

VPLYV EXKRÉTOV A SEKRÉTOV MEDICÍNSKÝCH LARIEV BZUČIVKY ZELENEJ *LUCILIA SERICATA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) NA ELIMINÁCIU BIOFILMU PATOGÉNOV CHRONICKÝCH RÁN POČAS LARVÁLNEJ TERAPIE

Jana BOHOVÁ¹, Juraj MAJTÁN¹, Peter TAKÁČ^{1,2}

¹ Ústav zoológie SAV, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovenská republika

² Scientica s.r.o., Hybešova 33, 831 06 Bratislava, Slovenská republika

BOHOVÁ, J., MAJTÁN, J. & TAKÁČ, P. 2013: Effect of medicinal maggots common green bottle fly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) on elimination of chronic wounds pathogens biofilm during maggot therapy. *Entomofauna Carpathica*, 25(2): 53-56.

Abstract: The larvae of *Lucilia sericata* are worldwide successfully used to treat the chronic wounds. The healing process of the chronic wounds is complicated by the presence of bacterial microflora able to produce adherent and strongly resistant biofilm. Biofilm protects the bacteria from the antibiotics treatment. *L. sericata* maggots produce excreta and secreta containing substances able to eliminate forming and matured biofilm of Gram positive and Gram negative bacterial species. Antibiofilm, as well as antibacterial and anti-inflammatory properties of *L. sericata* larvae excreta and secreta are key factor of chronic wound healing process stimulation.

Key words: Larvae, *Lucilia sericata*, biofilm chronic wounds

ANTIBIOFILMOVÝ ÚČINOK EXKRÉTOV A SEKRÉTOV MEDICÍNSKÝCH LARIEV

Chronické rany sú celosvetovo významným zdravotným problémom. Najčastejší výskyt v populácii zaznamenávajú chronické rany ako diabetické a venózne vredy dolných končatín či preležaniny. Je to problém spätý s výraznými ekonomickými nákladmi, ako aj so znížením kvality života pacienta po fyzickej, psychickej a socioeconomickej stránke (GJØDSBØL et al. 2006).

Lôžko chronických rán je kolonizované polymikrobiálnou flórou, schopnou vytvárať biofilm. Prítomnosť biofilmu je pre chronické rany charakteristická. Biofilm je vysoko organizovaná, adherentná formácia baktérii. Baktérie s biofilmovým fenotypom silno agregujú a produkujú ochranný obal, ktorý formáciu chráni pred antibiotikami, alebo látkami vlastného imunitného systému (SMITH et al. 2010). Prítomnosť, rast a silná rezistencia biofilmu sa udáva ako jeden z hlavných faktorov zlyhávania hojenia rán (BJARNSHOLT et al. 2008). Podľa posledných štúdií je patogénny biofilm chronických rán zastúpený bakteriálnou populáciou s vysokou druhovou diverzitou a rôznymi fyziologickými nárokmi (PRICE et al. 2009). Polymikrobiálny biofilm je veľmi stabilný, najdominantnejšími izolátmi patogénneho biofilmu sú kmene *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, ďalej sú to *Enterobacter cloacae* a *Proteus mirabilis* (DOWD et al. 2008; OTTO 2008).

Eliminácia biofilmu v zmysle liečby chronických rán je komplikovaný proces. Baktérie tvoriace biofilm majú vyvinutý zložitý mechanizmus získavania živín a obrany voči látkam imunitného systému (RICKARD et al. 2003). Antibiotická liečba nie je dostatočne účinná a zaznamenáva len krátkodobý efekt v eliminácii biofilmu. Známe antibiotiká sú aktívne len voči planktonickým baktériam, zatiaľ čo adherentné baktérie vytvárajúce si ochranný obal z extracelulárnej polymerickej matrix ostávajú voči ich účinku rezistentné (COSTERTON & STEWART 2001).



Obr.1. Imágo (vľavo) a larválne štádium (vpravo) *Lucilia sericata*.

Fig. 1. Imaginal stage (A) and larval stage (B) of *Lucilia sericata*.

Zdroje: <http://www.maltawildplants.com/!faunafungi/maltawildlife.php?species=Lucilia%20sericata>,
<http://news.yahoo.com/blogs/sideshow/healing-power-maggot-slime-010517017.html>

Pri liečbe chronických rán je dôležitý dôkladný debridement. Debridement je mechanické alebo chemické odstránenie nekrotického tkaniva a dezinfekcia rany. Účinným debridementom je larválna terapia, kde sa pri liečbe nehojácich sa rán využíva larválne štádium bzučivky zelenej (*Lucilia sericata* Meigen, 1826). Larválna terapia má svoju dlhoročnú tradíciu, množstvo klinických štúdií dokazuje jej efektívnosť a priaznivé účinky pri stimulácii hojaceho procesu (SHERMAN 2002; ČAMBAL et al. 2008; DUMVILLE et al. 2009; OPLETALOVÁ et al. 2011). Pozitívne



Obr. 2. Stimulácia hojenia pomocou larválnej terapie (A-pred liečbou, B-počas liečby, C-po liečbe).

Fig. 2. Stimulation of wound healing using larval therapy (A-before, B-during and C-after treatment).

Zdroj: <http://www.btmcl.com/eng/>

účinky sú klinicky preukázateľné, ale mechanizmus ako aj konkrétne bioaktívne látky zodpovedné za stimuláciu hojenia nie sú doteraz dostatočne známe.

Súčasťou larválneho debridementu je aj eliminácia biofilmu v rane. Nedávne štúdie sa snažia objasniť vplyv larválnych exkrétov a sekrétov (ES), ktoré larvy *L. sericata* pri larválnej terapii do rany vylučujú. Zameriavajú sa na interakciu larválnych ES a vznikajúceho biofilmu aj vytvoreného biofilmu. Ako prví opisali schopnosť ES

eliminovať biofilm VAN DER PLAS a KOL (2008), kde vytvorený aj formujúci sa biofilm *S. aureus* a *P. aeruginosa* bol vystavený koncentračnej závislosti sterilných larválnych ES. Výsledok štúdie ukázal že antibiofilmový efekt ES úzko závisí od bakteriálneho kmeňa nachádzajúceho sa v rane. ES sú schopné eliminovať formujúci sa a vytvorený biofilm *S. aureus* a *P. aeruginosa* v rôznych aktívnych koncentráciách a časových intervaloch.

Podobne aj CAZANDER a kol. (2010) sledovali vplyv ES na biofilm vytvorený na povrchoch materiálov všeobecne využívaných v chirurgickej praxi. V danej štúdií zaznamenali antibiofilmový účinok ES voči bakteriálnym kmeňom *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella oxyocta*, *Enterococcus faecalis* a *Enerobacter cloacae* na polyetyléne, titáne a chirurgickej oceli. Prítomnosť ES redukovala biofilm sledovaných kmeňov na daných materiáloch až do 92%.

Vo svojej predchádzajúcej práci sa CAZANDER a kol. (2009) zamerali na porovnanie antibiofilmovej aktivity ES sterilných lariev tretieho a prvého instaru. Larvy *L. sericata* prvého aj tretieho instaru produkujú ES s antibiofilmovou aktivitou voči *P. aeruginosa*, ES tretieho instaru však vykazovali nižšiu aktívnu koncentráciu potrebnú na inhibíciu vznikajúceho a degradáciu vytvoreného biofilmu. Autori taktiež parciálne charakterizovali vlastnosti antibiofilmových látok prítomných v ES. Zaznamenali, že vplyvom varu sa antibiofilmový potenciál ES nestráca. HARRIS a kol. (2009) dospel k opačnému výsledku. Zaznamenali že antibiofilmové zložky ES sú termolabilné. Tým potvrdili, že antibiofilmové agensy ES majú enzymatický charakter a vyslovili predpoklad, že aktívna látka patrí do skupiny serínových proteáz. Významnú úlohu proteáz prítomných v ES pri eliminácii biofilmu dokázali aj BROWN a kol. (2012). Ako prvý preukázali význam nukleáz prítomných v ES pri degradácii vytvoreného biofilmu *P. aeruginosa*. Autori pri snahe o čiastočnú identifikáciu látok s antibiofilmovými vlastnosťami označili frakcie ES väčšie ako 10kDa.

VAN DER PLAS a kol. (2010) vo svojej práci zistili, že kombinácia antibiotík a larválnych ES zvyšuje ich antibiofilmový potenciál. Autori sledovali aktivitu ES pri degradácii vytvoreného biofilmu *S. aureus* v kombinácii s vankomycínom, klindamycínom a daptomycínom, teda s antibiotikami bežne aplikovanými pri dezinfekcii rán. Štúdia ukázala že samotné ES parciálne degradujú biofilm, zatiaľ čo kombinácia vyššie spomenutých antibiotických preparátov a larválnych ES úplne degraduje vytvorený biofilm *S. aureus*. Autori dokázali ďalší terapeutický potenciál larválnej terapie, keď látky obsiahnuté v ES zvyšujú potenciál antibiotickej liečby.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Výskum a vývoj nových bioterapeutických metód a ich využitie pri liečbe niektorých závažných ochorení (ITMS: 26240220030), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

BJARNSHOLT, T., KIRKETERP-MOLLER, K., JENSEN, P.O., MADSEN, K.G., PHIPPS, R., KROGFELT, K., HOIBY, N., GIVSKOV, M. 2008. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair and Regeneration* 16: 2-10.

- BROWN, A., HORROBIN, A., BLOUNT, D.G., HILL, P.J., ENGLISH, J., RICH, A., WILLIAMS, P.M., PRITCHARD, D.I. 2012. Blow fly *Lucilia sericata* nuclease digest DNA associated with wound slough/eschar and with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Medical and Veterinary Entomology* 26: 432-439.
- CAZANDER, G., VAN VEERDONK, M.C., VANDERBROUCKE-GRAULS, C.M., SCHREURS, M.W., JUKEMA, G.M. 2010. Maggot excretions inhibit biofilm formation on biomaterials. *Clinical Orthopedics and Related Research* 468: 2789-2796.
- CAZANDER, G., VAN VEEN, K.E., BROUWMANN, L.H., BERNARDS, A.T., JUKEMA, G.N. 2009. The influence of maggots excretions on PAO1 biofilm formation on different biomaterials. *Clinical Orthopaedics and Relative research* 467: 536-545.
- COSTERTON, J.W., STEWART, P.S. 2001. Battling biofilms. *Scientific American* 285: 74-81.
- ČAMBAL, M., KRUMPÁLOVÁ, Z., KOZÁNEK, M., TAKÁČ, P. 2008. Larválna terapia. *NOI Bratislava, Bratislava* 120pp.
- DOWD, S.E., SUN, Y., SECOR, P.R., RHOADS, D.D., WOLCOTT, B.M., JAMES, G.A., WOLCOTT, R.D. 2008. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiology* 8: 43.
- DUMVILLE, J.C., WORTHY, G., BLAND, J. M., CULLUM, N., DOWSON, C., IGLESIAS, C., MITCHELL, J.L., NELSON, E.A., SOARES, M.O., TORGERSON, D.J. 2009. Larval therapy for leg ulcers (VenUS II): randomised controlled trial. *Health technology assessment* 13:1-182.
- 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. *International Journal of Artificial Organs* 32: 555-564
- GJØDSBØL, K., CHRISTENSEN, J.J., KARLSMARK, T., JØRGENSEN, B., KLEIN, B. M., KROGFELT, K.A. 2006. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *International Wound Journal* 3: 225-231.
- OPLĚTALOVÁ K., BLAIZOT X., MORGEON B., CHENE Y., CREVEUIL C., COMBEMALE P., LAPLAUD A.L., SOHYER-LEBREUILLY I., DOMPMARTIN A. 2011. Maggot therapy for wound debridement: A randomised multicenter trial. *Archives of Dermatology* 148: 432-438.
- OTTO, M. 2008. Staphylococcal biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322: 207-228.
- PRICE, L. B., LIU, C. M., MELENDEZ, J. H., FRANKEL, Y.M., ENGELTHALER, D., AZIZ, M., BOWERS, J., RATTRAY, R., RAVEL, J., KINGSLEY, C., KEIM, P.S., LAZARUS, G.S., ZENILMAN, J.M. 2009. Community analysis of chronic wound bacteria using 16S rRNA gene-based pyrosequencing: impact of diabetes and antibiotics on chronic wound bacteria microbiota. *PLoS One* 7: e6462.
- RICKARD, A.H., GILBERT, P., HIGH, N.J., KOLENDRANDER, P.E., HANDLEY, P.S. 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology* 11: 94-100.
- SHERMAN, R.A. 2002. Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair and Regeneration* 10: 208-214.
- SMITH, D.M., SNOW, D.E., REES, E., ZISCHKAU, A.M., HANSON, J.D., WOLCOTT, R.D., SUN, Y., WHITE, J., KUMAR, S., DOWD, S.E. 2010. Evaluation of the bacterial diversity of pressure ulcers using bTEFAP pyrosequencing. *BMC Medical Genomics* 3: 41.
- VAN DER PLAS, M.J., JUKEMA G.N., WAI, S.W., DOGTEROM-BALLERING, H.C., LAGENDIJK, E.L. VAN GULPEN, C., VAN DISSEL, J.T., GLOEMBERG, G.V., NIBBERING, P.H. 2008. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61: 117-122.
- VAN DER PLAS, M.J., DAMBROT, C., DOGTEROM-BALERING, H.C., KRUTHOF, S., VAN DISSEL, J.T., NIBBERING, P.H. 2010. Combination of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 917-923.