

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

Citación provisional:

Novoa-Palomares F, Salas-Díaz L, Pérez -Téllez C, Pinillos-Medina I, Torres-García O, Bello FJ. Análisis comparativo de la actividad antimicrobiana de secreciones y excreciones larvales de *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae). *Biomédica*. 2022;42 (1).

Recibido: 23-03-21

Aceptado: 01-10-21

Publicación en línea: 05-10-21

Análisis comparativo de la actividad antimicrobiana de secreciones y excreciones larvales de *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae)

Comparative analysis of the antimicrobial activity of larval secretions and excretions from *Calliphora vicina* and *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae)

Actividad antimicrobiana de secreciones y excreciones de *C. vicina* y *S. magellanica*

Francy Novoa-Palomares ¹, Laura Salas-Díaz ¹, Cindy Pérez -Tellez ², Ingrid Pinillos-Medina ¹, Orlando Torres-García ², Felio J. Bello ³

¹ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá D.C, Colombia

² Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Antonio Nariño, Bogotá D.C, Colombia

³ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de la Salle, Bogotá D.C, Colombia.

Correspondencia

Felio J. Bello, Programa de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, AV. Carrera 7 No. 179-03, Bogotá, D. C., Colombia

Teléfono: (601) 6772699

felbello@unisalle.edu.co

Contribución de los autores:

Francy Novoa y Laura Salas: procedimientos descritos en el manuscrito y revisión sistemática de la bibliografía.

Cindy Pérez: procedimientos descritos en el manuscrito y análisis estadístico para la interpretación de resultados.

Ingred Pinillos y Orlando Torres: asesoría en los procedimientos descritos en el manuscrito y en el desarrollo del proyecto.

Felio J. Bello: idea de investigación y asesoría para el desarrollo del proyecto.

Todos los autores participaron en la revisión y escritura del manuscrito.

Introducción. La creciente resistencia bacteriana a los antibióticos representa una amenaza mundial en salud pública. Las excreciones y secreciones (ES) larvales derivadas de moscas necrófagas de la familia Calliphoridae podrían configurar una fuente promisoría para contrarrestar sus efectos.

Objetivo. Comparar la actividad antimicrobiana de las ES nativas (ESn) y las ES mayores y menores de 10 kDa de *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae).

Materiales y métodos. El bioensayo se hizo a partir de la técnica de turbidimetría y en el caso de las ES menores a 10 kDa se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Resultados. Las ESn y las ES menores de 10 kDa, tanto de *C. vicina* como de *S. magellanica*, evidenciaron potente actividad antibacteriana contra tres cepas de *Staphylococcus aureus* y cuatro bacterias Gram negativas, siendo las ES menores de 10 kDa más efectivas que las ESn en las dos especies de moscas evaluadas. Además, las ES menores de 10 kDa presentaron la misma efectividad, excepto cuando se evaluaron en los ensayos de CMI, en donde se observó que las ES menores de 10 kDa de *S. magellanica* fueron más potentes en todas las bacterias evaluadas excepto contra cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Las ES mayores de 10 kDa no inhibieron el crecimiento bacteriano.

Conclusión. En conjunto, los resultados validan potencialmente a estas sustancias como fuente importante para el aislamiento y caracterización de agentes antimicrobianos.

Palabras clave: dípteros; bacterias Grampositivas; bacterias Gramnegativas; modalidades de secreciones y excreciones; antibacterianos; larva.

Introduction: The growing resistance to antibiotics represents a global threat to public health. The larval excretions and secretions (ES) derived from necrophagous flies of the Calliphoridae family could configure a promising source to counteract their effects.

Objective: To compare the antimicrobial activity of native ES, ES greater and less than 10 kDa from *Calliphora vicina* and *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae)

Materials and methods: The bioassay was carried out using the turbidimetry technique and in the case of ES less than 10 kDa, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined.

Results: The ES_n and ES less than 10 kDa of both *C. vicina* and *S. magellanica* showed potent antibacterial activity against three *Staphylococcus aureus* strains and four Gram negative bacteria, the ES less than 10 kDa being more effective than the ES_n in the two species of flies evaluated. Furthermore, ES less than 10 kDa had the same effectiveness, except in the MIC trials when were evaluated, where it was observed that ES less than 10 kDa from *S. magellanica* were more potent in all bacteria evaluated except for *S. aureus* ATCC 25923. ES greater than 10 kDa did not inhibit the bacterial growth.

Conclusions: These results validate, potentially, to these substances as an important source for the isolation and characterization of antimicrobial.

Keywords: Diptera; Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria; modalities, secretion and excretion; anti-bacterial agents; larva.

La familia Calliphoridae está constituida por moscas caliptradas, distribuidas en todo el mundo con alrededor de 1.000 especies, de las cuales 126 se encuentran en el Neotrópico (1). *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae) es una mosca sinantrópica, la cual se ha registrado en Colombia en los departamentos de Casanare, Tolima, Santander, Caldas, Valle del Cauca, Meta y Cundinamarca, específicamente en la Sabana de Bogotá, en zonas ubicadas a 2500 metros sobre el nivel del mar (m. s. n. m)(2). *Sarconesiopsis magellanica* (Le Guillou) (Diptera: Calliphoridae) es una especie, hemisinantrópica, distribuida en Colombia en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Norte de Santander a una altura entre 1200 a 3100 m. s. n. m (1).

Las moscas *C. vicina* y *S. magellanica*, así como otras especies de esta familia son de gran importancia en medicina humana y veterinaria debido a que sus larvas causan miasis en humanos y animales (3); además, los adultos actúan como vectores mecánicos de algunas especies de bacterias, protozoos y helmintos (4). Por sus hábitos necrófagos, estas moscas han sido utilizadas en el área forense para determinar el Intervalo Post- Mortem (5). Así mismo, las especies de la familia Calliphoridae han sido ampliamente estudiadas debido a los efectos benéficos de las larvas sobre las heridas de difícil cicatrización, como las úlceras diabéticas crónicas (6). Las larvas limpian las heridas infectadas y necróticas, facilitando la cicatrización de las mismas, metodología que es conocida como terapia larval o biocirugía (6). El proceso

de curación de heridas se genera a partir de tres acciones sinérgicas; desbridamiento (7), desinfección (8) y erradicación de biopelículas (9) y estimulación del tejido de granulación para generar la cicatrización de las heridas (9).

En relación con el efecto antimicrobiano, las larvas ingieren bacterias dentro del tejido necrótico eliminando de forma física los microorganismos presentes (10) y, también, liberando un amplio espectro de sustancias en sus ES, las cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas (11). Estos hallazgos son potencialmente útiles en el campo médico, en razón a que las propiedades antibacterianas que tienen las ES larvales pueden ser una alternativa para el tratamiento y control de enfermedades infecciosas, en las que los antibióticos convencionales han fallado debido al uso masivo y desregulado de éstos, contribuyendo al desarrollo de resistencia bacteriana, la cual ha sido asociada con una alta morbilidad y mortalidad en todo el mundo (12).

Algunos estudios han demostrado la efectividad antibacterial de las ES larvales de diferentes especies de moscas de la familia Calliphoridae, tales como *Lucilia sericata* (13,14), *S. magellanica* (15), *C. vicina*(16), *Chrysomya putoria* (17), *C. megacephala* (17), *C. rufifacies* (18) y *Cochliomya macellaria* (18), principalmente contra las bacterias *Staphylococcus aureus* (Bacillales: Staphylococcaceae) *Pseudomonas aeruginosa* (Pseudomonadales: pseudomonadaceae) y *Escherichia coli*, (Enterobacterales: enterobacteriaceae) las cuales representan un serio problema debido a que

son patógenos asociados frecuentemente a infecciones intrahospitalarias e infecciones asociadas con heridas de difícil cicatrización.

El objetivo principal de este trabajo fue comparar la actividad antimicrobiana de las ES_n, de las ES mayores y menores de 10 kDa derivadas de larvas de *C. vicina* y *S. magellanica* contra cuatro bacterias Gram negativas y cuatro bacterias Gram positivas.

Materiales y métodos

Colonización y mantenimiento de las colonias de las moscas C. vicina y S. magellanica

La colecta de especímenes adultos de ambas especies se realizó con una jama entomológica en la ciudad de Bogotá D.C, Colombia, en el Parque Nacional Enrique Olaya Herrera, localizado en las coordenadas 4°37'28.2"N 74°03'56.3"W. La identificación morfológica se realizó bajo un estereoscopio teniendo en cuenta la clave ilustrada para la identificación de los géneros y las especies de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de Colombia (19).

Para el desarrollo del presente trabajo se contó con los permisos de colecta mediante la resolución 0922 del 15 de mayo de 2017, expedida por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

En la iniciación de la colonia, los adultos de *C. vicina* y *S. magellanica* se introdujeron en jaulas entomológicas Gerber, bajo condiciones controladas de laboratorio, a una temperatura de 25°C ± 1°C, humedad relativa de 60% ± 5% y fotoperiodo de 12:12, su alimentación consistió en hígado como fuente proteica y agua azucarada como fuente de carbohidratos.

Los huevos ovipositados se transfirieron a frascos de vidrio que contenían 10 g de hígado de cerdo y estaban identificados con el nombre de cada especie. Después de la eclosión se agregó más hígado para permitir el desarrollo larvario y en un tiempo aproximado de 5 días se tomaron las larvas de tercer estadio.

Obtención de excreciones y secreciones larvales

Se utilizaron en los ensayos un total de 3000 larvas de tercer estadio de *C. vicina* y *S. magellanica*, las cuales fueron preinmunizadas con el fin de activar el sistema inmunológico y aumentar la expresión de los componentes con actividad antibacteriana. Para este proceso se requirió de una mezcla en suspensión de bacterias cuatro especies de bacterias Gram positiva (tres cepas de *S. aureus* y *S. pneumoniae*) y cuatro Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* y *K. pneumoniae*), a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland, durante 1 hora a 37 °C (15).

A continuación, se procedió a la desinfección de las larvas con 0,5% de hipoclorito durante 5 min, seguido de un lavado con 5% de formaldehído por 5 min y finalmente 3 inmersiones durante 3 min con solución salina estéril (15). Posteriormente, se adicionaron 100 µL de solución salina estéril a las larvas y se incubaron a 25 °C durante 1 hora, para inducir las ES; después se extrajeron éstas y se llevaron a tubos eppendorf de 2 mL, las cuales se centrifugaron a 13.000 g, a temperatura de 4 °C, durante 10 min. Lo anterior, con el fin de eliminar posibles contaminantes, el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0,22 µm (Ultra Cruz™) (15).

Filtración

Del proceso anterior, se tomaron 10 mL de ESn de *C. vicina* y *S. magellanica* respectivamente, las cuales fueron filtradas usando una membrana Amicon® Ultra 15, de peso molecular de 10 kDa. Las ES se centrifugaron a 4200 g, a 4°C, durante 10 min, obteniendo fracciones mayores y menores de 10 kDa.

Cuantificación de proteínas

Se realizó espectrofotometría Ultravioleta – visible (UV/VIS) a 280nm, en NanoDrop 2000c Thermo Scientific™ usando 2 µL de ESn y 2µL de las ES menores de 10kDa, volúmenes que fueron previamente obtenidos en el proceso de filtración.

Actividad antimicrobiana

Bacterias

Las cepas seleccionadas para evaluar la actividad antimicrobiana fueron: *S. aureus* ATCC 25923 (Bacillales: Staphylococaceae), *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 43300 (cepa resistente a la meticilina o MRSA), *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303 (Lactobacillales: Streptococaceae), *E. coli* ATCC 26922 (Enterobacterales: enterobacteriaceae), *P. aeruginosa* ATCC 1744 BAA (Pseudomonadales: Pseudomonadaceae), *Serratia marcescens* ATCC 13880 (Enterobacterales: Yersiniaceae) y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Enterobacterales: Enterobacteriaceae). Estas cepas fueron seleccionadas puesto que no se ha estudiado ampliamente el potencial antimicrobiano de las ES sobre las mismas.

Ensayos de inhibición de crecimiento en medio líquido por turbidimetría

Se evaluó el potencial antimicrobiano de las ES_n y de las ES mayores y menores de 10 kDa tanto de *C. vicina*, como de *S. magellanica*. Para el montaje de la microplaca, se agregó 100 µl de medio LB como control de la placa; 100 µl de medio con bacteria como control negativo; para el control positivo se utilizaron dos antibióticos, Gentamicina (10 µg/mL) para bacterias Gram negativas y Estreptomicina/penicilina (10 µg – 10UI) para bacterias Gram positivas, se adicionaron 50 µL de cada antibiótico en 50 µL de medio con la bacteria seleccionada; para las ES_n, las ES mayores y menores de 10 kDa, se agregaron 50 µL de cada una a 50 µL de medio con bacteria. Los ensayos se realizaron por triplicado, el tiempo de incubación fue de 18 h a 37 °C y la lectura de la absorbancia fue a una longitud de onda de 620nm. El porcentaje de crecimiento se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs blanco} - \text{Absorbancia del medio con bacteria}} \times 100$$

Ensayo de concentración mínima inhibitoria en medio líquido por turbidimetría

Para el ensayo de CMI, se realizaron diluciones seriadas 1:2 a partir de la concentración de proteína obtenida de las ES mayores de 10kDa provenientes de larvas de tercer estadio. Para *S. magellanica* las concentraciones utilizadas en las diluciones respectivas fueron: 1,525, 762,5, 381,25, 190,6, 95,3, 47,6 y 23,8µg/mL, en tanto que para la mosca *C. vicina* estas concentraciones, en el orden correspondiente, estuvieron en los valores de 2,280, 1,140, 570, 285, 142, 71, y 35,5 µg/mL. Los antibióticos

seleccionados contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas también se diluyeron en las proporciones seriadas de 1:2. Finalmente, se adicionaron 50 μ L de cada dilución a 50 μ L de medio con la bacteria seleccionada, para un total de 100 μ L en cada pozo. Los controles positivo y negativo, el tiempo y la temperatura de incubación, correspondieron a los descritos en el proceso anterior. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Concentración efectiva 50 (IC 50)

Para obtener el valor de la IC 50, se realizó un logaritmo de las concentraciones de las ES menores a 10 kDa de las dos especies de moscas frente al porcentaje de inhibición obtenido, dando lugar a una gráfica (denominada curva dosis-respuesta) cuyos puntos se ajustan mediante regresión no lineal a una ecuación sigmoideal de cuatro parámetros. A partir de esta ecuación se calcula la concentración de las ES tanto de *C. vicina*, como de *S. magellanica* que permite obtener una inhibición del 50% de las bacterias evaluadas.

Análisis estadísticos

A partir de los resultados obtenidos, se construyó una base de datos sobre la cual se hizo el análisis estadístico descriptivo correspondiente y con el software STATA 12 se realizó una prueba ANOVA de una vía para determinar diferencias entre las ES_n y las ES mayores y menores de 10kDa tanto de *C. vicina* como de *S. magellanica*, seguido de la prueba post hoc de Bonferroni para establecer cuál de las variables estudiadas aportaba dicha diferencia; así mismo, con la prueba T-Student se evaluó si se presentaban o

no diferencias significativas entre la actividad antimicrobiana de las ES_n y las ES menores de 10 kDa de cada una de las especies de moscas estudiadas. Los datos fueron analizados con un índice de confianza del 95%, donde el valor de $p < 0.05$ indicó diferencias significativas.

Para determinar si existían diferencias significativas entre el grado de sensibilidad de las bacterias frente a las ES menores de 10kDa de *C. vicina* y *S. magellanica* se realizó un ANOVA y la prueba post hoc de Bonferroni a los datos obtenidos de las IC₅₀ en donde se consideró la significación del test con un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Colonización y mantenimiento de la colonia

Los especímenes adultos de *C. vicina* y *S. magellanica* se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio, en donde se observó adaptabilidad de las dos especies a las condiciones físicas, ambientales y nutricionales establecidas. Las larvas de tercer estadio de la especie *C. vicina* se obtuvieron a los 5 días aproximadamente después de la oviposición, al igual que para *S. magellanica*. Hubo continuidad del ciclo de vida de las moscas a través de varias generaciones, lo cual permitió el suministro de material biológicos en los ensayos correspondientes.

Obtención y filtración de excreciones y secreciones larvales

Para *C. vicina* y *S. magellanica* se obtuvieron 15 mL de ES_n a partir de 3000 larvas, las cuales tuvieron un peso aproximado de 134,4 g.

A partir de 10 mL de las ESn de *C. vicina* y *S. magellanica*, se obtuvieron 6 mL de las ES menores de 10 kDa y 4 mL de las ES 10 mayores de 10 kDa para cada una de las especies evaluadas.

Cuantificación de proteínas

Las ESn y las ES menores de 10 kDa de *C. vicina* registraron una concentración de proteínas de 6,764 µg /mL y 4,561 µg /mL respectivamente, mientras que la concentración de las ES de *S. magellanica* fue menor en comparación con la anterior, teniendo en cuenta que para las ESn fue de 4,674 µg /mL y para las ES menores de 10 kDa correspondió a 4,050 µg /mL.

Actividad antimicrobiana

Análisis de inhibición de crecimiento en medio líquido por turbidimetría

Al evaluar la actividad antimicrobiana de las ESn y las ES mayores y menores de 10 kDa de *C. vicina* contra *S. aureus* MRSA y *E. coli*, se evidenció que las ESn y las ES menores de 10 kDa registraron potente actividad antimicrobiana ($p=0,000$), mientras que las ES mayores de 10 kDa no inhibieron el crecimiento de estas bacterias (figuras 1A y 1B), razón por lo cual esta última fracción no se utilizó en los siguientes ensayos; además, se encontró que las ES menores de 10 kDa fueron diferencialmente más efectivas que las ESn en relación con los resultados obtenidos con la bacteria *E. coli* ($p=0.040$) (figura 1A); sin embargo, en el caso de *S. aureus* no hubo diferencias entre ellas ($p=0.217$) (figura 1B). En la especie *S. magellanica*, los hallazgos fueron similares, pero al contrario de *C. vicina* se determinó que las ES menores de 10 kDa mostraban diferencias

significativas frente a la bacteria *S. aureus* MRSA ($p=0.006$) (figura 1B), en tanto que para *C. vicina* no hubo diferencias entre las ES_n y las ES menores de 10kDa ($p=1.000$) (figura 1A)

Las ES_n y las ES menores de 10 kDa de *C. vicina* fueron eficaces contra las bacterias Gram negativas (figura 2A) y las bacterias Gram positivas evaluadas, excepto para *S. pneumoniae* ATCC 6303 (figura 2B), siendo las ES menores de 10 kDa las que mostraron una mayor actividad antibacterial respecto a las ES_n ($p < 0.0226$). En la especie *S. magellanica*, las ES_n y las ES menores de 10 kDa no tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de *S. pneumoniae*; sin embargo, si registró actividad contra las demás bacterias evaluadas (figuras 2A y 2B), en donde la fracción menor de 10 kDa fue más efectiva que las ES_n solo en las 3 cepas de *S. aureus* ($p < 0.0377$) y la correspondiente a *P. aeruginosa* ($p=0.0000$). Al comparar la actividad de las ES menores de 10 kDa entre *C. vicina* y *S. magellanica* no se registraron diferencias significativas en ninguna de las bacterias evaluadas ($p > 0.2897$) (figuras 2A y 2B).

Análisis de la concentración mínima inhibitoria en medio líquido por turbidimetría

En el presente estudio se observó que las concentraciones evaluadas de las ES menores de 10 kDa no inhibieron completamente el crecimiento microbiano de ninguna de las bacterias evaluadas; no obstante, los antibióticos utilizados como control positivo tampoco inhibieron el 100% del crecimiento.

Tanto para *C. vicina* como para *S. magellanica* la primer dilución que corresponde a una concentración de 2280 µg/mL y 1525 µg/mL respectivamente, fue la más efectiva para inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Concentración efectiva 50 (IC 50)

El análisis estadístico evidenció que existen diferencias significativas en la sensibilidad de cada una de las especies bacterianas evaluadas en presencia de las ES menores de 10kDa de las dos especies de moscas. En la prueba post hoc de bonferroni se observó que para *C. vicina* había un mayor efecto contra las bacterias Gram negativas, siendo *P. aeruginosa* quien aportaba diferencias significativas respecto a las demás bacterias $p < 0.05$, en tanto para las bacterias Gram positivas no hubo diferencias (cuadro 1); para *S. magellanica*, se observa que las diferencias son aportadas por las bacterias Gram negativas como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. marcescens* $p < 0.05$ y *S. aureus* ATCC 43300 $p < 0.05$ (cuadro 2), lo cual indica que las IC 50 de las ES menores de 10 kDa de esta especie de mosca tienen un amplio espectro. Lo anterior pone en manifiesto que las ES menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica* se comportan de forma distinta.

Discusión

En el presente estudio se demostró que tanto las ES_n y las ES menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica* exhibieron actividad antimicrobiana

contra tres bacterias Gram positivas, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* MRSA ATCC 43300 y contra cuatro bacterias Gram negativas, *E. coli* (ATCC 26922), *P. aeruginosa* (ATCC 1744 – BAA), *S. marcescens* (ATCC 13880) y *K. pneumoniae* ATCC (ATCC 700603); sin embargo, no se registró actividad contra *S. pneumoniae* ATCC 6303, lo cual pudo estar relacionado con la protección que ofrece la cápsula de lipopolisacáridos que posee este microorganismo, que corresponde probablemente al factor de virulencia más importante, por haber exhibido previamente actividad antifagocítica, disminuir la autólisis y reducir la exposición de los antibióticos (20).

En relación con los resultados obtenidos a partir de las cepas evaluadas de *S. aureus*, se observó que el potencial antimicrobiano de las ES menores de 10 kDa tanto de *C. vicina*, como de *S. magellanica*, guardan semejanza con un estudio previo en el que se demostró actividad antibacteriana significativa de la fracción menor de 500 Da aislada de las ES de *L. sericata* contra un amplio espectro de cepas *S. aureus* MRSA (21); sin embargo, la fracción mayor de 10 kDa aislada de *C. vicina* y *S. magellanica*, no inhibió el crecimiento bacteriano, lo cual coincide con lo reportado en la fracción mayor de 10 kDa de *L. sericata* (13), esto puede significar que las moléculas que se encuentran en rangos de bajo peso molecular son las que realmente poseen actividad antimicrobiana; de hecho, investigaciones previas han reportado que los péptidos antimicrobianos tales como la lucifencina (aislado y purificado de *L. sericata*) se encuentran en un rango de peso molecular de

0.5 a 10 kDa (22). Además, en el presente estudio se observó inhibición significativa de las ES_n contra *S. aureus*, siendo similar con los resultados obtenidos en investigaciones anteriores en donde se observó una potente actividad de las ES_n de *S. magellanica* contra diferentes cepas de *S. aureus*, a partir de los ensayos de turbidimetría (15).

En relación con las bacterias Gram negativas, la duración y potencia de la actividad antibacterial fue diferente respecto a lo reportado en algunos estudios previos; así por ejemplo, en el presente trabajo, se observó que las ES_n y las ES menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica* exhibieron actividad contra *P. aeruginosa* hasta las 18 horas de evaluación, mientras que en un estudio previo reportaron que en el ensayo de unidades formadoras de colonia (UFC) las ES_n de la especie *C. vicina* inicialmente redujeron el número de colonias, pero después de 8 horas nuevamente hubo crecimiento de la bacteria (16). Por otro lado, las ES_n y las ES menores de 10 kDa inhibieron significativamente el crecimiento de *S. marcescens* por un tiempo de 18 horas; no obstante, otra investigación reportó que las ES_n de *C. megacephala* y *C. putoria* sólo mantuvieron su potencial antimicrobiano durante las primeras 6 horas del total de las 22 horas de estudio (17); finalmente, las ES_n y las ES menores de 10 kDa tanto de *C. vicina* y *S. magellanica* presentaron actividad contra *K. pneumoniae*, mientras que las ES_n de *L. sericata* estudiadas no inhibieron esta bacteria en el ensayo de difusión en disco (14). Respecto a *E. coli*, en el ensayo de UFC, difusión en disco y turbidimetría de los estudios anteriormente mencionados, los

resultados fueron similares, ya que las ES evaluadas demostraron potencial actividad antimicrobiana independientemente de la especie de mosca estudiada (14,16,17).

Los resultados discordantes del presente estudio con investigaciones previas (14,16,17), podrían explicarse al considerar otras variables, por ejemplo, las diferentes técnicas utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana; así, en el presente estudio se evaluó la actividad antibacterial por turbidimetría, en razón a que se considera que tiene mayor sensibilidad en comparación con otras técnicas frecuentemente usadas. Otros posibles factores que pudieron influir en los resultados incluyeron el número de larvas utilizadas y el pretratamiento realizado con las cepas bacterianas sobre las larvas, el cual pudo haber aumentado la concentración de moléculas con propiedades antibacterianas de las ES larvales (15).

En los ensayos de CMI se observó que las ES menores de 10 kDa de las dos especies de moscas evaluadas exhibieron actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas. En el IC50 se efectuaron algunas diferencias en la inhibición del crecimiento de las bacterias, evidenciándose que las Es menores a 10 kDa de *S. magellanica* tenían un amplio espectro, mientras que las ES de *C. vicina* tuvieron una mejor actividad contra las bacterias Gram - negativas. Investigaciones previas sugieren que las bacterias Gram positivas son más sensibles a las ES larvales, mientras que las bacterias Gram negativas requieren mayores concentraciones para su inhibición (23,24), no obstante, algunos autores

sugieren lo contrario (16,17), en razón a lo anterior, es necesario realizar más estudios que conduzcan a resultados concluyentes.

Por otro lado, a pesar de que las ES menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica* presentaron una potente actividad antimicrobiana, esta actividad no fue bactericida; es por esto que la combinación de ES larvales con agentes antimicrobianos podría tener un potencial terapéutico mayor (24,25), lo cual a su vez podría ser una alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos (26). Es importante resaltar, que la combinación sinérgica de las ES con los antibióticos puede retrasar el desarrollo de mecanismos de resistencia (27).

En relación con algunos de los componentes antimicrobianos que hacen parte de las ES larvales, se han registrado compuestos alcalinos, como carbonato de amonio, calcio, alantoína y urea que tienen acción sobre el crecimiento microbiano (11); además, metaloproteinasas de matriz (MMP), como la quimiotripsina tienen efecto inhibitorio sobre la formación de biopelículas, y la desoxirribonucleasa (ADNsa) que impide tanto el crecimiento bacteriano como la formación de biopelículas (7), todas ellas son de relevante significancia.

Por otro lado, los péptidos antimicrobianos (PAM), importantes componentes de las ES larvales, actúan como mecanismo de defensa del huésped, poseen un potente poder bactericida y tienen la capacidad de neutralizar toxinas (28). En estudios previos se han aislado, caracterizado y evaluado dos PAM de las ES larvales de *S. magellanica*, los cuales demostraron una

potente actividad antimicrobiana (29,30). No obstante, es importante continuar estudiando las propiedades que poseen las ES larvales tanto de *S. magellanica* como de *C. vicina*, puesto que, podrían ser útiles de forma individual o sinérgica para el desarrollo de potenciales fármacos o para la producción de nuevos agentes antiinfecciosos que, entre otras funciones, tendrían aplicación terapéutica tópica en heridas crónicas, por ejemplo aquellas asociadas a úlceras diabéticas, por lo tanto, la alta purificación y la producción de PAM en masa son la máxima prioridad para un uso amplio. Se ha evidenciado que además de su potente poder antimicrobiano, las ES larvales de los califóridos también tienen actividad antifúngica (31,32), antiparasitaria, anti – inflamatoria (33), y procoagulante (34,35), lo cual aumenta positivamente el interés en estas especies de moscas. Los anteriores hallazgos sugieren que las propiedades de las ES larvales, representadas en sus componentes, derivadas de estas especies de moscas necrófagas podrían ser potencialmente promisorias para el aislamiento y desarrollo de agentes antimicrobianos. En resumen, se demostró que las ES nativas (ESn) y las ES menores de 10 kDa, derivadas de larvas de las especies *C. vicina* y *S. magellanica* poseen potente actividad antibacterial contra tres cepas de *S. aureus* y cuatro bacterias Gram-negativas, siendo las ES menores de 10 kDa más efectivas que las ESn en las dos especies de moscas evaluadas. Las ES menores de 10 kDa presentaron la misma efectividad, excepto cuando se determinó el IC50, en donde se observó que las ES de la especie *S. magellanica* tenían un amplio espectro de acción, en

tanto las ES *C. vicina* tenían un mayor potencial frente a bacterias Gram-negativas.

Agradecimientos

Agradecemos a la profesora Yuly Eilen Bernal por su apoyo en los ensayos microbiológicos realizados en la Universidad Antonio Nariño. Al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, por la expedición de la Resolución 0922 del 15 de mayo de 2017, relacionada con el proyecto marco.

Conflicto de intereses

Los autores del presente artículo no tienen ningún tipo de conflicto de intereses financieros, académicos o personales, que puedan afectar la validez del estudio.

Financiación

Este trabajo fue co-financiado por Minciencias, FP44842-384, Código No. 125371250687, por la Universidad Antonio Nariño y por la Universidad de La Salle.

Referencias

1. **Pape T, Wolff M, Amat EC.** Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófagidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana*. 2004;39:201-8. <https://doi.org/10.21068/BC.V5I2.145>
2. **Camacho G.** Sucesión de la entomofauna cadavérica y ciclo vital de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) como primera especie colonizadora, utilizando cerdo blanco. *Revista Colombiana de*

- Entomología. 2005; **incluir el volumen**:35-9.
3. **Francesconia F, Lupi O.** Myiasis. Clin Microbiol Rev. 2012;25:79-105.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00010-11>
 4. **Getachew S, Gebre-Michael T, Erko B, Balkew M, Medhin G.** Non-biting cyclorrhaphan flies (Diptera) as carriers of intestinal human parasites in slum areas of Addis Ababa, Ethiopia. Acta Trop. 2007;103:186-94. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.06.005>
 5. **Sharma R, Kumar Garg R, Gaur JR.** Various methods for the estimation of the post mortem interval from Calliphoridae: A review. Egypt J Forensic Sci. 2015;5:1-12.
<https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2013.04.002>
 6. **Sherman RA.** Maggot therapy takes us back to the future of wound care: New and improved maggot therapy for the 21st century. J Diabetes Sci Technol. 2009;3:336-44.
<https://doi.org/10.1177/193229680900300215>
 7. **Sherman RA.** Mechanisms of Maggot-Induced Wound Healing: What Do We Know, and Where Do We Go from Here? Evidence-Based Complement Altern Med. 2014: 2014:1-13.
<https://doi.org/10.1155/2014/592419>
 8. **Choudhary V, Choudhary M, Pandey S, Chauhan VD, Hasnani JJ.** Maggot debridement therapy as primary tool to treat chronic wound of animals. Vet World. 2016;9:403-9.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.403-409>

9. **Van der Plas MJA, Jukema GN, Wai SW, Dogterom-Ballering HCM, Legendijk EI, Van Gulpen C, et al.** Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:117-22.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkm407>
10. **Mumcuoglu KY, Miller J, Mumcuoglu M, Friger M, Tarshis M.** Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol.* 2009;38:161-6.
<https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.2.161>
11. **Parnés A, Lagan KM.** Larval therapy in wound management: A review. *Int J Clin Pract.* 2007;61:488-93. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2006.01238.x>
12. **Jansen KU, Knirsch C, Anderson AS.** The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance. *Nat Med.* 2018;24:10-20.
<https://doi.org/10.1038/nm.4465>
13. **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.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.08.011>
14. **Hassan MI, Amer MS, Hammad KM, Zidan MM.** Antimicrobial activity for excretion and secretion. *J Egypt Soc Parasitol.* 2016;46:179-84.

<https://doi.org/10.12816/0026163>

15. **Díaz-Roa A, Gaona MA, Segura NA, Suárez D, Patarroyo MA, Bello FJ.** *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) excretions and secretions have potent antibacterial activity. *Acta Trop.* 2014;136:37-43. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.018>
16. **Barnes KM, Gennard DE, Dixon RA.** An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. *Bull Entomol Res.* 2010;100:635-40. <https://doi.org/10.1017/S000748530999071X>
17. **Ratcliffe NA, Vieira CS, Mendonça PM, Caetano RL, Queiroz MM de C, Garcia ES, et al.** Detection and preliminary physico-chemical properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil. *Acta Trop.* 2015;147:6-11. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.021>
18. **Fonseca-Muñoz A, Pérez-Pacheco R, Ortega-Morales BO, Reyes-Estebanez M, Vásquez-López A, Chan-Bacab M, et al.** Bactericidal activity of *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) larval excretions-secretions against *Staphylococcus aureus* (Bacillales: Staphylococcaceae). *J Med Entomol.* 2019;56:1598-604. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz109>
19. **Amat E, Vélez MC, Wolff M.** Illustrated key for identification to genera

and species of blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Colombia. *Caldasia*. 2008;30:231-44.

20. **Mitchell AM, Mitchell TJ.** Streptococcus pneumoniae: Virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:411-8.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x>
21. **Bexfield A, Bond AE, Roberts EC, Dudley E, Nigam Y, Thomas S, et al.** The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500 Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes Infect*. 2008;10:325-33.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.12.011>
22. **Čeřovský V, Žďárek J, Fučík V, Monincová L, Voburka Z, Bém R.** Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:455-66.
<https://doi.org/10.1007/s00018-009-0194-0>
23. **Kawabata T, Mitsui H, Yokota K, Ishino K, Oguma K, Sano S.** Induction of antibacterial activity in larvae of the blowfly *Lucilia sericata* by an infected environment. *Med Vet Entomol*. 2010;24:375-81.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00902.x>
24. **Van der Plas MJA, Dambrot C, Dogterom-Ballering HCM, 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.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkq042>

25. **Cazander G, Pawiroredjo JS, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Schreurs MWJ, Jukema GN.** Synergism between maggot excretions and antibiotics. *Wound Repair Regen.* 2010;18:637-42.
<https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00625.x>
26. **Esparza G.** Bacterias Gram negativas resistentes a carbapenemicos en Colombia : un desafío continuo al sistema de salud. *Infectio.* 2020;24:55-6. <https://doi.org/10.22354/in.v24i2.831>
27. **Arora S, Baptista C, Lim CS.** Maggot metabolites and their combinatory effects with antibiotic on *Staphylococcus aureus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2011;10:6. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-6>
28. **Hirsch R, Wiesner J, Marker A, Pfeifer Y, Bauer A, Hammann PE, et al.** Profiling antimicrobial peptides from the medical maggot *Lucilia sericata* as potential antibiotics for MDR Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74:96-107.
<https://doi.org/10.1093/jac/dky386>
29. **Díaz-Roa A, Espinoza-Culupú A, Torres-García O, Borges MM, Avino IN, Alves FL, et al.** Sarconesin II, a new antimicrobial peptide isolated from *Sarconesiopsis magellanica* excretions and secretions. *Molecules.* 2019;24:1-27. <https://doi.org/10.3390/molecules24112077>
30. **Díaz-Roa A, Patarroyo MA, Bello FJ, Da Silva PI.** Sarconesin: *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval excretions and secretions

with antibacterial properties. *Front Microbiol.* 2018;9:1-13.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02249>

31. **Alnaimat SM, Wainwright M, Aladaileh SH.** An initial *in vitro* investigation into the potential therapeutic use of *Lucilia Sericata* maggot to control superficial fungal infections. *Jordan J Biol Sci.* 2013;6:137-42. <https://doi.org/10.12816/0000271>
32. **Evans R, Dudley E, Nigam Y.** Detection and partial characterization of antifungal bioactivity from the secretions of the medicinal maggot, *Lucilia sericata*. *Wound Repair Regen.* 2015;23:361-8. <https://doi.org/10.1111/wrr.12287>
33. **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. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.01.008>
34. **Pöppel AK, Kahl M, Baumann A, Wiesner J, Gökçen A, Beckert A, et al.** A Jonah-like chymotrypsin from the therapeutic maggot *Lucilia sericata* plays a role in wound debridement and coagulation. *Insect Biochem Mol Biol.* 2016;70:138-47. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.11.012>
35. **Kahl M, Gökçen A, Fischer S, Bäumer M, Wiesner J, Lochnit G, et al.** Maggot excretion products from the blowfly *Lucilla sericata* contain contact phase/intrinsic pathway-like proteases with procoagulant

functions. *Thromb Haemost.* 2015;114:277–88.

<http://doi.org/10.1160/TH14-06-0499>

Figuras

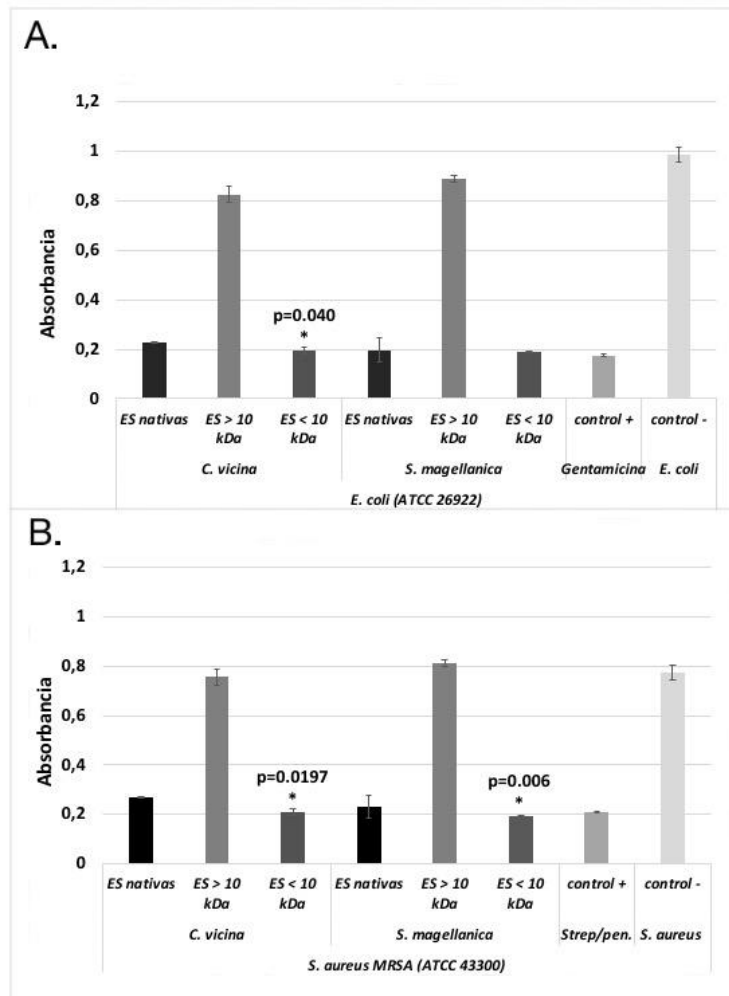


Figura 1. Actividad antimicrobiana de las ES nativas y de las fracciones obtenidas a través de la filtración (ES mayores y menores de 10 kDa); la susceptibilidad bacteriana se evaluó mediante ensayos de turbidimetría. * Inhibición significativa del crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*. A. Actividad antimicrobiana contra *E. coli* (ATCC 26922); B. Actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 43300)

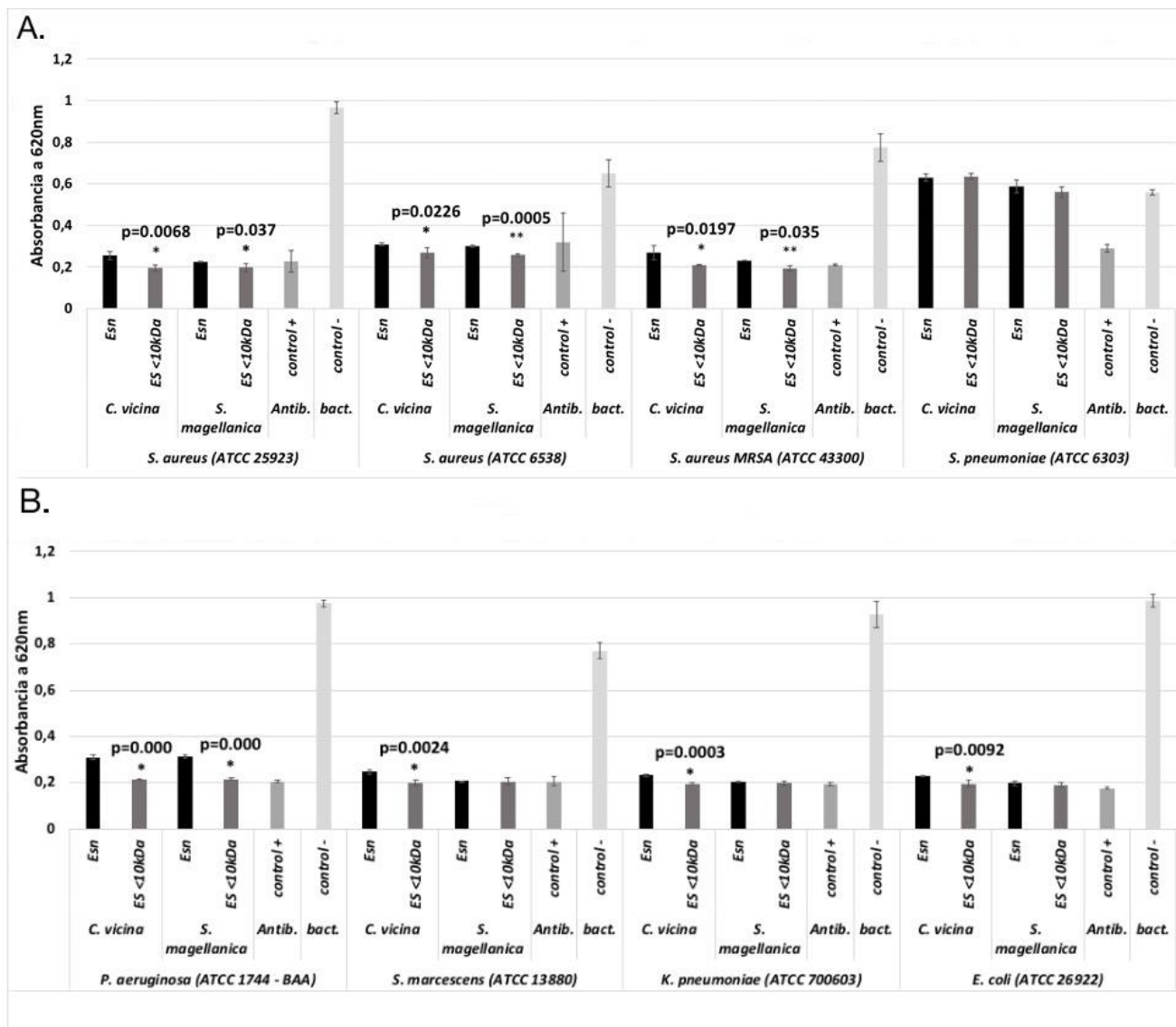


Figura 2. Actividad antimicrobiana de las ES nativas y de las ES menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*. A. Actividad de las ES frente a bacterias Gram positivas; B. Actividad de las ES frente a bacterias Gram negativas. La susceptibilidad bacteriana se evaluó mediante ensayos de turbidimetría. *Diferencia significativa: $p < 0.05$ ** Diferencia altamente significativa: $p < 0.001$.

Cuadro 1. CMI e IC 50 de la actividad antimicrobiana de las ES menores de 10kDa de *C. vicina* frente a diferentes cepas Gram positivas y Gram negativas. *Diferencia significativa: $p < 0.05$

Bacteria	<i>C. vicina</i>	
	CMI $\mu\text{g/mL}$	IC 50 $\mu\text{g/mL}$
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	2280	374.11 \pm 15.52
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2280	447.86 \pm 47.18
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 MRSA	2280	830.29 \pm 10.69
<i>E. coli</i>	2280	756.39 \pm 27.77
* <i>P. aeruginosa</i>	2280	1537.60 \pm 407.41
<i>K. pneumoniae</i>	2280	336.77 \pm 21.96
<i>S. marcescens</i>	2280	540.24 \pm 57.00

Cuadro 2. CMI e IC 50 de la actividad antimicrobiana de las ES menores de 10kDa de *S. magellanica* frente a diferentes cepas Gram positivas y Gram negativas. *Diferencia significativa: $p < 0.05$

<i>S. magellanica</i>		
Bacteria	CMI $\mu\text{g/mL}$	IC 50 $\mu\text{g/mL}$
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1525	534.50 \pm 63.36
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1525	579.38 \pm 19.95
* <i>S. aureus</i> ATCC 43300 MRSA	1525	118.95 \pm 118.95
<i>E. coli</i>	1525	503.75 \pm 23.93
* <i>P. aeruginosa</i>	1525	264.12 \pm 264.12
* <i>K. pneumoniae</i>	1525	320.95 \pm 8.56
* <i>S. marcescens</i>	1525	256.50 \pm 27.29