

Protocol & Techniques

Terapia larval: protocolo básico de manutenção, desinfecção, transporte e aplicação de larvas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae)

Renata A. Gama^{1✉}, Paula B. T. Brambilla¹, Sarah R. A. Silva¹, Jucelia R. Medeiros¹,
Jéssica T. Jales¹, Marília A. R. Q. Pinheiro^{1,2}, Julianny B. Ferraz², Renato Motta Neto³,
Taciano M. Barbosa¹

¹Laboratório de Insetos e Vetores-LIVE, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil. ²Hospital Universitário Onofre Lopes. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil. ³Laboratório de Micobactérias. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

✉Corresponding author: antonaci@cb.ufrn.br

Edited by: Daniell R. R. Fernandes

Received: May 17, 2021. Accepted: July 27, 2021. Published: August 12, 2021.

Maggot Therapy: basic protocol for maintenance, disinfection, transport, and application of larvae of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae)

Abstract. *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) is an exotic blowfly in Brazil and it is considered one of the main species of medical-forensic importance. Their larvae have a necrophagous habit with a high forensic potential and they are also considered an important tool for treating chronic wounds, a technique known as maggot therapy, which is not yet routinely used in Brazil despite proven efficacy. In this context, the present work aims to describe a protocol for carrying out the technique, with the complete description of colony maintenance, preparation and disinfection of eggs, packing and transportation of larvae for use, application and removal of the larvae on patients. Thus, with this protocol, the maggot therapy can be disseminated and performed by other research groups.

Keywords: Blowflies, larval therapy, rearing protocol, biotherapy.

A utilização de larvas de dípteros califorídeos para tratamentos de feridas crônicas é uma técnica secular, e o primeiro relato foi documentado durante a Guerra Civil Americana (Whitaker et al. 2007). Essa técnica atualmente é conhecida por terapia larval, em que larvas desinfectadas são postas em feridas crônicas para realização do desbridamento e limpeza do tecido necrosado, e assim facilita o processo de cicatrização (Wolf & Hansson 2005).

A terapia por desbridamento larval é comumente aplicada no tratamento de pé diabético em países da Europa e nos Estados Unidos (Whitaker et al. 2007). No Brasil esse procedimento ainda está em fase experimental, focado em modelos animais (Masiero et al. 2020; Barros et al. 2021), embora existam relatos de tratamentos de feridas em humanos em hospitais da rede pública no estado do Rio Grande do Norte (Pinheiro et al. 2015).

Para tal, Pinheiro et al. (2015) utilizaram *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), espécie promissora para o tratamento de feridas crônicas em humanos, uma vez que ocorrem em alta abundância no Brasil. As larvas são raramente associadas à miíase do tipo facultativa, alimentando-se apenas de tecido necrosado quando estão no paciente, e de matéria orgânica em decomposição quando estão no ambiente (Guimarães et al. 1983). Além disso, são facilmente manipuladas em laboratório e não associadas à miíase obrigatória (Guimarães et al. 1983).

A realização da terapia larval necessita de padronização de protocolos rigorosos da criação dos insetos e desinfecção dos ovos (Fleischmann et al. 2004; Sherman 2009; Wang et al. 2010), uma vez que, devido ao hábito necrófago, os ovos e as larvas podem se contaminar e as larvas atuarem como vetores mecânicos de microrganismos patogênicos (Greenberg 1971). Este protocolo é pioneiro na descrição de todos os processos relacionados à terapia larval, incluindo criação,

desinfecção e transporte de larvas de *C. megacephala* para utilização no tratamento de feridas crônicas.

Este protocolo operacional é composto por quatro etapas: 1. Manutenção da colônia de moscas adultas; 2. Preparo e desinfecção dos ovos; 3. Acondicionamento das larvas e envio para aplicação em hospitais; e 4. Aplicação e retirada das larvas das feridas crônicas. Segue a descrição cronologicamente.

1. Manutenção da colônia de moscas adultas

Para início e estabelecimento da colônia de *C. megacephala*, progenitores foram coletados em campo, utilizando armadilhas adaptadas de Ferreira (1978), suspensas 1,5 m acima do solo. As armadilhas consistiram em um tubo cônico, com aproximadamente 50 cm de altura, 10 cm de diâmetro, composto por duas garrafas de Tereftalato de Polietileno transparentes (PET) de volume de 2 L. As extremidades foram abertas na base, a parte inferior pintada de preto. A parte inferior da armadilha recebeu um recipiente contendo isca de fígado de frango, preso à parte superior (Fig. 1). Como a parte inferior da armadilha permaneceu aberta, os odores eliminados pela isca atraíram os indivíduos adultos que, por apresentarem voo ascendente com fototropismo positivo, chegaram ao compartimento superior, permanecendo presos.

Devido à grande diversidade de moscas coletadas na armadilha, os adultos foram identificados em microscópio estereoscópico, através das seguintes características morfológicas: moscas grandes, de cor verde-metálica, com 3 listras transversais abdominais escuras, calíptera inferior castanho-escura, espiráculo torácico anterior escuro e gena amarelada, de acordo com a chave de identificação de Carvalho & Mello-Patiu (2008) (Fig. 2). Aproximadamente 100 machos e 100 fêmeas de *C. megacephala* foram colocados em gaiolas de dimensões

30x30x30cm, com estrutura de acrílico e telas de *nylon* nas laterais, para formação da colônia (Fig. 1). Os indivíduos foram alimentados diariamente com dieta composta de 30 mL de água destilada + 10,5g de dieta seca, composta de 3,5 g de leite em pó integral, 3,5 g de levedo de cerveja e 3,5 g de farinha láctea, misturados em liquidificador e disponibilizados para consumo em placa de Petri (60x15mm). A adição da água à dieta seca possibilitou a formação de uma pasta homogênea, de cor amarronzada, ideal para a alimentação dos indivíduos. Além disso, a cada oito dias, foi adicionado à dieta pastosa 3,5 g de rúmen bovino (bucha) moído e sem sal, como substrato de oviposição para estimular a postura dos ovos, mantidos na colônia por 24h e posteriormente substituídas por dieta sem rúmen. Sobre os recipientes com dieta (com e sem rúmen) foi colocado um quarto de folha de papel filtro úmido e dobrado de forma sanfonada para dar suporte aos ovos. Este procedimento facilita o manuseio dos ovos na fase de desinfecção.

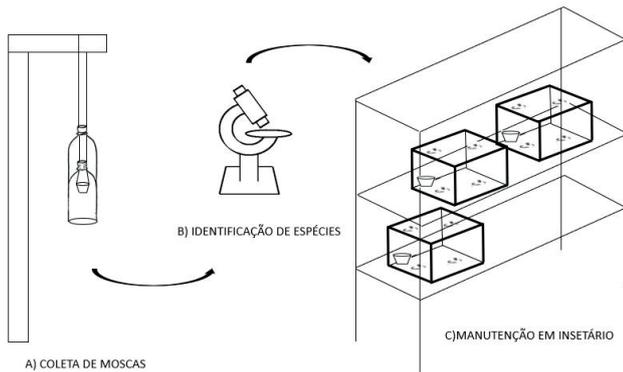


Figura 1. Modelo esquemático das etapas de coleta (A), identificação (B) e estabelecimento da colônia de *Chrysomya megacephala* (C).

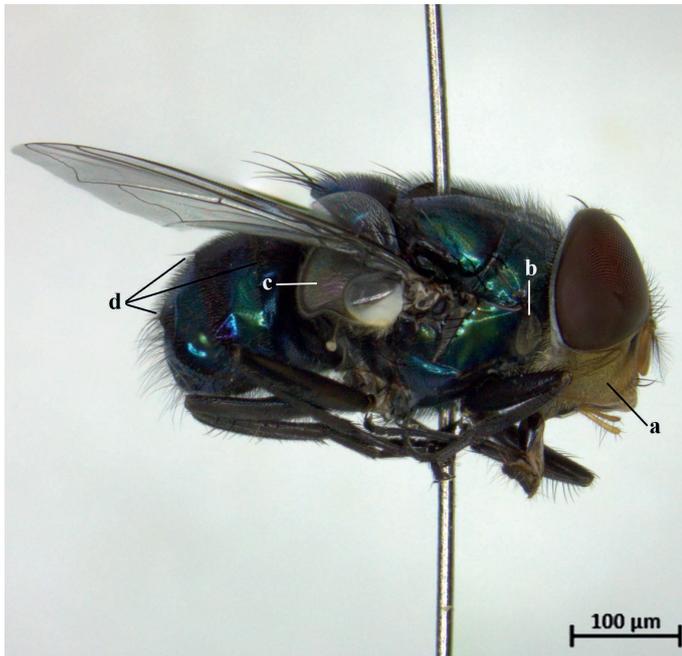


Figura 2. *Chrysomya megacephala* em vista lateral, com destaque para os caracteres taxonômicos importantes na identificação da espécie. a - gena amarelada; b - espiráculo torácico anterior escuro, c - calíptera inferior castanho-escuro, d - listras abdominais transversais escuras.

2. Preparo e desinfecção dos ovos de *Chrysomya megacephala*

Os ovos foram retirados do papel filtro e/ou meio de oviposição (dieta + rúmen), transferidos para uma placa de Petri e observados em microscópio estereoscópico para um manejo mais cauteloso e não inviabilizador, e estimar a quantidade de ovos presentes. A retirada da massa de ovos foi feita com pincel de cerdas sintéticas, redondo, nº 0 (zero), e soro fisiológico, iniciando a separação dos ovos. Em seguida, os ovos foram levados para capela de fluxo laminar, embrulhados em

gaze Rayon¹ formando um “pacote” (Fig. 3), com objetivo de minimizar sua manipulação e aumentar a viabilidade durante o processo de desinfecção.

Posteriormente, o “pacote” passou por sucessivas lavagens com diferentes substâncias (Fig. 3). Primeiramente foi imerso em recipiente com 50 mL de hipoclorito de sódio à 1% por 5 minutos para dissociar a camada mucilaginosa que envolve os ovos, desagregando-os e permitindo a maior ação da substância desinfetante. Em seguida, foi imerso em recipiente com 50 mL de formalina a 10%, por 5 minutos, para desinfecção. Por último, os ovos envoltos na gaze Rayon foram lavados três vezes com soro fisiológico, a fim de remover possíveis resíduos das substâncias químicas anteriormente utilizadas.

Cabe destacar que o soro da terceira lavagem foi reservado para semeio em placa de Petri com meio ágar nutricional, com auxílio de swab estéril (Fig. 3). A placa semeada foi incubada em estufa bacteriológica a $\pm 39^{\circ}\text{C}$, *overnight*, para observação do crescimento microbiano e controle microbiológico do processo de desinfecção. Caso não ocorra crescimento de micro-organismos na placa de Petri, as larvas recém-emergidas serão encaminhadas para aplicação em pacientes.

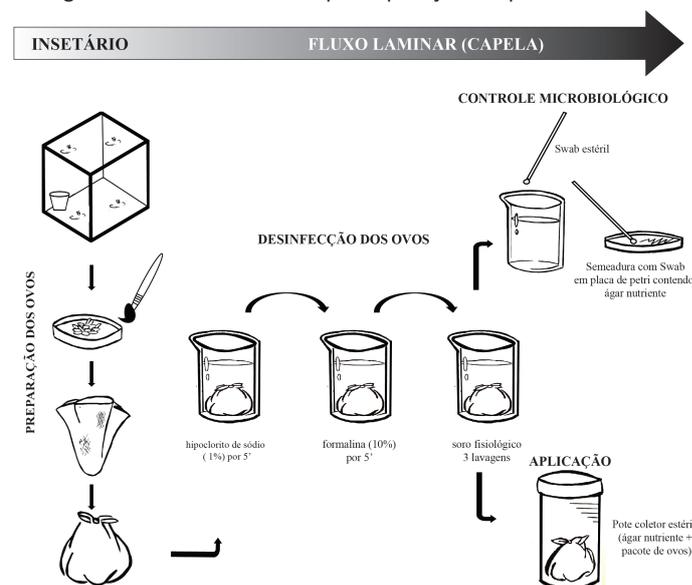


Figura 3. Modelo esquemático do processo de coleta e desinfecção dos ovos de *Chrysomya megacephala* colonizados.

3. Acondicionamento das larvas e envio para aplicação

Após o semeio da placa de Petri com meio ágar, a fim de obter o controle microbiológico da desinfecção, as larvas e ovos remanescentes no pacote de gaze Rayon foram acondicionados em potes coletores estéreis, com meio ágar nutricional (Fig. 3) para emergência e manutenção das larvas recém-emergidas (L1). As tampas dos potes foram perfuradas com agulha fina e cobertas externamente com gaze Rayon, presa com fita microporosa, permitindo suprimento de oxigênio para as larvas. Adicionalmente, os potes coletores foram armazenados em Becker de 1 litro coberto com plástico filme perfurado, preso com fita microporosa, para evitar a fuga das larvas. Os potes são mantidos em temperatura ambiente por aproximadamente 36 horas para mudarem de estágio. Por fim, as larvas L2 foram encaminhadas nos potes coletores, acondicionadas em caixa térmica de isopor, para realização da terapia larval pela equipe de enfermagem.

Devido ao rápido desenvolvimento da espécie *Chrysomya megacephala* (Barros-Cordeiro & Pujol-Luz 2010), o processo de desinfecção deve ser realizado pelo menos 24h a 36h antes da aplicação nos pacientes, pois representa o tempo necessário para a emergência e desenvolvimento das larvas até o estágio seguinte, (L2) (Barros-Cordeiro & Pujol-Luz 2010), período de vida larval ideal para

¹ A gaze Rayon, utilizada no protocolo de desinfecção, é constituída por malha não aderente de acetato de celulose, ideal para feridas que necessitam de curativos com alta absorção, sem aderir. Assegurando que o leito da ferida não sofra injúria pela adesão da gaze no processo de retirada das larvas, o que ocorre com gaze de algodão.

realização da terapia.

4. Aplicação e retirada das larvas de *Chrysomya megacephala* em lesões

Esta etapa é conduzida pela equipe de enfermagem, de acordo com parecer ético e suporte hospitalares. Inicialmente, a equipe responsável seleciona o paciente que possui ferida característica de processos crônicos (como lesão por pressão, venosas e pés diabéticos - exceto em feridas que sangram facilmente). Após o consentimento do paciente, a ferida é limpa, mensurada e suas magens são emolduradas por hidrocolóides para evitar a fuga das larvas (Fig. 4A) (Marcondes 2006) e logo após, as larvas são aplicadas na ferida com auxílio de pipeta de Pasteur e soro fisiológico morno (Fig. 4B). A quantidade de larvas varia de acordo com o tamanho da ferida e percentual de tecido necrosado, mas recomenda-se o uso de 5 a 8 larvas por cm² de tecido necrosado (Fleischmann et al. 2004). O pacote de gaze Rayon com larvas pode ser retirado do pote coletor e aplicado diretamente na ferida. Esse processo garante a manipulação mínima das larvas, já que as mesmas, por serem extremamente ágeis, tendem a escapar do leito da ferida. Após a aplicação, é realizado o curativo utilizando gazes de algodão e atadura de crepom em toda a ferida (Fig. 4C).

Estudos prévios indicam que a permanência das larvas no leito da ferida para realização do desbridamento biológico deve ser de 48 a 96 horas (Fleischmann et al. 2004; Marcondes 2006; DeFazio et al. 2015). Todavia, sugerimos períodos entre 24h e 48h, pois estudos demonstraram alta voracidade das larvas para consumir tecidos necrosados (Pinheiro et al. 2015). A retirada das larvas é feita pela equipe de enfermagem com auxílio de pinça cirúrgica, ou jato de soro fisiológico, efetuando a troca de todo o curativo (Fig. 4D). As larvas (Fig. 4D) deverão ser eutanasiadas em álcool 70% e descartadas em lixo hospitalar (Fig. 4E). Caso necessário, novas larvas poderão ser aplicadas após a retirada das anteriores.

O desenvolvimento e padronização de protocolos de criação e desinfecção de ovos e larvas de mosca em condições laboratoriais aqui demonstrados, pode auxiliar na disseminação do uso e avanço da técnica, inclusive possibilitando a produção de larvas em grande escala e de forma eficiente. A metodologia proposta foi realizada em diversas aplicações da terapia larval no Rio Grande do Norte, e pode ser facilmente adaptada para outras espécies de dípteros necrófagos.



Figura 4. Etapas de aplicação das larvas de *Chrysomya megacephala* para uso na terapia larval. A) Moldura da ferida com hidrocolóide; B) Aplicação das larvas (L2) com pipeta de Pasteur; C) Realização de curativo; D) Retirada do curativo e das larvas; E) Descarte das larvas.

Agradecimentos

Agradecemos a Comissão de Curativos do Hospital Universitário Onofre Lopes e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas dos autores JRM, JTJ e TMB.

Contribuição dos autores

PBTB, SRAS, JRM, JTJ, MARQ e JBF executaram e conduziram a padronização deste protocolo e auxiliaram na produção e revisão do manuscrito. JRM realizou as ilustrações. RAG e TMB idealizaram e escreveram o manuscrito. RMN participou da elaboração da etapa de desinfecção e revisou o manuscrito.

Referências

- Barros, L. A.; Sant'Anna, L. X.; Lessa, C. S.; Aguiar Coelho, V. M.; Nunes, M. P.; Souza, C. M.V.; Duarte, M. C. K. H.; Fonseca, A. B. M.; Sakamoto, C. A. M.; Leite, J. S. (2021) Evaluation of larval therapy compared to antibiotic therapy in the treatment of skin wounds in rabbits. *Journal of Medical Entomology*, 58(2): 900-905. doi: [10.1093/jme/tjaa229](https://doi.org/10.1093/jme/tjaa229)
- Barros-Cordeiro, K. B.; Pujol-Luz, J. R. (2010) Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. *Papeis Avulsos de Zoologia*, 50(47): 709-717. doi: [10.1590/S0031-10492010004700001](https://doi.org/10.1590/S0031-10492010004700001)
- Carvalho, C. J. B.; Melo-Patiu C. A. (2008) Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52(3): 390-406. doi: [10.1590/S0085-56262008000300012](https://doi.org/10.1590/S0085-56262008000300012)
- DeFazio, M.V.; Felder, J.M.; 3rd Economides, J.M.; Attinger, C.E. (2015) Home Improvement in Maggot Therapy: Designing a Simple, Cost-Effective, Closed-System Habitat to Facilitate Biodébridement of Complex Distal Lower Extremity Wounds. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 136(5):722e-723e. doi: [10.1097/PRS.0000000000001685](https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000001685)
- Ferreira, M. J. M. (1978) Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná I: Calliphoridae. *Revista Brasileira de Biologia*, 38(2): 445-454.
- Fleischmann, W.M.D; Grassberger, M.; Sherman, R. (2004) *Maggot Therapy: A handbook of Maggot- assisted wound healing*. New York: Thieme.
- Greenberg, B. (1971) *Flies and Disease Vol. I, Ecology, Classification, and Biotic Association*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Guimarães, J. H.; Papavero, N.; Prado, A. P. (1983) As Míases na Região Neotropical. *Revista Brasileira de Zoologia*, 1(4): 239-416. doi: [10.1590/S0101-81751982000400001](https://doi.org/10.1590/S0101-81751982000400001)
- Marcondes, C.B. (2006) *Terapia larval de lesões causadas por diabetes e outras doenças*. Santa Catarina: Edufsc.
- Masiero, F. S.; Aguiar, E. S. V.; Pereira, D. I. B.; Thyssen, P. J. (2020) First report on the use of larvae of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) for wound treatment in veterinary practice. *Journal of Medical Entomology*, 53(3): 965-968. doi: [10.1093/jme/tjz238](https://doi.org/10.1093/jme/tjz238)
- Pinheiro, M. A. R. Q.; Ferraz, J. B.; Junior, M. A. A.; Moura, A. D.; Costa, M. E. S. M.; Costa, F. J. M. D.; Neto, V. F. A.; Neto, R. M.; Gama R. A. (2015) Use of maggot therapy for treating a diabetic foot ulcer colonized by multidrug resistant bacteria in Brazil. *Indian Journal of Medical Research*, 141(3): 340-342. doi: [10.4103/0971-5916.156628](https://doi.org/10.4103/0971-5916.156628)
- Sherman, R. A. (2009) Maggot Therapy takes us back to the future of wound care: new and improved Maggot Therapy for the 21st Century. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 3(2): 336-344. doi: [10.1177/193229680900300215](https://doi.org/10.1177/193229680900300215)
- Wang, S.; Wang, J.; Lv D.; Diao Y.; Zhang, Z. (2010) Clinical research on the bio-debridement effect of maggot therapy for treatment of chronically infected lesions. *Orthopaedic Surgery*, 2(3): 201-206. doi: [10.1111/j.1757-7861.2010.00087.x](https://doi.org/10.1111/j.1757-7861.2010.00087.x)
- Whitaker, I. S.; Twine, C.; Whitaker, M. J.; Welck M.; Brown, C. S.;



- Shandall, A. (2007) Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. *Postgrad Medical Journal*, 83(980): 409-413. doi: [10.1136/pgmj.2006.055905](https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.055905)
- Wolff, H.; Hansson, C. (2005) Rearing larvae of *Lucilia sericata* for chronic ulcer treatment – an improved method. *Acta dermatology Venereology*, 85(2): 126-131. doi: [10.1080/00015550510025533](https://doi.org/10.1080/00015550510025533)