

Artículo original

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

Francy Novoa-Palomares<sup>1</sup>, Laura Salas-Díaz<sup>1</sup>, Cindy Pérez-Téllez<sup>2</sup>, Ingrid Pinillos-Medina<sup>1</sup>, Orlando Torres-García<sup>2</sup>, Felio J. Bello<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Antonio Nariño, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá D.C., Colombia

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

**Objetivo.** Comparar la actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones larvianas nativas, y de las 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 excreciones y secreciones menores de 10 kDa se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM).

**Resultados.** Las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*, evidenciaron una potente actividad antibacteriana contra tres cepas de *Staphylococcus aureus* y cuatro bacterias Gram negativas, siendo las menores de 10 kDa más efectivas que las nativas en las dos especies de moscas evaluadas. Además, las menores de 10 kDa presentaron la misma efectividad, aunque en las pruebas de CIM se observó que las de *S. magellanica* fueron más potentes en todas las bacterias evaluadas, excepto contra la cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Las mayores de 10 kDa no inhibieron el crecimiento bacteriano.

**Conclusión.** Los resultados validaron, en general, que estas sustancias son fuente importante para el aislamiento y la caracterización de agentes antimicrobianos.

**Palabras clave:** dípteros; bacterias Gram positivas; bacterias Gram negativas; modalidades de secreciones y excreciones; antibacterianos; larva.

### A comparative analysis of *Calliphora vicina* and *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) larval secretions and excretions antimicrobial activity

**Introduction:** The growing resistance to antibiotics worldwide represents a global threat to public health. The larval excretions and secretions derived from necrophagous flies from the Calliphoridae family could represent a promising source for counteracting their effects.

**Objective:** To compare the antimicrobial activity of *Calliphora vicina* and *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) native excretions and secretions and those weighing more than 10 kDa and less.

**Materials and methods:** We used the turbidimetry technique for the bioassay; we determined the minimum inhibitory concentration (MIC) for excretions and secretions weighing less than 10 kDa.

**Results:** *Calliphora vicina* and *S. magellanica* native excretions and secretions and those weighing less than 10 kDa exhibited potent antibacterial activity against three *Staphylococcus aureus* strains and four Gram-negative bacteria; those weighing less than 10 kDa were more effective than the native ones in the two species of flies evaluated here. Furthermore, excretions and secretions weighing less than 10 kDa had the same effectiveness, except in the MIC trials where *S. magellanica* excretions and secretions weighing less than 10 kDa were more potent against all the bacteria evaluated, except for *S. aureus* ATCC 25923. Excretions and secretions weighing more than 10 kDa did not inhibit bacterial growth.

**Conclusions:** These results potentially validate these substances as an important source for isolating and characterizing antimicrobial agents.

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

**Recibido:** 23/03/2021

**Aceptado:** 01/10/2021

**Publicado:** 05/10/2021

#### Citación:

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 larvianas de *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae). *Biomédica*. 2022;42:c. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6067>

#### Correspondencia:

Felio J. Bello, Programa de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Avenida Carrera 7 No 179-03, Bogotá, D.C., Colombia  
Teléfono: (601) 677 2699  
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  
Ingrid Pinillos y Orlando Torres: asesoría en los procedimientos descritos en el manuscrito y en el desarrollo del proyecto  
Felio J. Bello: idea de la investigación y asesoría para el desarrollo del proyecto  
Todos los autores participaron en la revisión y escritura del manuscrito.

#### Financiación:

Este trabajo fue cofinanciado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (FP44842-384, código 125371250687), por la Universidad Antonio Nariño y por la Universidad de La Salle.

#### Conflicto de intereses:

Los autores no tienen ningún tipo de conflicto de intereses financiero, académico o personal que pueda afectar la validez del estudio.

La familia Calliphoridae está constituida por moscas con calípteros 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 que 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 2.500 metros sobre el nivel del mar (msnm) (2). *Sarconesiopsis magellanica* (Le Guillou) (Diptera: Calliphoridae) es una especie hemisinantrópica que se distribuye en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Norte de Santander, entre los 1.200 y los 3.100 msnm (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 se utilizan en los estudios forenses para determinar el intervalo *post mortem* (5). Asimismo, las especies de la familia Calliphoridae se han estudiado ampliamente por los efectos benéficos de las larvas en heridas de difícil cicatrización, como las úlceras diabéticas crónicas (6), ya que limpian las heridas infectadas y necróticas, facilitando así su cicatrización, en lo que se conoce como terapia larvaria o “biocirugía” (6). El proceso de curación de heridas se da a partir de tres acciones sinérgicas: el desbridamiento (7), la desinfección (8) y erradicación de biopelículas (9), y la estimulación del tejido de granulación en la cicatrización (9).

En cuanto al efecto antimicrobiano, las larvas ingieren bacterias dentro del tejido necrótico, eliminando así los microorganismos presentes (10); además, en sus excreciones y secreciones liberan un amplio espectro de sustancias con la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas (11). Estos hallazgos son potencialmente útiles en el campo médico, ya que las propiedades antibacterianas de las excreciones y secreciones larvarias pueden ser una alternativa en el tratamiento y control de las enfermedades infecciosas no controladas con los antibióticos convencionales tras su uso masivo y desregulado, el cual ha propiciado el desarrollo de resistencia bacteriana asociada con gran morbilidad y mortalidad en todo el mundo (12).

En algunos estudios se ha demostrado la efectividad antibacteriana de las excreciones y secreciones larvarias de diferentes especies de moscas de la familia Calliphoridae, como *Lucilia sericata* (13,14), *S. magellanica* (15), *C. vicina* (16), *Chrysomya putoria* (17), *C. megacephala* (17), *C. ruffifacies* (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 agentes patógenos asociados frecuentemente con infecciones hospitalarias e infecciones en heridas de difícil cicatrización.

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

## **Materiales y métodos**

### **Colonización y mantenimiento de las colonias de las moscas *Calliphora vicina* y *Sarconesiopsis magellanica***

Los especímenes adultos de ambas especies se recolectaron con una jama entomológica en el Parque Nacional Enrique Olaya Herrera de Bogotá, localizado en las coordenadas 4°37'28,2"N 74°03'56,3"W. La identificación morfológica se hizo bajo un estereoscopio con base en la clave ilustrada para la identificación de los géneros y especies de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de Colombia (19).

Se contó con los permisos de recolección contemplados en 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  $25 \pm 1$  °C, humedad relativa de  $60 \pm 5$  % y fotoperiodo de 12:12; su alimentación consistió en hígado como fuente proteica y agua azucarada como fuente de carbohidratos. Los huevos se transfirieron a frascos de vidrio identificados con el nombre de cada especie, los cuales contenían 10 g de hígado de cerdo. Después de la eclosión, se agregó más hígado para permitir el desarrollo larvario y, en un tiempo aproximado de cinco días, se tomaron las larvas de tercer estadio.

### **Obtención de excreciones y secreciones larvarias**

En las pruebas se utilizaron 3.000 larvas de tercer estadio de *C. vicina* y *S. magellanica*, las cuales fueron inmunizadas previamente con el fin de activar el sistema inmunológico y aumentar la expresión de los componentes con actividad antibacteriana. En este proceso, se empleó una mezcla en suspensión de cuatro especies de bacterias Gram positivas (tres cepas de *S. aureus* y *S. pneumoniae*) y cuatro Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* y *K. pneumoniae*) con una concentración de 0,5 en la escala de McFarland durante una hora a 37 °C (15).

Enseguida, se procedió a la desinfección de las larvas con 0,5 % de hipoclorito durante cinco minutos, seguida de un lavado con 5 % de formaldehído por cinco minutos y, por último, tres inmersiones durante tres minutos en solución salina estéril (15). Posteriormente, se agregaron 100 µl de solución salina estéril a las larvas y se incubaron a 25 °C durante una hora para inducir las excreciones y secreciones; después, estas se extrajeron y se llevaron a tubos Eppendorf de 2 ml y se centrifugaron a 13.000g a una temperatura de 4 °C durante 10 minutos. Para eliminar posibles contaminantes, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22 µm (Ultra Cruz™) (15).

### **Filtración**

Al cabo del proceso anterior, se tomaron 10 ml de excreciones y secreciones nativas de *C. vicina* y *S. magellanica*; luego; se filtraron usando una membrana Amicon Ultra 15™. Las de peso molecular de 10 kDa, se centrifugaron durante 10 minutos a 4 °C al alcanzar los 4.200g y se obtuvieron fracciones mayores y menores de 10 kDa.

### **Cuantificación de proteínas**

Para esto se empleó espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS) a 280 nm en un equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™) usando 2 µl de excreciones y secreciones nativas, y 2 µl de las 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: MRSA, *methicillin-resistant S. aureus*), *S. 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 se seleccionaron dado que en ellas no se ha estudiado ampliamente el potencial antimicrobiano de las excreciones y secreciones.

### **Pruebas de inhibición de crecimiento en medio líquido mediante turbidimetría**

Se evaluó el potencial antimicrobiano de las excreciones y secreciones nativas, y de las mayores o menores de 10 kDa, tanto de *C. vicina* como de *S. magellanica*. En la microplaca, se agregaron 100 µl de medio LB como control, 100 µl de medio con bacteria como control negativo y, como control positivo, se utilizaron dos antibióticos, gentamicina (10 µg/ml) para bacterias Gram negativas y estreptomycin-penicilina (10 µg – 10 UI) para bacterias Gram positivas; y se adicionaron 50 µl de cada antibiótico en 50 µl de medio con la bacteria seleccionada; para las excreciones y secreciones nativas, y las mayores o menores de 10 kDa, se agregaron 50 µl de cada una a 50 µl de medio con bacteria.

Las pruebas se practicaron por triplicado, el tiempo de incubación fue de 18 horas a 37 °C y la lectura de la absorbancia se hizo a una longitud de onda de 620 nm. El porcentaje de crecimiento se determinó empleando la siguiente fórmula:

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

### **Prueba de concentración inhibitoria mínima en medio líquido mediante turbidimetría**

Para la prueba de CIM se hicieron diluciones seriadas de 1:2 a partir de la concentración de proteína obtenida de las excreciones y secreciones mayores de 10 kDa de larvas de tercer estadio. Para las de *S. magellanica*, las concentraciones utilizadas en las diluciones respectivas fueron de 1.525, 762,5, 381,25, 190,6, 95,3, 47,6 y 23,8 µg/ml, en tanto que para la mosca *C. vicina* fueron 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.

Por último, se adicionaron 50 µl de cada dilución a 50 µl de medio con la bacteria seleccionada, para un total de 100 µl en cada pozo. Los controles positivo y negativo, y el tiempo y la temperatura de incubación fueron los mismos descritos en el proceso anterior. Las pruebas se practicaron por triplicado.

### **Concentración efectiva 50 (IC<sub>50</sub>)**

Para obtener el valor de la IC<sub>50</sub>, se utilizó el logaritmo de las concentraciones de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de las dos especies de moscas frente al porcentaje de inhibición obtenido, con lo que se generó una gráfica (curva dosis-respuesta) cuyos puntos se ajustaron mediante regresión no lineal a una ecuación sigmoide de cuatro parámetros. A partir de esta ecuación, se calculó la concentración de las excreciones y las secreciones tanto de *C. vicina* como de *S. magellanica*, para obtener una inhibición del 50 % de las bacterias evaluadas.

### **Análisis estadísticos**

Se construyó una base de datos con los resultados obtenidos y se hizo el análisis estadístico descriptivo correspondiente. Con el programa Stata 12, se hizo un ANOVA de una vía para determinar diferencias entre las excreciones y secreciones nativas, y las mayores y menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni para establecer cuál de las variables estudiadas aportaba dicha diferencia.

Asimismo, con la prueba t de Student se evaluó si se presentaban diferencias significativas entre la actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones nativas, y las menores de 10 kDa de cada una de las especies de mosca estudiadas.

Los datos se analizaron con un índice de confianza del 95 %, en el cual un valor de  $p < 0,05$  indicaba diferencias significativas. Para determinar si existían diferencias significativas entre el grado de sensibilidad de las bacterias frente a las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*, se hizo un ANOVA y se practicó la prueba *post hoc* de Bonferroni con los datos obtenidos de las IC<sub>50</sub> y una significación de  $p < 0,05$ .

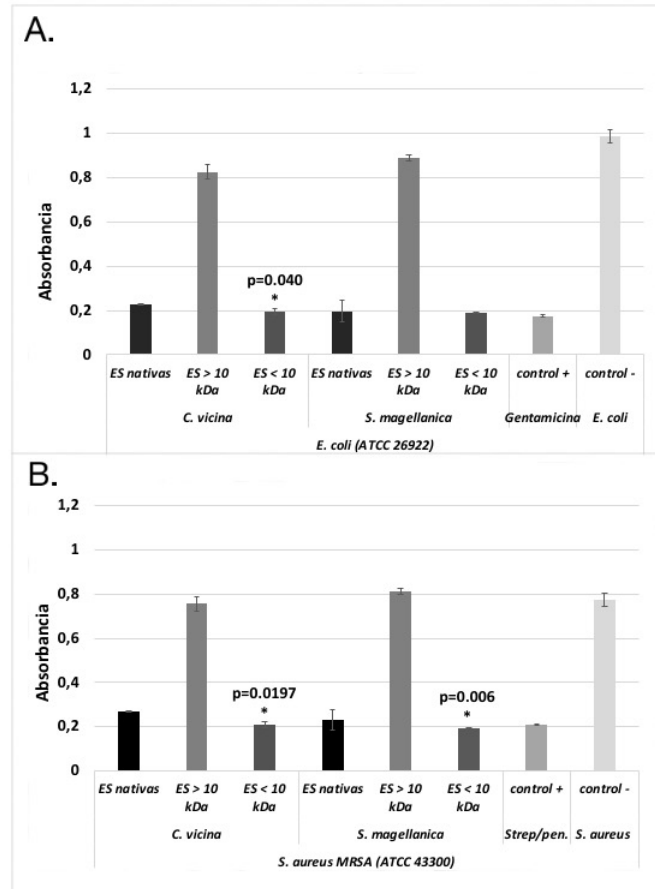
## **Resultados**

### **Colonización y mantenimiento de la colonia**

Los especímenes adultos de *C. vicina* y *S. magellanica* se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio; las dos especies se adaptaron a las condiciones físicas, ambientales y nutricionales establecidas. Las larvas de tercer estadio de las dos especies se obtuvieron aproximadamente cinco días después de la oviposición. Hubo continuidad del ciclo de vida de las moscas en varias generaciones, lo cual permitió el suministro de material biológico en las pruebas correspondientes.

### **Obtención y filtración de excreciones y secreciones larvarias**

Para *C. vicina* y *S. magellanica*, se obtuvieron 15 ml de excreciones y secreciones nativas a partir de 3.000 larvas, las cuales tuvieron un peso aproximado de 134,4 g. A partir de 10 ml de las nativas de *C. vicina* y *S. magellanica*, se obtuvieron 6 ml de las menores de 10 kDa y 4 ml de las mayores de 10 kDa, de cada una de las especies evaluadas.



\* Inhibición significativa del crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*

**Figura 1.** Actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones nativas y de las fracciones obtenidas mediante filtración (mayores y menores de 10 kDa). La sensibilidad bacteriana se evaluó mediante pruebas de turbidimetría. **A.** Actividad antimicrobiana contra *E. coli* (ATCC 26922). **B.** Actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 43300)

### Cuantificación de proteínas

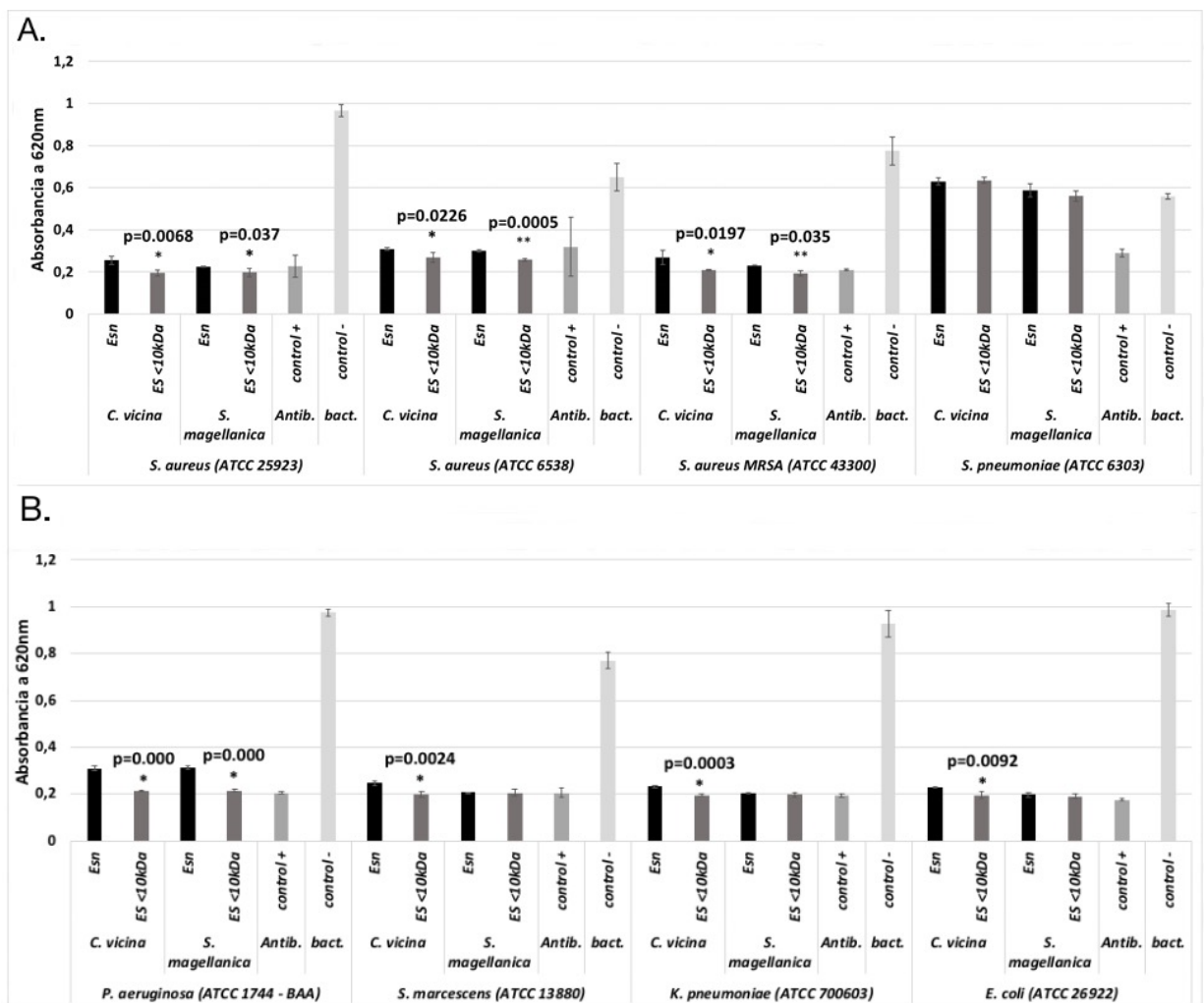
Las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa de *C. vicina*, registraron una concentración de proteínas de 6,764 µg/ml y 4,561 µg/ml, respectivamente, mientras que la concentración de las de *S. magellanica* fue menor en comparación con la anterior, teniendo en cuenta que para las nativas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

### Actividad antimicrobiana

*Análisis de inhibición de crecimiento en medio líquido mediante turbidimetría.* Al evaluar la actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones nativas, y las mayores y menores de 10 kDa de *C. vicina* contra *S. aureus* MRSA y *E. coli*, se evidenció que las nativas y las menores de 10 kDa registraron una potente actividad antimicrobiana ( $p=0,000$ ), en tanto que las mayores de 10 kDa no inhibieron el crecimiento de estas bacterias (figura 1, A y B), razón por lo cual esta última fracción no se utilizó en las siguientes pruebas. Además, se encontró que las excreciones y secreciones menores de 10 kDa fueron diferencialmente más efectivas que las nativas en cuanto a los resultados obtenidos con *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 excreciones y secreciones menores de 10 kDa mostraban diferencias significativas frente a la bacteria *S. aureus* MRSA ( $p=0,006$ ) (figura 1B), en tanto que no hubo diferencias entre las nativas y las menores de 10 kDa de *C. vicina* ( $p=1,000$ ) (figura 1A).

Las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa de *C. vicina*, fueron eficaces contra las bacterias Gram negativas (figura 2A) y Gram positivas evaluadas, excepto para *S. pneumoniae* ATCC 6303 (figura 2B), siendo las menores de 10 kDa las que mostraron una mayor actividad antibacteriana comparadas con las nativas ( $p<0,0226$ ). En la especie *S. magellanica*, las nativas y las menores de 10 kDa no tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de *S. pneumoniae*; sin embargo, sí se registró actividad contra las demás bacterias evaluadas (figuras 2, A y B), siendo la fracción menor de 10 kDa más efectiva que las nativas solo contra las tres cepas de *S. aureus* ( $p<0,0377$ ) y la de *P. aeruginosa* ( $p=0,0000$ ). Al comparar la actividad de las menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*, no se registraron diferencias significativas en ninguna de las bacterias evaluadas ( $p>0,2897$ ) (figuras 2, A y B).



\* Diferencia significativa:  $p<0,05$

\*\* Diferencia muy significativa:  $p<0,001$

**Figura 2.** Actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones nativas y de las menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*. **A.** Actividad frente a bacterias Gram positivas. **B.** Actividad frente a bacterias Gram positivas. La sensibilidad bacteriana se evaluó mediante pruebas de turbidimetría.

**Análisis de la concentración mínima inhibitoria en medio líquido mediante turbidimetría.** Se observó que las concentraciones evaluadas de las excreciones y secreciones 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 con *C. vicina* como *S. magellanica*, la primera dilución, correspondiente a una concentración de 2,280 µg/ml y 1,525 µg/ml, respectivamente, fue la más efectiva para inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

### Concentración efectiva 50 (IC<sub>50</sub>)

El análisis estadístico evidenció diferencias significativas en la sensibilidad de cada una de las especies bacterianas evaluadas en presencia de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de las dos especies de moscas. En la prueba *post hoc* de Bonferroni, se observó que las de *C. vicina* tuvieron un mayor efecto contra las bacterias Gram negativas, siendo *P. aeruginosa* la que aportaba diferencias significativas comparada con las demás bacterias ( $p < 0,05$ ), en tanto que, para las bacterias Gram positivas, no hubo diferencias (cuadro 1); en cuanto a las de *S. magellanica*, se observó que las diferencias fueron aportadas por 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<sub>50</sub> de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de esta especie de mosca tienen un amplio espectro y puso de manifiesto que las menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica* se comportaron de forma distinta.

**Cuadro 1.** CIM e IC<sub>50</sub> de la actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de *C. vicina* frente a diferentes cepas Gram positivas y Gram negativas

<b><i>Calliphora vicina</i></b>		
<b>Bacteria</b>	<b>CIM µg/ml</b>	<b>IC<sub>50</sub> µg/ml</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	2.280	374,11 ± 15,52
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2.280	447,86 ± 47,18
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 MRSA	2.280	830,29 ± 10,69
<i>E. coli</i>	2.280	756,39 ± 27,77
* <i>P. aeruginosa</i>	2.280	1537,60 ± 407,41
<i>K. pneumoniae</i>	2.280	336,77 ± 21,96
<i>S. marcescens</i>	2.280	540,24 ± 57,00

\* Diferencia significativa:  $p < 0,05$

**Cuadro 2.** CIM e IC<sub>50</sub> de la actividad antimicrobiana de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de *S. magellanica* frente a diferentes cepas Gram positivas y Gram negativas

<b><i>Sarconesiopsis magellanica</i></b>		
<b>Bacteria</b>	<b>CIM µg/ml</b>	<b>IC<sub>50</sub> µg/ml</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1.525	534,50 ± 63,36
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.525	579,38 ± 19,95
* <i>S. aureus</i> ATCC 43300 MRSA	1.525	118,95 ± 118,95
<i>E. coli</i>	1.525	503,75 ± 23,93
* <i>P. aeruginosa</i>	1.525	264,12 ± 264,12
* <i>K. pneumoniae</i>	1.525	320,95 ± 8,56
* <i>S. marcescens</i>	1.525	256,50 ± 27,29

\* Diferencia significativa:  $p < 0,05$



## Discusión

En el presente estudio se demostró que tanto las excreciones y secreciones nativas, como las 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).

Por otra parte, no se registró actividad contra *S. pneumoniae* ATCC 6303, lo cual podría relacionarse con la protección que ofrece la cápsula de lipopolisacáridos de este microorganismo, el cual sería, probablemente, el factor de virulencia más importante, pues previamente ha exhibido actividad antifagocítica, ha disminuido la autólisis y ha reducido la exposición a los antibióticos (20).

En cuanto a los resultados obtenidos a partir de las cepas de *S. aureus* evaluadas, se observó que el potencial antimicrobiano de las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de *C. vicina* y de *S. magellanica*, guardó semejanza con lo hallado en un estudio previo en el que se demostró actividad antibacteriana significativa de la fracción menor de 500 Da aislada de las excreciones y secreciones de *L. sericata* contra un amplio espectro de cepas de *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 para la fracción mayor de 10 kDa de *L. sericata* (13), lo que significaría que las moléculas que se encuentran en rangos de bajo peso molecular son las que realmente poseen actividad antimicrobiana; de hecho, en investigaciones previas se ha reportado que los péptidos antimicrobianos, como la lucifencina (aislada y purificada 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 excreciones y secreciones nativas contra *S. aureus*, siendo similar a los resultados obtenidos en estudios anteriores en los que se observó una potente actividad de las de *S. magellanica* contra diferentes cepas de *S. aureus* a partir de las pruebas de turbidimetría (15).

Contra las bacterias Gram negativas, la duración y potencia de la actividad antibacteriana fue diferente a lo reportado en algunos estudios previos. En el presente trabajo, se observó que las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa de *C. vicina* y *S. magellanica*, exhibieron actividad contra *P. aeruginosa* hasta las 18 horas de evaluación, en tanto que, en un estudio previo, se reportó que, en la prueba de unidades formadoras de colonia (UFC), las excreciones y secreciones nativas 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 excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa, inhibieron significativamente el crecimiento de *S. marcescens* durante 18 horas, pero en otro estudio se reportó que las nativas de *C. megacephala* y *C. putoria* solo mantuvieron su potencial antimicrobiano durante las primeras 6 horas de las 22 horas de estudio (17).

Por último, las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa tanto de *C. vicina* como de *S. magellanica*, presentaron actividad contra *K. pneumoniae*, en tanto que las nativas de *L. sericata* estudiadas no inhibieron la bacteria en la prueba de difusión en disco (14). En cuanto a *E. coli*, en la prueba de UFC, en la de difusión en disco y en la turbidimetría de los estudios ya mencionados, los resultados fueron similares, ya que las excreciones y secreciones evaluadas demostraron potencial actividad antimicrobiana independientemente de la especie de mosca estudiada (14,16,17).

Los resultados del presente estudio que no concuerdan con investigaciones previas (14,16,17) podrían explicarse al considerar otras variables, por ejemplo, las diferentes técnicas utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana: en el presente estudio, se evaluó la actividad antibacteriana mediante turbidimetría porque se considera que tiene mayor sensibilidad que otras técnicas frecuentemente usadas. Otros posibles factores que pudieron influir en los resultados incluyen el número de larvas utilizadas y el pretratamiento con las cepas bacterianas en las larvas, el cual pudo haber aumentado la concentración de moléculas con propiedades antibacterianas de las excreciones y secreciones larvarias (15).

En los ensayos de CIM se observó que las excreciones y secreciones menores de 10 kDa de las dos especies de moscas evaluadas exhibieron actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas. En la  $IC_{50}$  se encontraron algunas diferencias en la inhibición del crecimiento de las bacterias, evidenciándose que las excreciones y secreciones menores a 10 kDa de *S. magellanica* tenían un amplio espectro, en tanto que las de *C. vicina* tuvieron una mejor actividad contra las bacterias Gram negativas. En estudios previos, se ha sugerido que las bacterias Gram positivas son más sensibles a las excreciones y secreciones larvarias y que las bacterias Gram negativas requieren mayores concentraciones para su inhibición (23,24), aunque algunos autores sugieren lo contrario (16,17), por lo que son necesarios más estudios que conduzcan a resultados concluyentes.

Por otro lado, a pesar de que las excreciones y secreciones 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 excreciones y secreciones larvarias con agentes antimicrobianos podría tener un mayor potencial terapéutico (24,25) y constituirse en una alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos (26). Es importante resaltar que la combinación sinérgica de las excreciones y secreciones con los antibióticos puede retrasar el desarrollo de mecanismos de resistencia (27).

Además, en algunos de los componentes antimicrobianos de las excreciones y secreciones larvarias se han registrado compuestos alcalinos, como carbonato de amonio, calcio, alantoína y urea, los cuales 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) impide tanto el crecimiento bacteriano como la formación de biopelículas (7).

Por otro lado, los péptidos antimicrobianos, importantes componentes de las excreciones y secreciones larvarias, 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 péptidos antimicrobianos de las excreciones y secreciones

larvarias de *S. magellanica*, los cuales demostraron una potente actividad antimicrobiana (29,30). No obstante, es importante continuar estudiando las propiedades de las excreciones y secreciones larvarias de *S. magellanica* y *C. vicina*, puesto que podrían ser útiles por separado o de forma 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 ello, la purificación y la producción en masa de tales péptidos son de máxima prioridad.

Se ha evidenciado que, además de su potente poder antimicrobiano, las excreciones y secreciones larvarias de los califóridos también tienen actividad antifúngica (31,32), antiparasitaria, antiinflamatoria (33), y procoagulante (34,35), lo cual aumenta positivamente el interés en estas especies de moscas.

Todos estos hallazgos sugieren que las propiedades de los componentes de las excreciones y secreciones larvarias derivadas de estas especies de moscas necrófagas son potencialmente promisorias para el aislamiento y desarrollo de agentes antimicrobianos. En resumen, se demostró que las excreciones y secreciones nativas y las menores de 10 kDa de larvas de las especies *C. vicina* y *S. magellanica*, exhibieron una potente actividad antibacteriana contra tres cepas de *S. aureus* y cuatro bacterias Gram negativas, siendo las excreciones y secreciones menores de 10 kDa más efectivas que las nativas en las dos especies de moscas evaluadas. Las excreciones y secreciones menores de 10 kDa presentaron la misma efectividad, excepto cuando se determinó la  $IC_{50}$  pues se observó que las excreciones y secreciones de la especie *S. magellanica* tenían un amplio espectro de acción, en tanto que las de *C. vicina* tenían un mayor potencial frente a bacterias Gram negativas.

### Agradecimientos

A la profesora Yuly Eilen Bernal, por su apoyo en las pruebas microbiológicas realizadas en la Universidad Antonio Nariño, y 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.

### 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;31:35-9.
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 21<sup>st</sup> 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 ruffiacies* 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 carbapenémicos 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>