



# Efecto de la temperatura sobre la supervivencia de larvas II de *Lucilia sericata* en condiciones de laboratorio

## Temperature effect on *Lucilia sericata* larvae II survivor under laboratory conditions

Sonia Desposorio<sup>1</sup>, Sindy Nomberto<sup>1</sup>, Sandra Paz<sup>1</sup>, Maribel Quispe<sup>1</sup>, Brenda Rodríguez<sup>1</sup>, Giovanna Ureta<sup>1</sup> y Judith Roldán<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo, Perú.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

### RESUMEN

Se evaluó el efecto de las temperaturas de 5°C y 7.5°C sobre la supervivencia de larvas asépticas del segundo estadio de *Lucilia sericata*. Para ello, se emplearon 135 huevos, obtenidos a partir de la crianza de imagos de *L. sericata* en condiciones de laboratorio, que se lavaron con solución salina estéril 0.85%, se trataron con hidróxido de sodio 0.5%; y finalmente, se esterilizaron con formalina 10%. Luego los huevos fueron colocados en agar sangre hasta obtener el segundo estadio larval, dos grupos experimentales fueron sometidos a las temperaturas de 5°C y 7.5°C utilizando una refrigeradora calibrada, durante 5 días; y se utilizó un grupo control, que siguió su desarrollo a temperatura ambiente. Se observó que la temperatura de 5°C tuvo un promedio de 19.69% de supervivencia, mientras que a la temperatura de 7.5°C tuvo un promedio de 51.70% de supervivencia. Conclusiones. La temperatura 5°C tiene un efecto desfavorable en la supervivencia de larvas de estadio II de *L. sericata* y que la temperatura de 7.5°C permite una mayor supervivencia de larvas que a la temperatura de 5°C pero un menor porcentaje de supervivencia que a la temperatura de 23°C.

**Palabras clave:** supervivencia, temperatura, *Lucilia sericata*, larvas asépticas.

### ABSTRACT

Effect of temperatures of 5°C and 7.5°C on the survival of aseptic larvae of the second stage of *Lucilia sericata* it was evaluated. For this, 135 eggs, obtained from the imaging of *L. sericata* were used in laboratory conditions, washed with 0.85% sterile saline solution, treated with 0.5% sodium hydroxide; And finally, 10% formaldehyde were sterilized. The eggs were then placed on blood agar until the second larval stage, two experimental groups were subjected to temperatures of 5°C and 7.5°C using a calibrated refrigerator for 5 days; and a control group was used, which followed its development at room temperature. It was observed that the temperature of 5°C had an average of 19.69% of survival, while at the temperature of 7.5 ° C it had an average of 51.70% of survival. It was concluded that, at temperature of 7.5°C allows a higher larval survival than at a temperature of 5°C but a lower survival rate, compared with the temperature of 23°C.

**Keywords:** survival, temperature, *Lucilia sericata*, aseptic larvae

## INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad se han utilizado larvas de mosca para tratar heridas crónicas, esta terapia fue abandonada con el advenimiento de los antibióticos. La creciente resistencia antimicrobiana y la gran dificultad para desarrollar nuevos antibióticos han ocasionado que, en años recientes, se retomara el uso de este tratamiento y así, hoy día, se utilizan larvas de *Lucilia sericata* producidas asépticamente en laboratorios especializados para evitar la contaminación secundaria de las heridas<sup>1</sup>.

*L. sericata* (Diptera; Calliphoridae) es una mosca necrófaga y una de las especies predominantes en la fauna cadavérica. Se presenta frecuentemente en los meses de verano y tiene distribución cosmopolita. Presentan una coloración metálica verde botella en el abdomen, llegando a medir en estado adulto de diez a quince milímetros<sup>2</sup>.

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<sup>5</sup>. Algunos casos a consecuencia del uso de larvas no estériles, los pacientes presentaron tétanos y erisipelas<sup>6</sup>, de ahí creció la necesidad de buscar medios para la esterilización de huevos de mosca. Livingston mostró la gran necesidad de esterilizar los huevos de mosca antes del tratamiento<sup>7,8</sup>.

La aplicación de la terapia larval requiere el uso de larvas estériles. Aun cuando se pueda dar un eficiente tratamiento microbicida a las larvas, la desinfección se realizaría solamente en la superficie, sin poder esterilizarse el tracto intestinal<sup>9</sup>. Es por esta razón que se prefiere utilizar procedimientos para la esterilización de huevos<sup>2</sup>. Parte fundamental del proceso de desinfección es eliminar una pegajosa masa de albúmina que los cubre y atrapa bacterias; para tal fin, se han propuesto diversos métodos de desinfección<sup>1</sup>. Los primeros procedimientos de este tipo incluían un pretratamiento con solución de Dakin (hipoclorito de sodio diluido o cloro) seguido de una inmersión en cloruro de mercurio o formalina<sup>10</sup>. Otros investigadores sumergieron los huevos sucesivamente en soluciones de hipoclorito de sodio 0.5 % y formaldehído 10 % para después lavarlos en solución de cloruro de sodio 0.15 M.<sup>16</sup><sup>2</sup>.

Los efectos de la temperatura sobre la tasa de desarrollo de moscas se han estudiado ampliamente, sobre todo en los géneros *Calliphora*, *Chrysomya* y *Lucilia*<sup>12</sup>. Las larvas recién nacidas deben utilizarse en las primeras 8 horas posteriores a la eclosión o refrigerarse a temperaturas de entre 8 y 10 °C para ralentizar su metabolismo<sup>13</sup>. Un estudio realizado demuestra que la mínima temperatura para el desarrollo biológico de *L. sericata* se encuentra entre 7.5 y 10°C. Altas tasas de mortalidad se han reportado a 35,0 °C, mientras que temperaturas subóptimas pueden afectar la supervivencia y el crecimiento.

El propósito de este estudio fue determinar el efecto de las temperaturas 5°C y 7.5°C sobre la supervivencia de larvas en estadio II (L2) de *L. sericata* en condiciones de laboratorio, con el fin de utilizarlas posteriormente en el tratamiento de heridas necróticas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de las L2

Se realizó una colecta de adultos de *L. sericata* en el campus de la Universidad Nacional de Trujillo (Trujillo, Perú) utilizando como cebo carne en estado de descomposición. A las 12 horas de la exposición del cebo, se capturó moscas califóridas utilizando trampas entomológicas, las cuales fueron trasladadas al Laboratorio de Artropodología Parasitaria para su determinación taxonómica mediante claves y crianza en jaulas de 31 cm x 53 cm x 31 cm cubiertas con tela tool, a 23-24 °C de temperatura ambiental y 80% HR; para su alimentación se utilizó leche en polvo y agua azucarada embebida en algodones y como medio de oviposición, hígado de vacuno fresco.

Los huevos ovipuestos fueron sometidos al proceso de desinfección, utilizando como base la metodología descrita por Figueroa y col, modificada; es decir, los huevos se separaron en grupos, los cuales se colocaron en cajas estériles de papel filtro que sirvieron de soporte para el lavado en solución salina estéril al 0.85 % en placas Petri estériles. Luego, fueron transferidos a placas Petri con NaOH al 0,5 % por 30 segundos, el cual constituye el tratamiento previo a la esterilización, que permitió disgregar los huevos. Posteriormente, los grupos de huevos fueron lavados con SSFE para eliminar los

residuos de NaOH y se agregó formalina 10% como esterilizante definitivo por 3 minutos. Luego de este tiempo, se llevaron a cabo tres lavados con solución salina estéril al 0,85 %, y finalmente, los huevos fueron secados sobre un papel de filtro estéril.

Los huevos desinfectados se dividieron a su vez en tres grupos de 15 huevos cada uno, los cuales se transfirieron en condiciones de esterilidad, en tres placas Petri con agar sangre, y se sellaron con parafilm, estos representaron los grupos de huevos que posteriormente fueron sometidos a las temperaturas evaluadas (5°C, 7.5°C y T° ambiente). El agar sangre constituyó el medio para la eclosión y a la vez sirvió como fuente de nutrientes para el crecimiento larval. Las placas de Petri se mantuvieron a temperatura ambiente durante aproximadamente 48 horas, tiempo suficiente para alcanzar el segundo estadio larval. Posteriormente, las larvas fueron identificadas morfológicamente por su tamaño.

Al término de las 48 horas, se transfirieron las larvas asépticas en un nuevo medio con agar sangre, para asegurar que la mortalidad de las larvas sea a causa de la temperatura y no a causa factores externos como la falta de oxígeno, la falta de alimento o la acumulación de componentes tóxicos provenientes del metabolismo de las larvas. Las 3 placas Petri que contenían larvas asépticas de segundo estadio, fueron sometidas a temperaturas diferentes: 5 °C, 7.5 °C y 24 °C durante 5 días. Cada 24 horas, durante 5 días se evaluó la contaminación, el índice de eclosión, el tamaño y movilidad de las larvas de cada temperatura.

#### **Determinación de la supervivencia de las L2:**

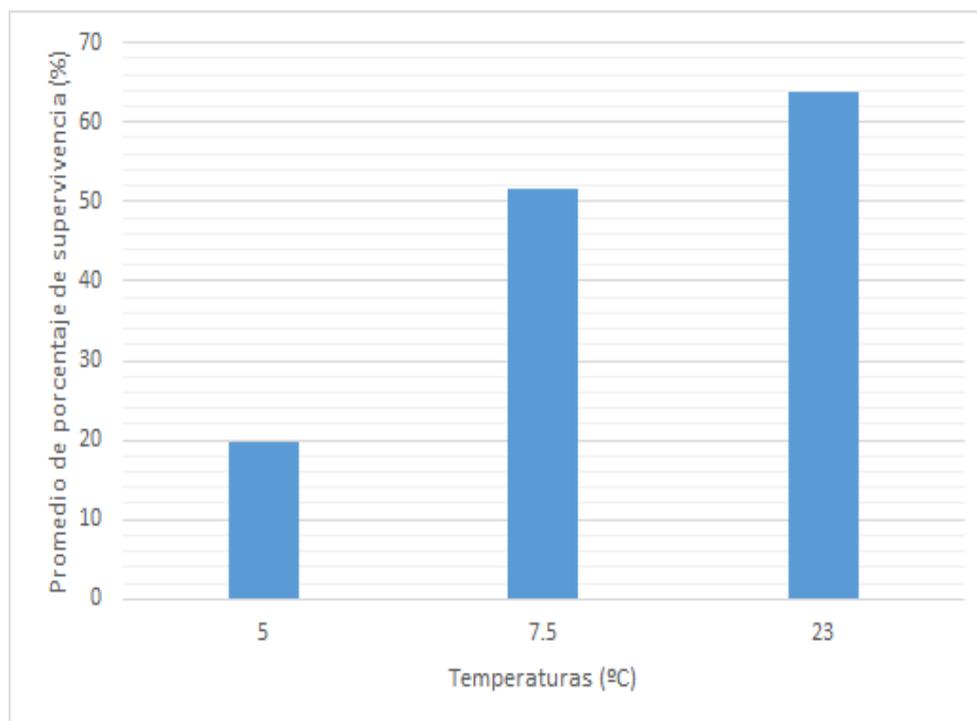
La supervivencia se determinó realizando un conteo de larvas en estadio II de *L.sericata* vivas, a los 5 días de incubación de cada grupo experimental, y para cada una de las repeticiones realizadas, escribiendo los resultados en una tabla de recolección de datos, que incluye la fecha del conteo, la temperatura empleada, el número de larvas vivas y algunas observaciones sobre las características de las larvas al momento del conteo.

#### **Análisis estadístico:**

Los porcentajes de supervivencias obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza ANOVA o AVAR, y posteriormente sus promedios se compararon mediante la prueba de Tukey (p0.05) para verificar si existe o no diferencia significativa entre dos o más medias.

## **RESULTADOS**

La figura 1 muestra los promedios de porcentajes de supervivencia de larvas en estadio II de *L.sericata* después de haber sido sometidas a las temperaturas de 5°C, 7.5°C y 23°C (Control), en esta gráfica se puede observar que el menor promedio de porcentaje de supervivencia se registró para las larvas sometidas a la temperatura de 5°C con un 19.69% , en tanto que el mayor promedio de porcentaje de supervivencia fue para las larvas sometidas a la temperatura de 23°C (Control) con un 63.68% mientras que a la temperatura de 7,5°C se tuvo un promedio de 51.70% de supervivencia. El análisis de varianza (ANAVA) entre los promedios de porcentaje de supervivencia de las larvas II de *L.sericata* con relación a las temperaturas de 5, 7.5°C y 23°C (control), se presenta en la figura 2 donde se observa que hay diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) en las temperaturas de 5 y 23°C.



**Fig. 1.** Promedios de porcentajes de supervivencia de larvas de segundo estadio de *Lucilia sericata* sometidas a las temperaturas de 5, 7.5 y 23°C (control). ( $p < 0,05$ )

## DISCUSIÓN

En este estudio, se observa que la temperatura en la cual existió un mayor porcentaje de supervivencia de larvas II de *L. sericata* fue a 23°C con un valor promedio de 63.68%  $\pm$  22.78 la cual corresponde al grupo control. Así mismo, se obtuvieron menores porcentajes de supervivencia con las temperaturas de 7.5°C y 5°C con valores promedio de 51.7%  $\pm$  22.78 y 19.69%  $\pm$  22.78 respectivamente.

Con respecto al análisis estadístico de varianza (ANAVA), se obtuvo una diferencia significativa ( $\mu=0.05$ ) entre los promedios de supervivencia de larvas II de *L. sericata* obtenidos en los grupos experimentales (5°C, 7.5°C y 23°C). Posteriormente, utilizando la prueba de Tukey, se obtuvo que la temperatura de 5°C tuvo diferencia significativa con la temperatura de 23°C (control), pero no fue estadísticamente significativa con la temperatura de 7.5 °C.

La diferencia significativa obtenida entre las temperaturas de 5 y 23°C, podría haber ocurrido por un cambio brusco de temperatura (choque en frío), debido a que el desarrollo de larvas a temperaturas bajas provocan un estrés fisiológico que se evidencia en un desarrollo más lento y en la disminución de la supervivencia.<sup>17</sup>

Tras la exposición a temperaturas bajas, las larvas pueden entrar en un estado en el cual su movimiento y fisiología se ralentiza progresivamente hasta que las funciones vitales, como la alimentación, cesen por completo.<sup>18</sup> Dado que la frecuencia de contracción de los músculos faríngeos responsable de la ingesta de alimentos también aumenta con las temperaturas más altas, a temperaturas bajas las larvas deben haber ingerido menos nutrientes por unidad de tiempo, afectando su desarrollo.<sup>19</sup>

La exposición al frío también puede causar choque severo que puede producir una lesión irreversible del sistema neuromuscular y eventualmente resultar en muerte, asimismo, puede alterar las hormonas y las proteínas necesarias en la muda y mantenimiento.

Por otro lado, a la temperatura de 7.5°C no se observó diferencia significativa con las temperaturas de 5 y 23°C (control), debido a que algunos autores como Chang y col. afirman que el mantenimiento

idóneo de larvas de *L. sericata* es a temperaturas superiores 8°C, lo que podría aumentar la supervivencia de dichas larvas.

Con respecto a la temperatura de 23°C (control), si bien se obtuvo un mayor porcentaje de supervivencia de larvas II de *L. sericata*, estas siguieron su desarrollo hasta el estadio 3, sin poder permanecer como estadio II, debido a que el tiempo de mantenimiento a temperatura ambiente fue de 5 días (120 horas), tiempo suficiente para pasar del segundo al tercer estadio (69 horas), por otra parte a la temperatura de 7.5 °C permitió la conservación de un menor porcentaje de larvas II, de *L. sericata*.

Las larvas que se utilizan en el tratamiento de heridas son las de tercer estadio, sin embargo las utilizadas como muestra fueron de segundo estadio debido a que las larvas de estadio III al someterla a condiciones de refrigeración corren el riesgo de empupar por un periodo de tiempo más corto (270 horas), mientras que las larvas II al ser sometidas a refrigeración, retrasa su metabolismo permitiendo su conservación por un mayor periodo de tiempo.

Nuestros resultados sugieren que factores como la temperatura de almacenamiento (5° y 7.5°C), la duración del almacenamiento (5 días) y el estadio de vida (II instar) influyen significativamente en la supervivencia y desarrollo de las larvas de *L. sericata*.

Dentro de la misma especie, la tolerancia a baja temperatura puede variar mucho entre individuos, etapas de vida y poblaciones. Los huevos y los primeros instares tienen menos reservas de energía en comparación con las etapas posteriores y son más susceptibles a temperaturas bajas. En un estudio realizado por Retana M, et al., las larvas de estadio 3 fueron más resistentes a 4°C que las de estadio 2.

Las larvas que se utilizan en el tratamiento de heridas necróticas son las de estadio III, pero estas no se utilizaron como muestra, porque si bien estas larvas permanecen como estadio 3, 87 horas, aproximadamente a la mitad de este periodo de tiempo las larvas comienzan a buscar un lugar oscuro, donde se inmovilizan para comenzar el proceso de pupación dejando de alimentarse del tejido necrótico, por lo cual ya no podrían servir en este tratamiento; es por eso que se utilizó las larvas de estadio 2, que al ser sometidas a refrigeración, retrasa su metabolismo permitiendo su conservación en este estadio, para que cuando un médico requiera dichas larvas, se les pueda entregar larvas finalizando el estadio 2 o empezando el tercer estadio, y puedan permanecer en el tratamiento por un mayor periodo de tiempo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ríos J, Mercadillo P, Yuil E, Ríos M. Terapia con larvas de mosca para heridas crónicas: alternativa en una época de creciente resistencia a los antimicrobianos. *Dermatología CQM*. 2013; 11(2):134-141.
2. Figueroa L, Flores J, Rodríguez S. Método de cultivo de larvas de moscas *Lucilia sericata* para terapia larval. *Parasitol Latinoam* 2007; 62: 79-82.
3. Nigam Y, Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe N. Maggot Therapy: The Science and Implication for CAM Part I-History and Bacterial Resistance. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006; 3(2): 223-227.
4. Sánchez M, Chuairé L, Narváez R, Segura N. Biocirugía: utilización de larvas de insectos necrófagos en la curación de heridas. *La terapia larval*. *Cienc. Salud*. 2004; 2 (2): 156-164.
5. Lam K, Babor D, Duthie B, Babor E, Moore M, Gries G. Proliferating bacterial symbionts on house fly eggs affect oviposition behaviour of adult flies. *Animal Behaviour* 2007; 74(1): 81-92.
6. Weil J, Simon R, Sweadner W. A biological, bacteriological and clinical study of larval or maggot therapy in the treatment of acute and chronic pyogenic infections. *Am J Surg* 1933; 19(1): 36-48.
7. Livingston S. The Therapeutic Active Principle of Maggots: With a Description of its Clinical Application in 567 Cases. *J Bone Joint Surg Am* 1936; 18(3): 751-756
8. Lyder C. Pressure ulcer prevention and management. *JAMA* 2003; 289 (2):223-226.
9. Namias N, Varela J, Varas R, Quintana O, Ward C. Biodebridement: a case report of maggot therapy for limb salvage after fourth-degree burns. *J Burn Care Rehabil*. 2000;21(3):254-257.
10. Sherman R, Hall M, Thomas S. Medicinal Maggots: An ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annu Rev Entomol*. 2000; 45:55-81.
11. Roe A, Higley L. Development modeling of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Peer J*. 2015; 3: e803. Disponible en:Classic design
12. Kotzé Z, Villet M, Weldon C. Effect of temperature on development of the blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Int J Legal Med*, 2015; 129(5); 1155-1162.
13. Chan D, Fong D, Leung J, Patil N, Leung G. Maggot debridement therapy in chronic wound care. *Hong Kong Med J* 2007; 13(5): 382-386.

14. Richards C, Paterson I, Villet M. Estimating the age of immature *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), correcting for temperature and geographical latitude. *Int J Legal Med* 2008; 122(4): 271–279
15. Grassberger M, Reiter C. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Sci Int* 2001; 120 (1-2):32–36
16. Richards C, Price B, Villet M. Thermal ecophysiology of seven carrion-feeding blowflies in Southern Africa. *Entomol Exp Appl* 2008; 131:11–19
17. Kotze Z, Villet M, Weldon C. Effect of temperature on development of the blowfly, *Lucilia ciproina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Int J Legal Med*. 2015; 129(5):1155-62.
18. Boivin, G., U. M. Koç Liker-Ott, J. S. Bale, and F. Bigler. 2006. Assessing the establishment potential of inundative biological control agents, pp 98–113. In F. Bigler, D. Babendreier, and U. Kuhlmann (eds.), *Environmental impact of invertebrates for biological control of Arthropods: methods and risk assessment*. CABI Publication, Wallingford. United Kingdom.
19. Niederegger S, Pastuschek J, Mall G. Preliminary studies of the influence of fluctuating temperatures on the development of various forensically relevant flies. *Forensic Sci Int*. 2010; 199(1-3):72-8.