulomatosis. *J Wound Care*. 1999;8:377-8.
59. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:244-69.
60. Steer JA, Papini RP, Wilson AP, McGrouther DA, Parkhouse N. Quantitative microbiology in the management of burn patients. I. Correlation between quantitative and qualitative burn wound biopsy culture and surface alginate swab culture. *Burns*. 1996;22:173-6.
61. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2013;103:2-7.
62. Dow G, Browne A, Sibbald RG. Infection in chronic wounds: controversies in diagnosis and treatment. *Ostomy Wound Manage*. 1999;45:23-7, 29.
63. Markevich YO, McLeod-Roberts J, Mousley M, Melloy E. Maggot therapy for diabetic neuropathic foot wounds: a randomized study. En: Proceedings of the 36th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Jerusalem, Israel; 2000.
64. Opletalova K, Blaizot X, Mourgéon B, et al. Maggot therapy for wound debridement: a randomized multicenter trial. *Arch Dermatol*. 2012;148:432-8.
65. Sherman RA, Wyle F, Vulpe M. Maggot therapy for treating pressure ulcers in spinal cord injury patients. *J Spinal Cord Med*. 1995;18:71-4.
66. Sherman RA, Shimoda KJ. Presurgical maggot debridement of soft tissue wounds is associated with decreased rates of postoperative infection. *Clin Infect Dis*. 2004;39:1067-70.
67. Paul AG, Ahmad NW, Lee HL, et al. Maggot debridement therapy with *Lucilia cuprina*: a comparison with conventional debridement in diabetic foot ulcers. *Int Wound J*. 2009;6:39-46.
68. Rabe E, Guex JJ, Puskas A, Scuderi A, Fernandez Quesada F. Epidemiology of chronic venous disorders in geographically diverse populations: results from the Vein Consult Program. *Int Angiol*. 2012;31:105-15.
69. Contreras-Ruiz J. Abordaje y manejo de las heridas. México: Interistemas Editores; 2013. p. 395.
70. Gottrup F, Jorgensen B. Maggot debridement: an alternative method for debridement. *Eplasty*. 2011;11:e33.
71. Wollina U, Liebold K, Schmidt WD, Hartmann M, Fassler D. Biosurgery supports granulation and debridement in chronic wounds - clinical data and remittance spectroscopy measurement. *Int J Dermatol*. 2002;41:635-9.
72. Davies C, Woolfrey G, Hogg N, et al. Maggots as a wound debridement agent for chronic venous leg ulcers under graduated compression bandages: a randomised controlled trial. *Phlebology*. 2015;30:693-9.
73. Shi E, Shofler D. Maggot debridement therapy: a systematic review. *Br J Community Nurs*. 2014;19(Suppl 12):S6-S13.
74. McInnes W, Ruzeahji N, Wright N, Cowin AJ, Fitridge R. Venous ulceration contaminated by multi-resistant organisms: larval therapy and debridement. *J Wound Care*. 2013;22:S27-S30.
75. Margolis DJ, Berlin JA, Strom BL. Risk factors associated with the failure of a venous leg ulcer to heal. *Arch Dermatol*. 1999;135:920-6.
76. Margolis DJ, Berlin JA, Strom BL. Which venous leg ulcers will heal with limb compression bandages? *Am J Med*. 2000;109:15-9.
77. Kantor J, Margolis DJ. A multicentre study of percentage change in venous leg ulcer area as a prognostic index of healing at 24 weeks. *Br J Dermatol*. 2000;142:960-4.
78. Gelfand JM, Hoffstad O, Margolis DJ. Surrogate endpoints for the treatment of venous leg ulcers. *J Invest Dermatol*. 2002;119:1420-5.
79. Margolis DJ, Allen-Taylor L, Hoffstad O, Berlin JA. The accuracy of venous leg ulcer prognostic models in a wound care system. *Wound Repair Regen*. 2004;12:163-8.
80. Edwards J, Stapley S. Debridement of diabetic foot ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(1):CD003556.
81. Sun X, Jiang K, Chen J, et al. A systematic review of maggot debridement therapy for chronically infected wounds and ulcers. *Int J Infect Dis*. 2014;25:32-7.
82. Zarchi K, Jemec GB. The efficacy of maggot debridement therapy - a review of comparative clinical trials. *Int Wound J*. 2012;9:469-77.
83. Wound exudate and the role of dressings. A consensus document. *Int Wound J*. 2008;5(Suppl 1):iii-12.
84. Kitching M. Patients' perceptions and experiences of larval therapy. *J Wound Care*. 2004;13:25-9.
85. Sherman RA, Sherman J, Gilead L, Lipo M, Mumcuoglu KY. Maggot debridement therapy in outpatients. *Arch Phys Med Rehabil*. 2001;82:1226-9.
86. Spilsbury K, Cullum N, Dumville J, O'Meara S, Petherick E, Thompson C. Exploring patient perceptions of larval therapy as a potential treatment for venous leg ulceration. *Health Expect*. 2008;11:148-59.
87. Steenvoorde P, Buddingh TJ, van Engeland A, Oskam J. Maggot therapy and the "yuk" factor: an issue for the patient? [letter]. *Wound Repair Regen*. 2005;13:350-2.
88. Evans P. Larvae therapy and venous leg ulcers: reducing the 'yuk factor'. *J Wound Care*. 2002;11:407-8.
89. Britland S, Smith A, Finter W, et al. Recombinant *Lucilia sericata* chymotrypsin in a topical hydrogel formulation degrades human wound eschar ex vivo. *Biotechnol Prog*. 2011;27:870-4.
90. Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI. Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel 3D model by *Lucilia sericata* larval secretions. *J Invest Dermatol*. 2006;126:1410-8.
91. Mumcuoglu KY, Davidson E, Avidan A, Gilead L. Pain related to maggot debridement therapy. *J Wound Care*. 2012;21:400, 402, 404, 405.
92. Steenvoorde P, Buddingh TJ, Oskam J. Determining pain levels in patients treated with maggot debridement therapy. *J Wound Care*. 2005;14:485-8.
93. Stanchev S, Zawada Z, Monincova L, et al. Synthesis of lucifensin by native chemical ligation and characteristics of its isomer having different disulfide bridge pattern. *J Pept Sci*. 2014;20:725-35.
94. Cerovsky V, Bem R. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: the story behind maggot therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2014;7:251-64.
95. El Shazely B, Veverka V, Fucik V, Voburka Z, Zdarek J, Cerovsky V. Lucifensin II, a defensin of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol*. 2013;50:571-8.
96. Nygaard MK, Andersen AS, Kristensen HH, Krogfelt KA, Fojan P, Wimmer R. The insect defensin lucifensin from *Lucilia sericata*. *J Biol Chem*. 2012;287:277-82.
97. Cerovsky V, Slaninova J, Fucik V, et al. Lucifensin, a novel insect defensin of medicinal maggots: synthesis and structural study. *ChemBiochem*. 2011;12:1352-61.
98. Blumens D, Bousfield C. The use of larval therapy to reduce the bacterial load in chronic wounds. *J Wound Care*. 2012;21:244-53.
99. Brown A, Horobin A, Blount DG, et al. Blow fly *Lucilia sericata* nuclease digests DNA associated with wound slough/eschar and with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Med Vet Entomol*. 2012;26:432-9.