

# Infectio

## Asociación Colombiana de Infectología

[www.elsevier.es/infectio](http://www.elsevier.es/infectio)



### ORIGINAL

## Evaluación de la actividad antibacterial de los extractos de cuerpos grasos y hemolinfa derivados de la mosca *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae)



Jennifher Góngora<sup>a</sup>, Andrea Díaz-Roa<sup>a</sup>, María Antonia Gaona<sup>b</sup>,  
Jesús Cortés-Vecino<sup>c</sup> y Felio Bello<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Entomología Médica y Forense, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

<sup>b</sup> Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

<sup>c</sup> Laboratorio de Parasitología Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Recibido el 20 de junio de 2014; aceptado el 18 de septiembre de 2014

Disponible en Internet el 21 de noviembre de 2014

### PALABRAS CLAVE

*Sarconesiopsis magellanica*;  
*Lucilia sericata*;  
Extractos de cuerpos grasos;  
Hemolinfa;  
Actividad antibacterial

### Resumen

**Objetivo:** Evaluar, en condiciones *in vitro*, la actividad antibacterial de los extractos de cuerpos grasos y de la hemolinfa de larvas de tercer estadio de *Sarconesiopsis magellanica*, la cual se comparó con los efectos obtenidos de las mismas sustancias derivadas de *Lucilia sericata*. *S. magellanica* (Diptera: Calliphoridae) es una mosca de importancia principalmente forense, utilizada en la determinación del intervalo *post mortem*. Por sus hábitos necrófagos, es considerada un modelo potencialmente útil en terapia larval.

**Material y métodos:** Se extrajeron los cuerpos grasos de las larvas mediante la técnica de disección corporal y la hemolinfa se obtuvo mediante decapitación y centrifugación de los especímenes larvales. Las bacterias evaluadas fueron *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los métodos utilizados para evaluar la actividad antibacterial fueron difusión en agar y unidades formadoras de colonias (UFC/ml).

**Resultados:** Después de la correspondiente incubación, los resultados generales mostraron que la actividad antibacterial de la hemolinfa y de los cuerpos grasos, tanto de *L. sericata* como de *S. magellanica*, fueron efectivos contra *S. aureus* y *P. aeruginosa* sin diferencias significativas entre las especies de moscas, aunque con algunas diferencias entre las cepas bacterianas.

**Conclusiones:** Los resultados obtenidos sugieren que estas sustancias podrían tener un efecto similar en el tratamiento de heridas infectadas contra los microorganismos evaluados.

© 2014 ACIN. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia: Laboratorio de Entomología Médica y Forense, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Carrera 24 No. 63C-69, Bogotá, Colombia, Teléfono: 57-1-3474570. Extensión 327.

Correo electrónico: [felio.bello@urosario.edu.co](mailto:felio.bello@urosario.edu.co) (F. Bello).

**KEYWORDS**

*Sarconesiopsis magellanica*;  
*Lucilia sericata*;  
 Body fat extracts;  
 Hemolymph;  
 Antibacterial activity

## Assessment of antibacterial activity by fat bodies extracts and hemolymph derived from the blowfly *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae)

**Abstract**

**Objective:** This study aimed to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of fat body and hemolymph extracts from *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) third-instar larvae, compared to the effect obtained using the same extracts but derived from *Lucilia sericata*. *S. magellanica* blowflies are considered important in forensic sciences due to their usefulness in determining the *post mortem* interval. This blowfly could be useful in larval therapy due to its necrophagous habits.

**Materials and methods:** Fat body from larvae was removed by dissection, and hemolymph via decapitation and centrifugation of larval specimens. The antibacterial effect was tested against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* using two methods: agar diffusion and colony forming units (CFU/mL).

**Results:** Hemolymph and fat body extracts derived from both *L. sericata* and *S. magellanica* were effective against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, with no significant differences between blowfly species, although with some differences between the bacterial strains.

**Conclusions:** The results obtained suggest that *S. magellanica* and *L. sericata* fat body and hemolymph extracts might have a similar antimicrobial activity against these microorganisms when used to treat infected wounds.

© 2014 ACIN. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

**Introducción**

*Sarconesiopsis magellanica* (Le Guillou, 1842) (Diptera: Calliphoridae) es una especie necrófaga, de importancia principalmente forense, en razón a que es utilizada en la determinación del intervalo *post mortem*<sup>1</sup>, y podría también tener utilidad médica, al igual que *Lucilia sericata*, debido a que sus larvas ocasionan miasis facultativa, sin causar daño en el tejido vivo, lo cual las hace potencialmente útil para terapia larval. Esta mosca ha sido reportada en Suramérica, en países como Bolivia, Chile, Ecuador, Perú, Colombia<sup>2</sup> y Argentina<sup>3</sup>. En Colombia su distribución ha sido registrada en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Norte de Santander<sup>2</sup>.

La terapia larval recientemente ha atraído la atención de la comunidad científica y médica especializada, debido a que los métodos convencionales para tratar heridas o úlceras de difícil cicatrización tienen una eficacia limitada<sup>4</sup>. Además, las bacterias suelen producir con el tiempo cepas resistentes a los antibióticos que aumentan el riesgo de infecciones recurrentes en las heridas. Por lo tanto, la terapia larval se presenta como una alternativa viable, teniendo en cuenta que esta metodología ha demostrado respuesta favorable en el proceso de curación de heridas crónicas. La acción de las larvas sobre las heridas, durante el tratamiento, ocurre mediante 4 mecanismos fisiológicos estrechamente relacionados, los cuales son: desbridamiento del tejido necrótico<sup>5</sup>, estimulación del tejido de granulación<sup>5,6</sup>, acción antimicrobiana<sup>7-10</sup>, inhibición y erradicación de biopelículas<sup>11-13</sup>.

Algunos estudios han demostrado la efectividad antibacterial mediante evaluación *in vitro* de ciertas sustancias, principalmente péptidos de bajo peso molecular, presentes en las excreciones y secreciones (ES) larvales, que actúan contra bacterias tales como *Staphylococcus aureus*,

*Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus* y *Pseudomonas aeruginosa*<sup>14-18</sup>. También, recientemente demostramos que las ES larvales de *S. magellanica* tienen potente actividad antibacterial<sup>19</sup>.

Por otro lado, la hemolinfa y los cuerpos grasos de *L. sericata*, así como de otras especies de dípteros, han sido estudiados por el contenido de péptidos antimicrobianos (PAM), antivirales y antifúngicos, que hacen parte del mecanismo de defensa inmune y, por lo tanto, también podrían estimular el tejido de granulación<sup>20-22</sup>. Los PAM, secretados en la hemolinfa, son sintetizados en los hemocitos y en otros órganos, tejidos y células tales como la región oral, glándulas salivales, túbulos de Malpighi, intestino medio y células pericardiales de las larvas. Sin embargo, estos se producen en una mayor proporción en el cuerpo graso, que es considerado tejido primordial en la síntesis de las moléculas señaladas<sup>23</sup>. A pesar de los conocimientos anteriores, no hay reportes de trabajos que se hayan efectuado usando extractos de cuerpos grasos y hemolinfa derivados de las larvas de *S. magellanica*, con la finalidad de evaluar la efectividad que podrían tener estas sustancias contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar, por primera vez, la actividad antibacterial de los extractos de cuerpos grasos y de la hemolinfa de las larvas de *S. magellanica* en condiciones *in vitro*, utilizando *S. aureus* y *P. aeruginosa*, la cual se comparó con el efecto antimicrobial de estas mismas sustancias derivadas de *L. sericata*.

**Materiales y métodos****Obtención y desinfección de larvas**

En cada experimento se utilizaron 400 larvas de estadio II de cada una de las especies, *S. magellanica* y *L. sericata*,

tomadas de colonias previamente establecidas en el Laboratorio de Entomología Médica y Forense de la Universidad del Rosario<sup>24,25</sup>. Estas larvas se sumergieron en 4 ml de soluciones mixtas de las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa*, teniendo en cuenta una proporción de 60 larvas por 4 ml de solución bacteriana a una densidad óptica ( $DO_{595}$ ) = 0,5 nm durante una exposición de 30 min, con el fin de potenciar la respuesta inmune de las larvas<sup>26</sup>. Bajo estas condiciones, las larvas se retornaron a las colonias respectivas, separadas al interior de recipientes rotulados para evitar confusión y contaminación con otros especímenes, para que pudieran continuar su desarrollo hasta llegar al estadio III. Posteriormente, estas mismas larvas se desinfectaron mediante lavados con hipoclorito de sodio al 0,5% durante 5 min., luego con formaldehído al 0,5% por igual tiempo, y finalmente se lavaron con agua destilada estéril con antibióticos al 1% (estreptomomicina y penicilina).

### Extracción de cuerpos grasos

Doscientas larvas asépticas, usadas en cada experimento, se congelaron ligeramente mediante exposición a nitrógeno líquido por 10 s, lo que permitió inmovilizarlas para luego, al quedar inmersas en solución tampón fosfato salino (PBS), efectuar la disección de los cuerpos grasos con ayuda de pinzas finas y alfileres entomológicos. Los cuerpos grasos extraídos se almacenaron en tubos Falcon de 15 ml enfriados en hielo; a continuación se homogenizaron en un mortero y el extracto obtenido se centrifugó a 3.900 g a 4 °C durante 50 min. Posteriormente, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m de diámetro (33 mm MILLEX®) y el producto se almacenó a -20 °C para finalmente ser utilizado en la evaluación de la actividad antibacterial<sup>14,17</sup>.

### Extracción de hemolinfa

Para cada experimento se tomaron 200 larvas previamente congeladas mediante el procedimiento anterior, se les removió la parte anterior (piezas bucales) y se colectó la hemolinfa sobre una caja Petri que a su vez se mantuvo en frío (gel refrigerante), luego se almacenó en tubos Eppendorf de 2 ml colocados sobre hielo e inmediatamente se centrifugó a 4.700 g con temperatura de 4 °C durante 40 min., con la finalidad de separar las células y poder colectar el plasma, que correspondió al sobrenadante transparente, el cual se extrajo con una micropipeta y se filtró a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m (33 mm MILLEX®), para finalmente almacenar a -20 °C.<sup>17,21</sup>

### Inóculos bacterianos

Para la obtención de colonias aisladas, las cepas bacterianas *S. aureus* (ATCC 29213) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853) fueron sembradas por agotamiento en medio de cultivo agar Muller Hinton (MH) e incubadas toda la noche a 37 °C. Posteriormente se tomaron 4 colonias morfológicamente similares y se inocularon en 5 ml de caldo Luria Bertani (LB) a 37 °C en constante agitación. Se midió la absorbancia a una densidad óptica (DO) de 595 nm cada hora durante 14 h. Con estos resultados se determinó el tiempo en que las

bacterias alcanzaron su fase exponencial, estableciéndose así el período de incubación requerido para la elaboración de los ensayos antibacteriales.

### Ensayo de difusión en agar

Se obtuvieron 5 colonias aisladas de cada una de las bacterias a ensayar, las cuales previamente fueron sembradas en agar MH e incubadas a 37 °C, luego se inocularon en 5 ml de caldo LB, seguido de centrifugación a 2.000 g durante 20 min, y finalmente se resuspendió en PBS. Posteriormente las bacterias, en una concentración de  $5 \times 10^6$  UFC/ml ( $DO_{595}$  = 0,2), fueron adicionadas, por separado, al medio tripticasa de soya (TSB) bajo en nutrientes, que consistió en: 0,03% TSB, 1% agarosa y 0,02% Tween, el cual se sirvió en cajas de Petri. Una vez solidificado se realizaron pozos de 4 mm de diámetro, donde se adicionaron 10  $\mu$ l de cada una de las sustancias a evaluar a una concentración de 4 mg/ml (extractos de cuerpos grasos y hemolinfa), PBS como control negativo, ciprofloxacino al 35% como control positivo y luego se llevaron a incubación a 37 °C. Después de una hora, se agregó sobre la superficie una capa de TSB agar de alto nutriente (6% TSB, 0,02% Tween y 1% agarosa). Bajo estas condiciones, de nuevo se volvió a incubar por 18 h, y se midieron los diámetros de los halos presentes en los pozos, que fueron expresados en unidades de actividad (UA), cuyos valores se reportaron de acuerdo con la relación establecida previamente por Lozano y Cuca<sup>27</sup> de considerar por cada 0,1 mm de zona clara, generada por la inhibición del crecimiento bacteriano, la correspondencia de 1 UA.

### Ensayo unidades formadoras de colonias (UFC/ml)

A 20  $\mu$ l de las sustancias a evaluar se les agregaron 2  $\mu$ l de la suspensión bacteriana seleccionada ( $DO_{595}$  = 0,2), una alícuota de esta dilución fue incubada a 37 °C y cada muestra fue tomada a las 0, 2, 4 y 6 h, y esparcida en agar MH contenido en cajas Petri, para luego incubar durante 18 h a 37 °C. Al final se realizaron los conteos manuales de las colonias formadas.

### Análisis estadísticos

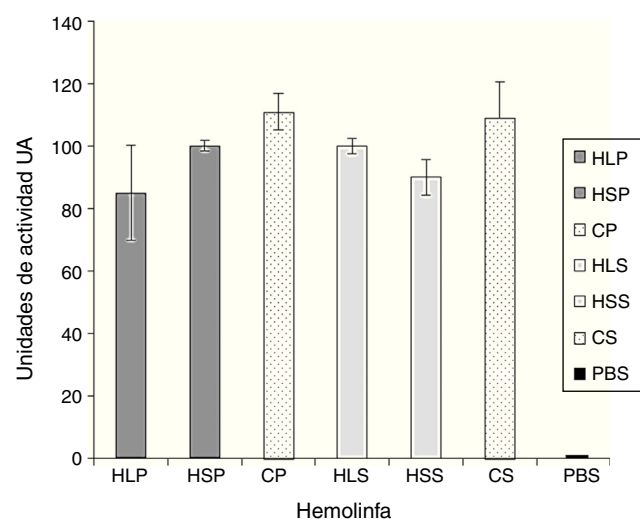
Se realizó la prueba de normalidad por medio del test de Shapiro-Wilk, y con base en los resultados se efectuó la comparación entre múltiples grupos por medio de la prueba Kruskal-Wallis, a continuación se utilizó el test de Tukey, para separar grupos de homogeneidad. También, para complementar los datos de las UFC/ml se realizó un análisis de varianza factorial, usando el programa Statisticx 8.0. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor de p fue < 0,05.

## Resultados

### Difusión en agar

#### Efecto de la hemolinfa de *S. magellanica* sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. aureus*

La determinación de la actividad antibacterial por medio de difusión en agar mostró halos de inhibición de hemolinfa



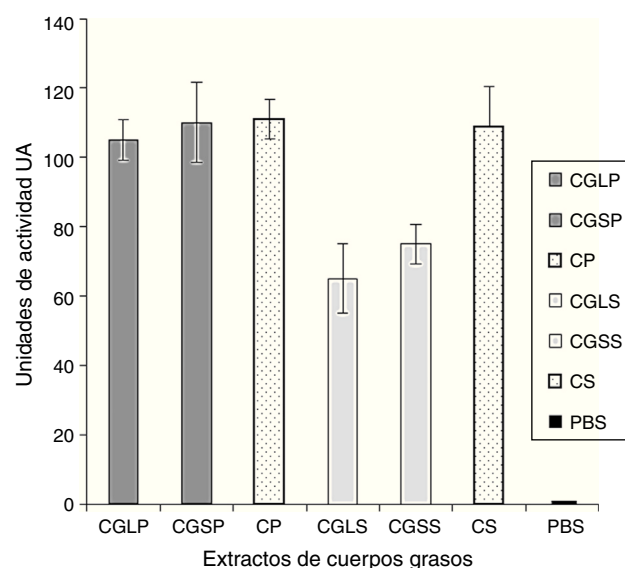
**Figura 1** Áreas de inhibición expresadas como unidades de actividad, evaluadas por el método de difusión en agar, generadas a partir de la incubación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, en presencia de los tratamientos con hemolinfa.

CP: ciprofloxacina contra *P. aeruginosa*; CS: ciprofloxacina contra *S. aureus*; HLP: hemolinfa de *L. sericata* contra *P. aeruginosa*; HLS: hemolinfa de *L. sericata* contra *S. aureus*; HSP: hemolinfa de *S. magellanica* contra *P. aeruginosa*; HSS: hemolinfa *S. magellanica* contra *S. aureus*; PBS: control negativo.

de *S. magellanica* contra *P. aeruginosa*, con diámetros de 10 mm (100 UA) respecto a 8,5 mm (85 UA) evidenciados para esta misma sustancia extraída de *L. sericata*. Por otra parte, la actividad de la hemolinfa contra *S. aureus* fue de 10 mm (100 UA) para la hemolinfa derivada de *L. sericata* y de 9 mm (90 UA) para la extraída de *S. magellanica*. La ciprofloxacina, control positivo, registró un valor de 11 mm (110 UA) contra ambas cepas bacteriana. No hubo halo inhibición (UA = 0) con el control negativo (PBS) (fig. 1). Los valores fueron expresados en UA, teniendo en cuenta que 0,1 mm = 1 UA. En la acción antibacteriana de la hemolinfa no hubo diferencias significativas entre las 2 especies de moscas, en relación con las cepas bacterianas tratadas ( $p=0,8201$ ). Tampoco hubo diferencias al evaluar estas sustancias, individualmente por mosca, contra cada una de las bacterias ( $p=0,63$ ).

#### Efecto de los extractos de cuerpos grasos de *S. magellanica* sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. aureus*

La acción antibacteriana de los cuerpos grasos derivadas de cada una de las especies de moscas resultó efectiva contra ambos tipos de bacterias (fig. 2). Sin embargo, esta acción fue diferente entre las bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus*, mostrando una mayor acción para las primeras (110 UA), en tanto que para *S. aureus* fue de 75 UA; lo anterior se produjo a partir del uso de los extractos de cuerpos grasos de *S. magellanica*. De forma similar, se encontraron diferencias entre las 2 cepas de bacterias cuando se utilizaron los cuerpos grasos derivados de *L. sericata*, teniendo un valor para *P. aeruginosa* de 105 UA, mientras que para *S. aureus* fue de 70 UA. Al igual que con la técnica anterior, el control



**Figura 2** Áreas de inhibición expresadas como unidades de actividad, evaluadas por el método de difusión en agar, generadas a partir de la incubación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, en presencia de los tratamientos con extractos de cuerpos grasos.

CGLP: extractos de cuerpos grasos de *L. sericata* contra *P. aeruginosa*; CGLS: extractos de cuerpos grasos de *L. sericata* contra *S. aureus*; CGSP: extractos de cuerpos grasos de *S. magellanica* contra *P. aeruginosa*; CGSS: extractos de cuerpos grasos de *S. magellanica* contra *S. aureus*; CP: Ciprofloxacina contra *P. aeruginosa*; CS: ciprofloxacina contra *S. aureus*; PBS: control negativo.

positivo y negativo tuvieron el mismo comportamiento; sin embargo, se registraron diferencias significativas ( $p=0,03$ ) entre el antibiótico y el valor de los extractos de cuerpos grasos derivados de ambas moscas, al evaluar la acción contra *S. aureus*. Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre la acción de los extractos de cuerpos grasos, derivados de ambas especies de moscas, sobre las bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus* ( $p=0,70$ ). No obstante, cuando se compararon individualmente los efectos de los cuerpos grasos de cada mosca contra las cepas bacterianas hubo diferencias significativas entre ellas ( $p=0,00$ ), siendo más efectiva la acción sobre la cepa Gram-negativa. Los datos promedios analizados correspondieron a 105 UA contra *P. aeruginosa* vs. 70 UA contra *S. aureus* con los cuerpos grasos de *L. sericata*, y con estas mismas sustancias extraídas de *S. magellanica* los valores fueron 110 UA contra *P. aeruginosa* vs. 75 UA contra *S. aureus*.

#### Unidades formadoras de colonias (UFC)

Esta técnica reveló un comportamiento eficaz de los extractos de cuerpos grasos y hemolinfa, derivados de ambas especies de dípteros, contra las especies de bacterias tratadas, en la medida en que se inhibió el crecimiento bacteriano y no hubo formación de colonias. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la acción de las anteriores sustancias sobre las especies de bacterias ( $p=0,7128$ ). En la tabla 1 se puede evidenciar la disminución

**Tabla 1** Número de unidades formadoras de colonias (UFC), expresadas como Log<sub>10</sub>, de las cepas bacterianas incubadas a las 0, 2, 4 y 6 h con diversos tratamientos

| Bacteria                      | Tratamiento | UFC/ml (Log <sub>10</sub> ) |             |             |             |
|-------------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                               |             | Horas                       |             |             |             |
|                               |             | 0                           | 2           | 4           | 6           |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | HL          | 6,41 ± 0,00                 | 2,28 ± 0,07 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
|                               | HS          | 6,51 ± 0,00                 | 1,90 ± 0,06 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
|                               | CGL         | 6,51 ± 0,00                 | 0,00 ± 0,50 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
|                               | CGS         | 6,37 ± 0,05                 | 1,82 ± 0,05 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
|                               | C           | 6,45 ± 0,04                 | 3,03 ± 0,12 | 1,75 ± 0,31 | 0,00 ± 0,00 |
|                               | PBS         | 6,42 ± 0,03                 | 6,91 ± 0,03 | 7,29 ± 0,04 | 7,48 ± 0,02 |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | HL          | 6,21 ± 0,14                 | 2,56 ± 0,02 | 0,66 ± 0,47 | 0,00 ± 0,00 |
|                               | HS          | 6,44 ± 0,04                 | 2,70 ± 0,03 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
|                               | CGL         | 6,47 ± 0,08                 | 1,70 ± 0,28 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
|                               | CGS         | 6,33 ± 0,05                 | 1,61 ± 0,20 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
|                               | C           | 6,34 ± 0,07                 | 2,45 ± 0,06 | 0,14 ± 0,10 | 0,00 ± 0,00 |
|                               | PBS         | 6,47 ± 0,05                 | 6,46 ± 0,05 | 6,87 ± 0,02 | 7,60 ± 0,03 |

C: antibiótico; CGL: extractos de cuerpos grasos de *L. sericata*; CGS: extractos de cuerpos grasos de *S. magellanica*; HL: hemolinfa de *L. sericata*; HS: hemolinfa de *S. magellanica*; PBS: control negativo.

de las UFC/ml de cada una de las cepas bacterianas evaluadas a las 2 h y una reducción total de las mismas a las 6 h, como consecuencia de los tratamientos con los extractos de cuerpos grasos, hemolinfa y antibiótico de cada una de las especies de moscas. Según lo esperado, no se observó disminución de las UFC/ml con el control negativo. En este experimento tampoco se observaron diferencias significativas entre las 2 especies de moscas evaluadas ( $p = 0,6093$ ).

## Discusión

Las infecciones producidas por *S. aureus* representan una seria preocupación, principalmente a nivel intrahospitalario, debido a que desde la introducción de la meticilina en la práctica clínica se han reportado cepas de esta bacteria que son resistentes, la cual es conocida con la sigla en inglés MRSA<sup>28</sup>. Así mismo, *P. aeruginosa* adquiere resistencia, tanto de manera natural como adquirida, a un gran número de antibióticos, como cefalosporinas de primera y segunda generación, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos, moléculas que tienen la capacidad de tornarse ineficaces en el curso del tratamiento<sup>29</sup>. La amplia distribución de las cepas resistentes a los antibióticos tradicionales ha justificado la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos de carácter natural, a partir de la cual la terapia larval como alternativa cumple un rol importante.

En el presente estudio, con la técnica de difusión en agar, se evidenció que la hemolinfa, derivada de las larvas de las 2 especies evaluadas (*L. sericata* y *S. magellanica*), presentó actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, las cuales son consideradas las más representativas dentro de los grupos clasificados como Gram-positivos y Gram-negativos aerobios, respectivamente; además, estas bacterias son comúnmente aisladas de heridas en pacientes diabéticos<sup>26,30,31</sup>, siendo, por lo tanto, la sustancia evaluada potencialmente de interés terapéutico en esta población de pacientes. Así mismo, con la técnica de difusión en agar

se pudo demostrar la actividad antibacteriana de los extractos de cuerpos grasos de *L. sericata* y *S. magellanica* contra estos microorganismos. A pesar de que en el proceso de evaluación general de la actividad antibacteriana no se registraron diferencias significativas en la acción de los cuerpos grasos entre las moscas seleccionadas, en el análisis estadístico individual de las sustancias derivadas de los insectos contra cada una de las bacterias sí se evidenciaron tales diferencias, siendo más eficiente el efecto antibacteriano contra *P. aeruginosa*. Esta situación coincide con los resultados obtenidos en trabajos previos<sup>32,33</sup> donde se estableció una mayor efectividad de las ES larvales contra *P. aeruginosa* y otras bacterias Gram-negativas, pero a su vez estos hallazgos contrastan con registros efectuados por varios autores quienes reportaron lo contrario, es decir, una acción más eficaz contra microorganismos Gram-positivos<sup>26,34,35</sup>. De acuerdo con Barnes et al.<sup>32</sup>, esta controversia podría ser explicada al considerar diversas variables implicadas en las metodologías usadas para evaluar la acción antibacteriana y en los procesos desarrollados para la extracción de los tejidos empleados.

Por otro lado, usando la técnica de difusión en agar en la evaluación de los extractos de cuerpos grasos de ambas moscas y el antibiótico contra *S. aureus*, se establecieron diferencias significativas entre ellos mostrando mayor halo de inhibición con la ciprofloxacina. Estos resultados no son concluyentes para indicar mayor efectividad del antibiótico contra las cepas bacterianas seleccionadas, teniendo en cuenta que en el presente estudio la ciprofloxacina se tomó como control positivo en una concentración estándar, de acuerdo con un antibiograma previo de susceptibilidad a las bacterias señaladas. Sin embargo, es importante resaltar que las combinaciones sinérgicas entre antibiótico y sustancias derivadas de las larvas pueden incrementar la actividad antibacteriana contra microorganismos aislados o formando biopelículas<sup>36,37</sup>.

En los ensayos realizados mediante la técnica de UFC/ml, al emplear hemolinfa y extractos de cuerpos grasos para

evaluar actividad antibacterial se observó una reducción del número de colonias a las 2 h, para finalmente registrar una ausencia total de las mismas a las 6 h, lo cual permite confirmar la naturaleza bactericida de estas sustancias. Aunque la ciprofloxacina también fue eficaz contra ambas cepas microbianas, la inhibición del crecimiento ocurrió en un tiempo más prolongado (6 h), todo lo cual coincide con el trabajo de Díaz-Roa et al.<sup>19</sup> al utilizar esta misma técnica en la evaluación de la actividad antibacterial de las ES larvales de *S. magellanica*.

En relación con la metodología, es necesario señalar que en nuestro estudio se usaron larvas previamente inmunizadas, que probablemente potenciaron el efecto bactericida, tal como lo reporta Kawabata et al.<sup>26</sup>, quienes sugirieron la producción de péptidos antimicrobianos por parte de larvas inmunizadas, mediante exposición previa a los ensayos de estas a suspensiones bacterianas. Así mismo, en otros trabajos, también usando este tipo de larvas, se pudo generar inmunidad innata y, por consiguiente, la síntesis de péptidos a partir de cuerpos grasos, los cuales fueron luego liberados en la hemolinfa<sup>17,38</sup>.

A pesar de las diferencias obtenidas con las 2 técnicas, son concluyentes los resultados al demostrar actividad antibacterial a partir de las 2 sustancias evaluadas. En algunos estudios previos, en los cuales evaluaron la actividad de las ES larvales de *L. sericata*, se presentaron resultados contradictorios respecto a la duración y potencia de la actividad antibacterial de dichas sustancias, contra microorganismos comunes en heridas, debido a la diferencia de las técnicas de evaluación utilizadas, así como los procesos de obtención de las sustancias y la pureza de las mismas<sup>18,32</sup>.

Son diversas las sustancias antimicrobianas aisladas a partir de la hemolinfa de las larvas de diferentes especies de mosca, como la lucifensina I y II de *L. sericata* y *L. cuprina*, respectivamente, que hacen parte de las familias de las defensinas<sup>17,39</sup>; también se han aislado polipéptidos, en el rango de los 3 kDa, algunos fenoles y lisozimas, que son proteínas de 14 kDa, producidas principalmente por el cuerpo graso y células pericárdicas que luego son secretadas a la hemolinfa en respuesta a la infección por hongos y algunas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Dichas sustancias no solo se encuentran presentes en la hemolinfa, sino también en otros tejidos, tales como cuerpos grasos, glándulas salivales; de igual manera, en las ES larvales han sido reportadas<sup>14,38,40</sup>. Es posible que algunas de estas sustancias, u otras aún no conocidas, se encuentren en los extractos de cuerpos grasos y hemolinfa de *S. magellanica*, razón por la cual sería de gran importancia, en nuevos estudios, poder aislar, purificar y caracterizar éstos componentes.

Los resultados del presente trabajo evidenciaron que tanto la hemolinfa como los extractos de cuerpos grasos de *S. magellanica* y *L. sericata* poseen actividad antibacterial contra las cepas evaluadas, sin diferencias significativas entre las moscas aunque con matices diferentes entre las bacterias, las cuales en su hábitat natural, como una reacción del sistema inmune de sus larvas, actúan controlando los microorganismos presentes en los alimentos que habitualmente consumen mediante digestión extracelular. Sin embargo, es necesario aislar, caracterizar y evaluar los componentes de las sustancias evaluadas, ya que pueden ser valiosos en la búsqueda alternativa de antibióticos naturales que combatan las infecciones bacterianas resistentes, y a su

vez podrían ser útiles en el tratamiento de heridas de difícil cicatrización. Estas sustancias eventualmente se utilizarían directamente o como complemento de los tratamientos de actividad antibacterial ya establecidos, tal como han sido evaluadas, bajo condiciones *in vitro*, en los trabajos previos indicados.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

## Financiación

Colciencias (código: 122252128259, contrato 444) y Universidad del Rosario.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no conocer ningún tipo de conflicto de intereses durante la realización de este trabajo.

## Agradecimientos

A la Fundación Inmunológica de Colombia (FIDIC), doctora Diana Suárez, por el apoyo y la asesoría brindada en el desarrollo de las técnicas de difusión en agar y unidades formadoras de colonias (UFC).

## Bibliografía

1. Pinilla T, Segura N, Bello F. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in Bogotá, Colombia. *Neotrop Entomol.* 2012;41:237–42.
2. Pape T, Wolff M, Amat E. Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófagidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana.* 2004;5:201–8.
3. Mariluís J, Mulieri P. The distribution of the Calliphoridae in Argentina (Diptera). *Rev Soc Entomol Argent.* 2003;62:85–97.
4. Zarchi K, Jemec GBE. The efficacy of maggot debridement therapy — a review of comparative clinical trials. *Int Wound J.* 2012;1:9.
5. Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Harris PD, Phillips D, Hall M, et al. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *Brit J Dermatol.* 2003;148:14–23.
6. Prete PM. Grow effects of *Phaenicia sericata* larval extract on fibroblasts: Mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sci.* 1997;60:505–10.
7. 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.
8. 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.* 2001;38:161–6.
  9. Nigam Y, Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe NA. Maggot therapy: The science and implication for CAM part II — maggots combat infection. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006;3:303–8.
  10. Robinson W, Norwood VH. The role of surgical maggots in the disinfection of osteomyelitis and other infected wounds. *J Bone Joint Surg Am.* 1933;15:409–12.
  11. Cazander G, van Veen KE, Bernards AT, Jukema GN. Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. *J Tissue Viability.* 2009;18:80–7.
  12. Gottrup F, Jorgensen B. Maggot debridement: An alternative method for debridement. *Eplasty.* 2011;11:290–302.
  13. Van der Plas MJ, Jukema GN, Wai SW, Dogterom-Ballering HC, Lagendijk EL, 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.
  14. Huberman I, Gollop N, Mumcuoglu K, Breuer E, Bhusare S, Shai Y, et al. Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol.* 2007;21:127–31.
  15. Kerridge A, Lappin-scott H, Stevens J. Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol.* 2005;19:333–7.
  16. Jaklic D, Lapanje A, Zupancic K, Smrke D, Gunde N. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J Med Microbiol.* 2008;57:617–25.
  17. Cеровsky V, Zdarek J, Fucik V, Monincova I, Voburka V, Bem R. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol Life Sci.* 2009;67:455–66.
  18. Cazander G, van de Veerdonk M, Vandenbroucke-Grauls C, Schreurs C, Jukema C. Maggot excretions inhibit biofilm formation on biomaterials. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468:2789–96.
  19. 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.
  20. Chernysh S, Kim S, Bekker G, Pleskach V, Filatova N, Anikin V, et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. *PNAS.* 2002;99:12628–32.
  21. Ping F, Jianwei W, Guo G. Purification and molecular identification of an antifungal peptide from the hemolymph of *Musca domestica* (housefly). *Cell Mol Immunol.* 2009;6:245–51.
  22. Prete P. Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: Mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sci.* 1997;60:505–10.
  23. Valadéz J. Modulación de la inmunidad innata del lepidóptero plaga *Trichoplusia ni* (Hübner) expuesto a *Bacillus thuringiensis* [tesis doctoral]. Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2011.
  24. Rueda L, Ortega L, Segura A, Acero V, Bello F. *Lucilia sericata* strain from Colombia: Experimental colonization, life tables and evaluation of two artificial diets of the blowfly *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae), Bogotá, Colombia. *Strain Biol Res.* 2010;43:197–203.
  25. Pinilla YT, Patarroyo MA, Bello FJ. *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) lifecycle, reproductive and population parameters using different diets under laboratory conditions. *Forensic Sci Int.* 2013;233:380–6.
  26. 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.
  27. Lozano JM, Cuca L. Propiedades antimicrobianas *in vitro* de metabolitos secundarios aislados de *Peltostigma guatemalense*, una especie colombiana de Rutáceas contra el parásito *Plasmodium falciparum* y contra cepas bacterianas. *Rev Colomb Cienc Quím Farm.* 2008;37:164–76.
  28. Gil M. *Staphylococcus aureus*. Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Rev Chil Infect.* 2000;17:145–52.
  29. Gomez C, Leal A, Perez M, Navarrete M. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. *Rev Fac Med Unal.* 2005;53:27–34.
  30. El-Tahawy A. Bacteriology of diabetic foot infections. *Saudi Med J.* 2000;21:344–7.
  31. Abdulrazak A, Bitar Z, al-Shamall A, Mobasher L. Bacteriological study of diabetic foot infections. *J Diabetes Complications.* 2005;19:138–41.
  32. Barnes K, Dixon R, Gennard D. The antibacterial potency of the medicinal maggot, *Lucilia sericata* (Meigen) variation in laboratory evaluation. *J Microbiol Method.* 2010;82:234–7.
  33. Teh CH, Nazni WA, Lee HL, Fairuz A, Tan SB, Sofian-Azirun M. In vitro antibacterial activity and physicochemical properties of a crude methanol extract of the larvae of the blow fly *Lucilia cuprina*. *Med Vet Entomol.* 2013;27:414–20.
  34. Bowling FL, Salgami EV, Boulton AJ. Larval therapy: A novel treatment in eliminating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from diabetic foot ulcers. *Diabetes Care.* 2007;30:370–1.
  35. Thomas S, Andrews A, Hay N, Bourgoise S. The anti-microbial activity of maggot secretions: Results of a preliminary study. *J Tissue Viability.* 1999;9:127–32.
  36. Arora S, Baptista C, Lim CS. Maggot metabolites and their combinatory effects with antibiotic on *Staphylococcus aureus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2011;10:6.
  37. Van der Plas MJ, Dambrot C, Dogterom-Ballering HC, Kruit-hof 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.
  38. Kruglikova A. Antimicrobial components of haemolymph and excretion of larvae *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera Calliphoridae). *J Evol Biochem Physiol.* 2011;47:534–42.
  39. El Shazely B, Veverka V, Fucik V, Voburka Z, Zdarek J, Cеровský V. Lucifensin II, a defensin of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol.* 2013;50:571–8.
  40. Lambert J, Keppi E, Dimarcq J, Wicker C, Reichhart R, Dunbar B, et al. Insect immunity: Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc Natl Acad Sci.* 1989;86:262–6.