

Strokovni prispevek/Professional article

UVEDBA ZDRAVLJENJA KRONIČNIH RAN Z LIČINKAMI MUH *LUCILIA SERICATA* V SLOVENIJO

INTRODUCTION OF CHRONICAL WOUNDS HEALING WITH *LUCILIA SERICATA*
LARVAE IN SLOVENIA

Domen Jaklič,¹ Klemen Zupančič,¹ Aleš Lapanje,¹ Dragica Smrke,² Matej Cimerman,³
Zlatko Parač,² Zoran Arnež,⁴ Nina Gunde-Cimerman¹

¹ Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Klinični oddelek za kirurške infekcije, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7,
1525 Ljubljana

³ Klinični oddelek za travmatologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

⁴ Cattedra di chirurgia plastica e ricostruttiva, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Università degli studi
di Trieste, Ospedale di Cattinara, UCO Chirurgia plastica e ricostruttiva Strada di Fiume 447,
34149 Trieste, Italia

Izvleček

- Izhodišča** *Ker so kronične rane danes pogosto okužene z bakterijskimi sevi, odpornimi na antibiotike, je njihovo zdravljenje težavno. Namen raziskovalnega projekta je bil uvesti v Slovenijo novo metodo zdravljenja kroničnih ran z uporabo ličink muh *Lucilia sericata*.*
- Metode** *Za zdravljenje kroničnih ran smo uporabili sterilne larve *L. sericata*, pridobljene v kontinuirani kulturi na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete UL. Na ta način smo zdravili 32 ran pri 30 bolnikih. Ličinke smo na rani pustili delovati dva do tri dni; nato smo jih odstranili in po potrebi ponovno namestili. Pred namestitvijo in po njej smo jemali mikrobiološke brise tkiva v rani in iz njih osamili ter identificirali bakterijske vrste. Med biokirurškim zdravljenjem smo spremljali potek zdravljenja, bolnikovo počutje, morebitne bolečine, pokretnost, samostojnost in psihološki odziv ob terapiji.*
- Rezultati** *Z biokirurškim zdravljenjem smo uspeli zaceliti in očistiti 24 ran od 32 (75 %). V primeru kombinirane arterijsko-venske razjede smo uspeli popolnoma zaceliti eno rano in očistiti 8 ran, v primeru venske razjede na nogi in šestih diabetičnih razjed so se vse rane očistile. V primerih preležanin in pooperativnih kroničnih ran smo z biokirurgijo vse rane v celoti očistili. 16 bolnikov je med nošenjem ličink občutilo neprijeten občutek, pri dveh so se pojavile bolečine, ki so se po dodatku analgetikov pomirile. Med zdravljenjem si je pri hoji z berglami pomagalo 17 (57 %) bolnikov. Ugotovili smo, da je 17 bolnikov (57 %) čutilo strah in depresijo ter nelagoden občutek.*
- Zaključki** *Metoda zdravljenja z ličinkami muhe *L. sericata* je bila uspešno uvedena v Slovenijo. Zaradi enostavnosti in uspešnosti bi jo bilo potrebno kot način zdravljenja uvesti tudi v vsakdanjo slovensko klinično prakso. Z biokirurgijo se kronične rane hitreje celijo, preprečimo nadaljnja vnetja in propadanje tkiva ter bolniku omogočimo normalno vključevanje v vsakdanje življenje.*
- Ključne besede** *ličinke muh; *Lucilia sericata*; biokirurgija; kronične rane; bionekrektomija; celjenje ran; mrtvina; okužba*

Avtor za dopisovanje / Corresponding author:

Domen Jaklič, univ. dipl. biol., Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

Abstract

- Background** *Due to infection of chronic wounds with antibiotic resistant bacterial strains, their healing can be very difficult. The main purpose of the presented research study was the introduction of a new method for chronic wounds healing, using *Lucilia sericata* fly larvae into Slovenia.*
- Methods** *For chronic wound healing sterile larvae of *L. sericata* fly were prepared from a continuous fly culture, maintained at the Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana. In this way 32 wounds of 30 patients were treated. Larvae were applied on the wounds for two to three days. Than they were washed off and replaced, if necessary. Microbiological smears were collected before and after the application of the larvae on the wounds. Microorganisms were then isolated and identified. During larval therapy healing improvement, patient's general state, potential presence of pain, mobility, patient's independence and psychological reaction to the therapy were monitored.*
- Results** *Using biosurgical therapy 24 (75 %) out of 32 wounds were cleaned and healed. In the case of combined arterio-venous leg ulcers one wound was completely healed and eight of them were cleaned of necrosis and infection. In the case of a venous leg ulcer, six diabetic ulcers, eight cases of chronic postoperative wounds and pressure ulcers, wounds were completely cleaned after the treatment. 16 patients reported unpleasant feeling during larval treatment and two patients felt pain which diminished after the treatment with analgesics. 17 (57 %) patients had to use crutches during biosurgical treatment and the same number of patients felt uncomfortable, frightened and depressed during the application of larvae.*
- Conclusions** *The method of healing chronic wounds with *L. sericata* larvae was successfully introduced into Slovenia. Due to its simplicity and effectiveness biosurgery should be accepted as a standard method in Slovene clinical practice. With the help of biosurgical method chronic wounds heal faster, further inflammation and tissue decomposition are prevented and patients can integrate faster into normal everyday life.*
- Key words** *fly maggots; *Lucilia sericata*; biosurgery; chronic wounds; healing of wounds; bionecrotomy; necrosis; infection*

Uvod

Uporaba mušjih ličink za zdravljenje ran sega daleč v preteklost in so jo poznala različna ljudstva po svetu, od avstralskih Aboriginov do južnoameriških Indijancev.^{1,2} Zapise o tej metodi zdravljenja ran lahko najdemo že v zgodnjih evropskih medicinskih zapisih, kakršen je Hortus sanitatus iz leta 1491.³ Prvi, ki je podrobneje opisal pozitivne učinke ličink muh na ranah vojakov, poškodovanih v bitki za St. Quentin leta 1557, je bil vojaški kirurg Ambroise Paré (1509–1590). Zdravilno delovanje ličink na ranah so opisali tudi Hieronymus Fabricius leta 1634, Zachmann l. 1704⁴ in Napoleonov vojaški kirurg, baron D. J. Larrey.⁵ J. G. Millingen je po bitki za Tallavero (1809) omenil prisotnost ličink pod obvezami na ranah vojakov, kirurg pri ameriški konfederacijski vojski, J. F. Zacharias, pa je prvi namerno vnašal ličinke v strelne rane, da bi pospešil zdravljenje že na bojnem polju.⁵ Znanstveno proučevanje ličink se je začelo, ko je ameriški kirurg W. S. Baer⁶ leta 1917 pri pregledu dveh vojakov, ki sta sedem dni pozabljena ležala v jarku z globokimi vbodnimi ranami, opazil, da sta oba brez znakov okužbe in da so rane, na katerih so bile ličinke muh, prekrite z rožnatim granulacijskim tkivom.⁵ Izkušnje z bojišča je prenesel v zdravniško prakso kot klinični profesor ortopedske kirurgije na John Hopkins Me-

dical School, ZDA. Sprva je uporabljal nesterilne ličinke muhe *Lucilia sericata*, zato je kljub spodbudnim začetnim uspehom prišlo tudi do težav, predvsem do okužb z bacilom tetanusa. Kasneje je zato uporabljal razkužene ličinke. Svoje izkušnje je opisal v znanstveni literaturi in s tem prispeval k širjenju uporabe ličink pri ostalih zdravnikih. Potrebe po ličinkah so se tako povečale, da se je l. 1930 gojenja lotilo ameriško farmacevtsko podjetje Lederle. Do l. 1935 je bil v ZDA ta način zdravljenja uveden v 300 bolnišnic, sodelovalo je 585 zdravnikov, ki so pozdravili 5684 bolnikov. Potrebno je poudariti, da je v tem času, pred odkritjem antibiotikov, zaradi okuženih ran umrlo v povprečju 75 % bolnikov.³

Po odkritju sulfonamidov in kasneje betalaktamskih antibiotikov sredi prejšnjega stoletja je zdravljenje z ličinkami skoraj utonilo v pozabo. Takrat novi antibiotiki so veljali za čudežno zdravilo in najboljši način zdravljenja okužb.³ Izboljšale so se tudi aseptične tehnike in oskrba ran. Pomembno vlogo je odigrala tudi sorazmerno visoka cena zdravljenja, saj so bile ličinke drage.

Zaradi resnih kliničnih problemov, ki so nastopili ob pojavu bakterij, odpornih na antibiotike, npr. na metilicilin odporni sevi bakterije *Staphylococcus aureus* (MRSA)^{7,8} in tudi zaradi vedno večje vpletenosti gliv v patogene procese,⁹ so nekateri zdravniki začeli raz-

mišljati o ponovni uvedbi biokirurškega zdravljenja. V 80. letih prejšnjega stoletja sta Sherman in Pechter v ZDA oživila biokirurško metodo.^{6,10,11} V 90. letih so odprli prvi biokirurški evropski razvojni center v Bridgentu, v angleškem Južnem Walesu (<http://www.zoobiotic.com/>). Leta 1996 so ustanovili Mednarodno bioterapevtsko zvezo (International Biotherapy Society = IBS), ki skrbi za pretok informacij, pomembnih za raziskave in uporabo živih organizmov pri zdravljenju (<http://biotherapy.md.huji.ac.il>). Z biokirurškim zdravljenjem so se začeli ukvarjati tudi v bolnišnicah v Nemčiji, Avstriji,¹² Izraelu,¹³ na Madžarskem, Švedskem, v Belgiji, v Ukrajini,³ na Japonskem, v Avstraliji, Mehiki, na Filipinih, v Izraelu in Egiptu. V Evropi poleg že omenjenega centra v Bridgentu goji in distribuira sterilne ličinke tudi center Biomonde Laboratories (www.biomonde.de) v Nemčiji, medtem ko skrbi za japonski trg Japan Maggot Company (<http://www.icn-jp.com/~maggot/index.html>), za Avstralijo pa Oddelek medicinske entomologije v Bolnišnici Westmead, Westmead (<http://medent.usyd.edu.au/projects/maggott.htm>). Po doslej pridobljenih podatkih zavarovalnica krije stroške zdravljenja z ličinkami v Veliki Britaniji in v Združenih državah Amerike. Zdravljenje z ličinkami muhe smo uvedli v Slovenijo leta 2003 v obliki eksperimentalnega projekta »Biokirurgija kronične rane – zdravljenje z ličinkami muh *Lucilia sericata*«. Nosilec projekta je bil Klinični center Ljubljana. Med projektom je bilo v obdobju od 1. 1. 2003 do 31. 12. 2005 s pomočjo biokirurške obdelave z ličinkami zdravljenih 30 bolnikov, pri katerih smo poleg poteka zdravljenja z mikrobiološkimi metodami ugotavljali tudi spreminjanje različnih mikroorganizmov v rani pred in po uporabi ličink.

Metode

Gojenje muh *Lucilia sericata* in pridobivanje sterilnih ličink

Muhe *L. sericata* se gojijo na Katedri za biologijo mikroorganizmov Oddelka za Biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani v kontinuirni monokulturi, ki smo jo vzdrževali pri sobni temperaturi, stalnem dnevno-nočnem ciklu 12/12 ur in pri nadzorovani zračni vlagi (okoli 60 %). Za pridobivanje larv smo nastavili košček govejih jeter v posodo z muhami. Po dveh urah smo pobrali odlegla mušja jajčeca in jih prenesli v 50-mililitrsko centrifugirke. Jajčeca smo dispergirali s pomočjo 0,5-odstotnega natrijevega sulfita in jih takoj nato sterilizirali s 5-odstotnim formaldehidom po postopku, ki ga je opisal Sherman.¹⁴ Sterilizirane mušje embrije smo sprali s sterilno destilirano vodo in jih 11 ur inkubirali na krvnih ploščah pri 30 °C. Po izleganju smo larve preselili v sterilne posodice za transport.

Izbira bolnika in primernih ran za biokirurgijo

Sprejem, izbira bolnikov in zdravljenje z larvami muh je potekalo na Kliničnem oddelku za kirurške infekcije v Kliničnem centru Ljubljana. Za izvajanje zdravljenja smo pridobili dovoljenje etične komisije. Pred

namestitvijo larv smo vsakega bolnika seznanili z načinom delovanja larv v rani in postopkom namestitve, kar so ti potrdili s podpisom izjave, da se strinjajo s takšnim načinom zdravljenja. S pomočjo izdelanega protokola smo izbrali velikosti in tipe ran, ki so bile najprimernejše za biokirurško zdravljenje. Na ta način smo izbrali 30 bolnikov, od tega 17 žensk in 13 moških. Pri izbiri ran smo se osredili na manjše, kronične rane z vlažno mrtvino ali fibrinskimi oblogami. O izgledu rane smo odločali upoštevaje klasifikacijo po Falangi,¹⁵ po kateri so rane tipa A tiste, pri katerih 100 % rane prekriva granulacijsko tkivo, pri tipu B pa je granulacijskega tkiva od 50 do 100 %. Pri tipu C pa je granulacijskega tkiva manj kot 50 %. Če je bila v rani prisotna mrtvina, smo jo uvrstili v tip D ne glede na količino granulacijskega tkiva. Glede na količino izločkov v rani smo rane uvrstili v skupino 1, če je zadoščala preveza rane enkrat tedensko. Če se je izloček pojavljal v takih količinah, da je bilo rano potrebno prevezovati vsakih 2–3 dni, smo jo uvrstili v skupino 2 in ob dnevnem prevezovanju v skupino 3. Za zdravljenje s pomočjo ličink smo izbrali rane tipov B2 in C3.¹⁵ V enem primeru je imel bolnik vensko razjedo na nogi, v 14 primerih so bile rane kombinirane arterijsko – venske razjede, sedem bolnikov je imelo diabetične razjede, trije preležanine, preostalih 5 bolnikov pa pooperativne kronične rane (Razpr. 1). 13 bolnikov je bilo vzporedno zdravljenih z antibiotiki (prevladovali so bolniki z ranami tipa B2).

Razpr. 1. Vrsta rane (vzrok) glede na spol.

Table 1. Etiology of wounds according to sex.

Vrsta – Etiologija rane Etiology	Moški Men	Ženske Women	Skupaj Sum
Venska razjeda na nogi Venous leg ulcer	0	1	1 (3,3 %)
Kombinirana art.-venska razjeda Combined arterio-venous ulcer	4	10	14 (46,7 %)
Diabetična razjeda Diabetic ulcer	4	3	7 (23,3 %)
Drugo Other	5	3	8 (26,7 %)
Skupaj Sum	13	17	30

$hi^2 = 3,747576, p > 0,01$

Med zdravljenjem z larvami je bilo 10 bolnikov normalno pomičnih, 17 si je moralo pri hoji pomagati z berglami, trije bolniki pa so bili zaradi velikosti in tipa rane nepomični.

Ob zdravljenju z larvami smo spremljali tudi bolnikovo počutje, morebitno depresijo in nelagodne občutke. Bolečino smo določali med prevezovanjem, nošenjem obloge in menjavo larv na rani, upoštevajoč lestvico VAS, pri kateri bolnik na 10-centimetrski črti brez številčnih oznak označi jakost bolečine.

Nameščanje sterilnih larv muh *L. sericata* na rano

Larve smo namestili na primerno očiščeno in pripravljeno rano po postopku, ki ga je opisal Ronald Sherman.¹⁶ Pred namestitvijo smo robove rane očistili in razkužili. Robove rane smo zaščitili s hidrokolooidno

oblogo (Granuflex; ConvaTec, Princeton, NJ). Larve smo nato položili na rano tako, da smo na kvadratni centimeter mrtvine položili 5–8 larv. Vse skupaj smo prekrili s tanko mrežico Tegapore (Tegapore™, 3M Health Care, St. Paul, Mexico), ki je omogočila larvam pritek zraka, obenem pa iztok izločkov iz rane. Tegapore smo ob robovih rane tesno pritrdili, da smo preprečili uhajanje larv iz rane. Na koncu smo Tegapore prekrili z ovlaženimi zloženci, ki smo jih glede na količino izločkov iz rane menjali na vsakih 4–6 ur. Larve smo pustili delovati na rani od 24 do 60 ur. Po končani namestitvi smo jih iz rane sprali s sterilno fiziološko raztopino. Na tak način smo zdravili 32 ran pri 30 bolnikih, saj sta se pri dveh bolnikih pojavili še sekundarni rani na drugem mestu kot pri prvem zdravljenju. Skupno število namestitev larv pri posameznem bolniku je bilo torej odvisno od tipa rane in napredovanja zdravljenja. Pri 21 bolnikih smo izvedli le eno namestitev, pri devetih bolnikih pa je bila opravljena več kot ena namestitev (največ pet).

Identifikacija bakterij

Pred in po vsaki namestitvi larv smo odvzeli brise ran in tudi brise larv, ki so bile na rani. Uporabljali smo komercialna gojišča (Bibby Sterilin, Copan innovation, Stone, Staffs, UK). Identifikacija bakterij je bila opravljena na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Rezultati

Pri projektu zdravljenja kroničnih ran z larvami smo poleg končnega učinka zdravljenja opazovali še druge značilnosti, ki so spremljale zdravljenje, in sicer bolnikovo pomicnost, samostojnost pri negi in zmožnost opravljanja običajnih dejavnosti. Pri hoji si je med zdravljenjem pomagalo 17 (56,7 %) bolnikov. Brez težav se je premikalo 10 bolnikov (33,3 %), medtem ko so bili trije bolniki nepomični zaradi obsega in narave rane na nogi (Razpr. 2).

Razpr. 2. Pomicnost bolnikov ob namestitvi ličink.

Table 2. *Patients' mobility after larvae application.*

Pomicnost Mobility	Moški Men	Ženske Women	Skupaj Sum
Normalno hodi Walks normal	6 (46,2 %)	4 (23,5 %)	10 (33,3 %)
Pri hoji si pomaga Needs help at walking	7 (53,8 %)	10 (58,8 %)	17 (56,7 %)
Ne hodi Immobile	/	3 (17,7 %)	3 (10,0 %)
Skupaj Sum	13	17	30

$hi^2 = 3,457546, p > 0,01$

Pri spremljanju bolnikove samostojnosti in pomoči pri negi smo opazili, da 16 (53,3 %) bolnikov ni potrebovalo pomoči pri negi (Razpr. 3). Pri opravljanju običajnih dnevnih dejavnosti je imelo 16 (53,3 %) bolnikov težave, ostalih 12 (40,0 %) pa je opravljal svoje vsakodnevne dejavnosti normalno. Le 2 bolnika (6,7 %) nista mogla opravljati običajnih opravil (Razpr. 3).

Razpr. 3. Opravljanje običajnih dejavnosti in samostojnost.

Table 3. *Ability performing of common activities and self-independance.*

Običajne dejavnosti Common activity	Moški Men	Ženske Women	Skupaj Sum
Brez težav No problems	7 (53,8 %)	5 (29,4 %)	12 (40,0 %)
Pri opravljanju imajo težave Problems in performing	5 (38,5 %)	11 (64,7 %)	16 (53,3 %)
Običajnih opravil ne zmorejo Unable to perform	1 (7,7 %)	1 (5,9 %)	2 (6,7 %)
Samostojni Self-independent	9 (69,2 %)	7 (41,2 %)	16 (53,3 %)
Potrebujejo pomoč pri negi Needs help	4 (30,7 %)	10 (58,8 %)	14 (46,7 %)

$hi^2 = 2,087104, p > 0,01$

Pozornost smo namenili tudi duševnim dejavnikom, ki kljub privolitvi v izbrani način zdravljenja lahko spremljajo biokirurške postopke. Zanimalo nas je predvsem morebitno pojavljanje strahu ali tesnobe ter občutek bolečine. Ugotovili smo, da je 17 bolnikov (56,67 %) čutilo strah in tesnobo ter nelagodno občutek.

Za opisovanje bolečine smo uporabljali lestvico VAS (vizualno-analogni lestvica, Visual Analogue Scale). Bolečino smo ugotavljali pri prevezovanju, med nošenjem obloge z larvami in pri zamenjavi larv. Največ bolečin so bolniki občutili med nošenjem biokirurške obloge (povprečno 3,1 po VAS), manj bolečin pa pri prevezovanju (povprečno 2,6) in zamenjavi larv (povprečno 2,4). Bolniki hujših bolečin niso navajali, občasne bolečine pa smo blažili s tabletami nesteroidnih antirevmatikov. Manjša težava je bil občutek duševnega nelagodja med nošenjem biokirurške obloge, ki smo ga zaznali pri 16 bolnikih.

Razpr. 4. Strah/tesnoba ob namestitvi larv.

Table 4. *Fear/depression during larvae application.*

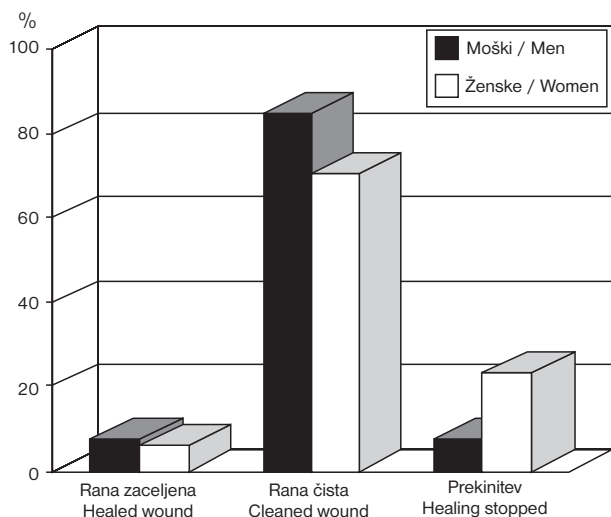
Strah Feeling description	Moški Men	Ženske Women	Skupaj Sum
Me ni strah / nisem depresiven No fear / no depression	6 (46,2 %)	7 (41,2 %)	13 (43,33 %)
Malo me je strah / malo sem tesnoben I am afraid a little / a little depressed	7 (53,8 %)	10 (58,8 %)	17 (56,67 %)

$hi^2 = 0,009827, p > 0,01$

Končna ocena zdravljenja

Uspešnost biokirurškega zdravljenja smo ocenjevali glede na narejeno nekrekotomijo kroničnih ran oz. njihovo očiščenje od mrtvin do čistih granulacij. Očiščena rana pomeni, da je rana brez nekrotičnih mas, fibrinskih oblog, vnetnega detritusa in je pokrita s čistim granulacijskim tkivom. Biokirurško zdravljenje smo ocenili za uspešno, ko v rani ni bilo več mrtvine in rana ni bila okužena z mikroorganizmi. Samo v takih (čistih) ranah lahko pride do razrasta granulacijskega tkiva in epitelizacije, ki se konča z zacelitvijo.

Z biokirurškim zdravljenjem smo uspeli očistiti in zaceliti 24 ran od 32. Pri petih bolnikih s kombinirano arterijsko-vensko razjedo (Razpr. 5) je prišlo do prekinitve zdravljenja (Sl. 1) na željo bolnika.



Sl. 1. Končni rezultati zdravljenja.

Figure 1. Final results of healing.

Pri arterijsko-venskih razjedah smo uspeli popolnoma zaceliti eno in očistiti 8 ran (2 moška in 6 žensk). Pri eni venski razjedi na nogi in šestih 6 diabetičnih razjedah so se rane očistile, sedma diabetična rana pa se je zacelila. Pri ostalih osmih ranah, kot so razjede zaradi pritiskanja in pooperativne kronične rane, smo z biokirurgijo vse rane v celoti očistili.

Med zdravljenjem z ličinkami smo ugotovili, da je pri vseh ranah nastalo obilo izločka. Pri vseh bolnikih je zdravljenje ran, pokritih z mrtvinami, uspešno potekalo. V vseh dvaintridesetih primerih se je rana popolnoma izčistila že v treh dneh, robovi niso kazali znakov vnetja, dno rane pa je bilo pokrito s čvrstimi granulacijami. Rane so bile po zdravljenju z ličinkami pripravljene za nadaljne postopke, bodisi za zdravljenje z oblogami ali kožnimi presadki delne debeline kože.

Mikrobiološka slika ran med zdravljenjem z larvami

Na osnovi mikrobiološke analize brisov kroničnih ran pred zdravljenjem z ličinkami smo identificirali naslednje patogene bakterije: *Staphylococcus koagulans* (-), *Streptococcus* skupina C, *Streptococcus* skupina G, *Bacteroides fragilis*, *Citrobacter freundii*, *C. koserii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella* spp., *Peptococcus* sp., *Prevotella bivia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*. V večini primerov (63,6 %) se je število bakterijskih vrst v rani po zdravljenju z larvami zmanjšalo, pri osmih ranah (33,3 %) pa ni bilo opazne razlike. Mikrobioloških analiz ran pred in po zdravljenju z larvami nismo opravili pri 10 ranah (30,3 %). Porast števila bakterijskih vrst smo zaznali le v enem primeru, ko se je na novo pojavila po Gramu negativna oportuna vrsta *Morganella morganii*.

Ugotovili smo, da je zdravljenje z larvami iz ran popolnoma odstranilo naslednje bakterije: *Streptococcus* skupina G, *Streptococcus* skupina C, *Bacteroides fragilis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella* spp., *Peptococcus* sp., *Prevotella bivia*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus agalactiae*, prisotnost nekaterih bakterijskih vrst pa se je močno zmanjšala (*Staphylococcus koagulans* (-), *Citrobacter koserii*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*). Zanimivo pa je, da se je nekaj bakterijskih vrst po zdravljenju pojavilo na novo (Difteroidi, *Enterococcus faecalis*, *Morganella* sp., *Peptostreptococcus asacharolyticus*, *Porphyromonas* sp. in *Providencia rettgerii*).

Poleg osamitve bakterij iz ran smo bakterijske vrste osamili tudi iz ličink, ki so delovale na rani. V 70 % primerov (14 od 20) smo opazili razliko med bakterijskimi vrstami, prisotnimi na/v larvah, in bakterijskimi vrstami v ranah po zdravljenju z ličinkami. Poleg tega smo v 20 % primerih (4 od 14) opazili tudi razliko v razmerju sevov za posamezno vrsto, čeprav se vrstna sestava ni spreminjala. V dveh primerih (10 %) pa nismo opazili nobene spremembe v bakterijski sestavi.

Razpr. 5. Končna ocena zdravljenja glede na vrsto rane/po spolu.

Table 5. Final healing results according to etiology and gender.

Vrsta rane Wound type	Moški / Men			Ženske / Women			Skupaj Sum
	Rana zaceljena Healed wound	Prekinitev Healing stopped	Čista Wound cleaned	Rana zaceljena Healed wound	Prekinitev Healing stopped	Čista Wound cleaned	
Venska razjeda na nogi Venous leg ulcer						1	1
Kombinirana art-venska razjeda Arterio-venous ulcer	1	1	2		4	6	14
Diabetična razjeda Diabetic ulcer			4	1		2	7
Drugo Other			5			3	8
Skupaj Sum	1	1	11	1	4	12	30

$hi^2 = 1,33385$ $p > 0,01$

Razpravljanje

Zdravljenje z larvami lahko izvajamo na »klasičen način«, ki smo ga uporabili v naši raziskavi tako, da v rane polagamo ličinke, ki v rani gomazijo, jo mehansko »čistijo« in vanjo izločajo svoj ekskret. Ponemokod pa zdravljenje izvajajo v obliki polaganja t. i. »biovrečk«. V tem primeru ličinke niso v neposrednem stiku z rano in aktivne komponente izločkov prehajajo v rano skozi stene biovrečke.¹² Glavna pomanjkljivost tovrstnega zdravljenja je, da ne prihaja do mehanskega draženja rane, in se po vsej verjetnosti zmanjša zračenje rane in razbitje morebiti prisotnih bakterijskih biofilmov. Med prednosti pa lahko vsekako prištejemo enostavnost namestitve in odstranjenja ter ugoden duševni odziv bolnikov.

V obeh primerih lahko ugodne učinke delovanja ličink na zdravljenje ran razdelimo v naslednje sklope:

1. Mehansko delovanje

Z lazenjem, s pomočjo ustnih kavljcev in površinskih struktur ličinke mehansko stimulirajo živo tkivo rane. Poveča se količina eksudata in izdreniranje rane, kar prispeva k odstranjevanju mrtvega tkiva in izpiranju bakterij.^{1,17}

2. Encimsko delovanje

Ličinke encimsko razgrajujejo in utekočinjajo mrtvino v rani s svojimi izločki,^{18–21} da jo lahko porabijo kot hrano. V izločkih ličink *L. sericata* so našli kolagenazo, triptazo, peptidaze (karbopeptidazo A in B, levcin aminopeptidazo, tripsin aminopeptidazo) in lipaze,^{19, 21, 22} niso pa ugotovili aktivnosti kimotripsina in elastaze.

3. Proliferativno delovanje

Na ranah, zdravljenih z ličinkami, se pojavi zdravo granulacijsko tkivo, verjetno na račun proliferativnega faktorja, alantoina,²³ ki tudi pospešuje vaskularizacijo. Ko so preizkušali proliferativni učinek izločkov mušjih ličink na celični tkivni kulturi fibroblastov, so ugotovili pozitivno sinergistično delovanje ekskreta ličink in človeških citokinov.²⁴

4. Antibakterijsko delovanje

Ličinke v ranah pa tudi sam izloček *in vitro* delujejo zaviralno na rast bakterij vrst *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus hemolyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium welchii*, *Proteus vulgaris* in MRSA.^{18, 25, 26} Antibakterijsko delovanje je najverjetneje rezultat več različnih, a sinergistično delujočih snovi. Izločki namreč vsebujejo fenilacetno kislino in fenilacetaldehid,²⁷ ki delujeta v kislem okolju močno baktericidno na po Gramu pozitivne in na po Gramu negativne bakterije. Poleg tega vsebujejo še temperaturno in proteolitično odporne antibakterijske oligopeptide,²⁸ ki so drugače znani kot del prirojene imunosti insektov²⁹ za obrambo proti bakterijam, glivam in protozomem. Tarče delovanja antibakterijskih peptidov so celična membrana, notranjost celice in biološke makromolekule.³⁰ Pri *L. sericata* so leta 2004 Bexfield in sod.²⁶ izolirali kratek < 500 Da velik faktor.

5. Protivnetno delovanje

Izločki zavirajo stimuliranje nevtrofilnih levkocitov, ki pospešujejo vzdrževanje vnetja v kroničnih ranah.³¹ Ličinke muh *Lucilia sericata* ne napadajo

zdravega tkiva, saj se hranijo izključno z nekrotičnim tkivom in bakterijami v rani.³ Ob pravilni namestitvi ličink ni mogoče, da bi ličinke ostale v rani in se po zabubljenju razvile po normalni razvojni poti do odrasle muhe. Ličinke pustimo delovati v ranah le do tri dni, ob enakih pogojih pa potrebujejo vsaj 5–7 dni, da se zabubijo. Ličinke, ki so v času rane zrasle do velikosti 7–9 mm, iz ran odstranimo bodisi s spiranjem s fiziološko raztopino ali pa z odstranjevanjem biovrečk.

Pri »klasični« namestitvi ličinke z vsrkavanjem encimsko raztopljenе mrtvine odstranijo mrtvino iz ran, poleg tega pa še mehansko odplavljajo tam prisotne bakterije ter trdovratne biofilme, ki jih nekatere bakterije (npr. *P. aeruginosa* in *S. aureus*)^{32, 33} tvorijo v ranah. Naše izkušnje, pridobljene *in vivo*, ter izkušnje drugih avtorjev, ki so se omejili na *in vitro* testiranja, kažejo, da ličinke hitreje odstranijo bakterijsko okužbo, če so v rani prisotne bakterijske vrste, kot so *Peptococcus* sp. in *Prevotella bivia*, določene po Gramu pozitivne bakterije, posebno *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* in sorodne bakterije iz *Streptococcus* skupin C in G. Manj pa je zdravljenje uspešno, če se v ranah nahajajo po Gramu negativne bakterije, kot na primer *Klebsiella pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Morganella* sp. in *Stenotrophomonas maltophilia*, ali če so prisotne določene po Gramu pozitivne bakterije, kot so difteroidi, alfa-haemolitični streptokoki, *Enterococcus faecalis* in *Streptococcus pyogenes*.

Zdravljenje z larvami se v sedanji praksi uporablja predvsem za kronične in okužene rane, razjede na nogi, razjede zaradi pritiska, statične venske razjede, nevrovaskularne razjede, rane na diabetičnem stopalu, travmatske in pooperacijske rane, abscese, opekline, rane z gangreno,³ temporalne mastoiditise,¹⁴ nekrotizantne fascitise.³⁴ Na ta način so zdravili tudi piogeni in tuberkulozni osteomielitis,^{4, 5, 10, 17} mastoiditis,¹⁴ pyoderma gangrenosum³⁵ in celo maligne rane ter kožnega raka.^{1, 36, 37}

Dodatno antibiotično zdravljenje, spol, starost, nosečnost, nepomičnost, duševno stanje niso bili kontraindicirani pri zdravljenju kroničnih ran z ličinkami. Najpogostejši problem pri zdravljenju kroničnih ran z ličinkami je bila bolečina, ki se blaži z analgetičnimi sredstvi. V literaturi je le malo poročil o duševnih obremenitvah ljudi med zdravljenjem z ličinkami. Rezultati, pridobljeni med našo raziskavo, so primerljivi z rezultati v strokovni literaturi.^{10, 13, 38–40} Zdravljenje je v večini primerov uspešno že po 8 dneh delovanja ličink na ranah. Rane se v tem obdobju, ki obsega 1–2 namestitvi ličink, po naših in tujih izkušnjah povsem ali delno zacelijo. Površina rane se zmanjša, neprijeten vonj izgine, dno rane se prekrije z granulacijskim tkivom, rob rane postane rožnat in rana se začne zapirati.

Poudariti velja, da smo v naši raziskavi podobno kot v literaturi ugotovili največjo uspešnost (več kot 80 %) zdravljenja z ličinkami pri zdravljenju diabetičnih ran,^{13, 38} zato jo zdravniki najbolj priporočajo prav za zdravljenje diabetičnih ran.^{38, 39, 41} Zanimiva in pomembna je tudi velika uspešnost pri zdravljenju ran, okuženih z MRSA.⁴²

Kontraindikacije in stranski učinki, ki se pri uporabi zdravljenja z ličinkami lahko pojavijo, so bolečine in vročina, za katero so najverjetneje odgovorne pirogene snovi, ki nastajajo ob razgradnji sten po Gramu negativnih bakterij. Za zdravljenje z ličinkami so manj primerne rane, ki so blizu večjih žil, centralnemu živčnemu sistemu in vitalnim organom zaradi večje možnosti krvavitve. To smo ugotovili tudi med našo raziskavo, saj smo zdravljenje morali prekiniti pri petih bolnikih s kombinirano arterio-vensko razjedo. V tuji literaturi nismo zasledili opisa negativnih izkušenj pri zdravljenju mešanih arterijsko-venskih razjed z ličinkami.

Zaradi uspešnosti uvedbe zdravljenja z ličinkami v Sloveniji, predvsem pa dobre sprejetosti s strani bolnikov in zdravstvenega osebja, mislimo, da bi se ta oblika zdravljenja kroničnih ran morala uvesti v vsakdanjo slovensko klinično prakso. Do sedaj je veliko oviro uvedbi zdravljenja predstavljala dobava sterilnih ličink iz tujine, ki mora biti hitra, ker ličinke ob namestitvi ne smejo biti starejše od dveh dni. Hitrost prevoza je seveda povezana s ceno, saj so najbližji centri v Nemčiji.

Dodatna težava je bila nepoznavanje metode v Sloveniji, tako pri bolnikih, do neke mere pa tudi pri zdravnikih, kar pa se je v zadnjem času spremenilo zaradi popularizacije te metode v javnih medijih.⁴³⁻⁴⁵ Tako kot v Evropi se je tudi v Sloveniji izboljšal odnos ljudi do novih, bioloških metod, ki so dodatna možnost zdravljenja primerov, ki jih ni bilo mogoče povsem uspešno pozdraviti z običajnimi kirurškimi metodami in zdravili v obliki posameznih, čistih farmacevtskih učinkovin.

Način delovanja izločkov je sinergističen in vključuje tudi aktivacijo lastnega imunskega sistema bolnika.³¹ V izločkih prisotne snovi so že dobro proučene,²⁶ nova znanstvena odkritja pa razkrivajo kompleksnost delovanja. Poleg tega je biokirurško zdravljenje ob pravočasni dobavi primernih, sterilnih ličink za izvajanje enostavno, hitro in v veliki večini primerov uspešno. Trenutno je v Združenih državah Amerike 500 centrov, kjer zdravijo z larvami, potrjenih s strani FDA leta 2004 kot uraden način zdravljenja. Za ilustracijo dogajanja v Evropi lahko navedemo, da jo v Veliki Britaniji lahko zdravniki predpišejo na recept, ki ga krije zavarovalnica, izvajajo jo pa predvsem ambulantno. Smiselno bi bilo, da bi biokirurgijo kot uradno metodo zdravljenja, ki bi jo priznal strokovni svet pri Ministrstvu za zdravje ter plačal ZZSZ, uvedli tudi v Slovenijo. Tako bi se pridružili državam, ki omogočajo bolnikom bolj uspešno zdravljenje kroničnih ran, ker te zlasti pestijo bolnike s sladkorno boleznijo. Le-ti bi se v mnogih primerih lahko izognili neželenim amputacijam in dolgotrajnemu zdravljenju in bi se lahko hitreje vključevali v vsakdanje življenje.

Literatura

- Weil GC, Simon RJ, Sweadner WR. 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: 36-48.
- Lee DJ. Human myiasis in Australia. *Med J Aust* 1968; 1: 170-3.
- Sherman RA, Hall MJR, Thomas S. Medicinal maggots: An ancient remedy for some contemporary afflictions. *Ann Rev Entomol* 2000; 45: 55-81.
- Goldstein HI. Maggots in the treatment of wound and bone infections. *J Bone Joint Surg Am* 1931; 13: 476-8.
- Baer WS. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). *Journal of Bone and Joint Surgery* 1931; 13: 438-75.
- Pechter EA, Sherman RA. Maggot therapy: The surgical metamorphosis. *Plast Reconstr Surg* 1983; 72: 567-70.
- Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991; 91: 72S-75S.
- Jevons MP, Coe AW, Parker MT. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet* 1963; 1: 904-7.
- De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2000.
- Sherman RA, Pechter EA. Maggot therapy: A review of the therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. *Med Vet Entomol* 1988; 2: 225-30.
- Chernin E. Surgical maggots. *South Med J* 1986; 79: 1143-5.
- Grassberger M, Fleischmann W. The biobag - a new device for the application of medicinal maggots. *Dermatology* 2002; 204: 306.
- Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L, Stessman J, Friedmann R, Schulman H, et al. Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. *Int J Dermatol* 1999; 38: 623-7.
- Horn KL, Cobb AH Jr., Gates GA. Maggot therapy for subacute mastoiditis. *Arch Otolaryngol* 1976; 102: 377-9.
- Falanga V. Classifications for wound bed preparation and stimulation of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration* 2000; 8: 347-52.
- Sherman RA. A new dressing design for use with maggot therapy. *Plastic & Reconstructive Surgery* 1997; 100: 451-6.
- Livingston SK, Price LH. The treatment of chronic osteomyelitis with special reference to the use of the maggot active principle. *JAMA* 1932; 98: 1143-241.
- Simmons SW. A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which destroys important etiological agents of pyogenic infections. *J Bacteriol* 1935; 30: 253-67.
- Ziffren SE, Heist HE, May SC, Womack NA. The secretion of collagenase by maggots and its implication. *Ann Surg* 1953; 138: 932-4.
- Pavillard ER, Wright EA. An antibiotic from maggots. *Nature* 1957; 180: 916-7.
- Vistnes LM, Lee R, Ksander GA. Proteolytic activity of blowfly larvae secretions in experimental burns. *Surgery* 1981; 90: 835-41.
- Hobson RP. On an enzyme from blow-fly larvae [*Lucilia sericata*] which digests collagen in alkaline solution. *Biochem J* 1931; 25: 1458-63.
- Robinson W. Stimulation of healing in non-healing wounds: By allantoin occurring in maggot secretions and of wide biological distribution. *Journal of Bone and Joint Surgery*; 1935: 267-71.
- Prete PE. Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: Mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sci* 1997; 60: 505-10.
- Robinson W, Norwood VH. The role of surgical maggots in the disinfection of osteomyelitis and other infected wounds. *Journal of Bone and Joint Surgery*; 1933: 409-12.
- Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA. Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (mrsa). *Microbes Infect* 2004; 6: 1297-304.
- Erdmann GR, Khalil SK. Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 1986; 23: 208-11.
- Otvos L Jr. Antibacterial peptides isolated from insects. *J Pept Sci* 2000; 6: 497-511.
- Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev Comp Immunol* 1999; 23: 329-44.
- Cudic M, Otvos L Jr. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr Drug Targets* 2002; 3: 101-6.

31. Van der Plas MJA, van der Does AM, Baldry M, Dogterom-Ballering HCM, van Gulpen C, van Dissel JT, et al. Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. *Microbes Infect* 2007; 9: 507-14.
32. Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Chen YC, Ho SW, Luh KT. Persistence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1347-51.
33. Sekiguchi J-i, Asagi T, Miyoshi-Akiyama T, Fujino T, Kobayashi I, Morita K, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain that caused an outbreak in a neurosurgery ward and its *aac(6)-Ia* gene cassette encoding a novel aminoglycoside acetyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3734-42.
34. Teich S, Myers RA. Maggot therapy for severe skin infections. *South Med J* 1986; 79: 1153-5.
35. Boon H, Freeman L, Unsworth J. Wound care. Larvae help debride. *Nurs Times* 1996; 92: 76-80.
36. Reames MK, Christensen C, Luce EA. The use of maggots in wound debridement. *Ann Plast Surg* 1988; 21: 388-91.
37. Bunkis J, Gherini S, Walton RL. Maggot therapy revisited. *West J Med* 1985; 142: 554-6.
38. Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L, Stessman J, Friedmann R, Schulman H, et al. Maggot therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Journal of Bone and Joint Surgery*; 1998; 21: 2030-1.
39. Sherman RA. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care* 2003; 26: 446-51.
40. Courtenay M, Church JC, Ryan TJ. Larva therapy in wound management. *JR Soc Med* 2000; 93: 72-4.
41. Fleischmann W, Russ M, Moch D, Marquardt C. [Biosurgery – maggots, are they really the better surgeons?] *Chirurg* 1999; 70: 1340-6.
42. Thomas S, Andrews A, Jones M. The use of larval therapy in wound management. *J Wound Care* 1998; 7: 521-4.
43. Gunde-Cimerman N. Muha blestivka v medicini. Ljubljana: Televizija Slovenija, 2005.
44. Gunde-Cimerman N. Drobni biokirurgi rešujejo življenja. *Astro novice, priloga Slovenskih novic* 2005; 9.
45. Zupančič K, Jaklič D, Lapanje A. Zdravljenje ran z ličinkami muh. *Proteus* 2005; 67: 299-306.

Prispelo 2007-10-16, sprejeto 2008-01-08