

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA FRENTE A CEPAS DE *Campylobacter* MÚLTIRERESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Silván, J. M.¹, Zorraquín-Peña, I.², Gonzalez de Llano, D.², Moreno-Arribas, M. V.², Martínez-Rodríguez, A. J.¹

¹ Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM), Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, Grupo de Microbiología y Biotecnología de Alimentos. C/ Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid.

² Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM), Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, Grupo de Biotecnología Enológica Aplicada. C/ Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid.



Introducción

La campilobacteriosis es la principal causa de enfermedad diarreica bacteriana asociada a los alimentos [1]. La resistencia de *Campylobacter* a los antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública, por lo que existe gran interés en desarrollar nuevas estrategias que permitan reducir el impacto que tiene este patógeno en la salud humana [2]. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia antibacteriana de nanopartículas de plata estabilizadas con glutatión (NPs Ag-GSH) frente a diferentes cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* multiresistentes a antibióticos aisladas de la cadena alimentaria de la carne de pollo y de pacientes hospitalarios.

Materiales y Métodos

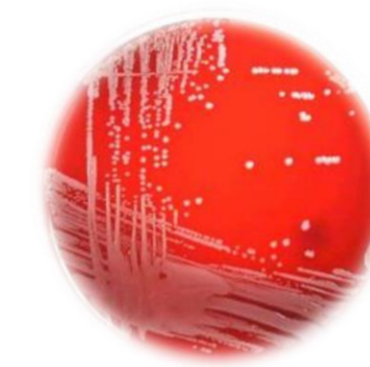
Actividad antibacteriana

1) Obtención de los inóculos bacterianos:

- Siembra en medio Müller Hinton Sangre 5% (MHS)
- Incubación a 42°C en condiciones de microaerofilia (VAIN)
- Inoculo líquido en Brucella Broth (BB)
- Incubación 24 h a 42°C, 130 rpm en microaerofilia (VAIN)
- Uso del inóculo bacteriano en fase estacionaria

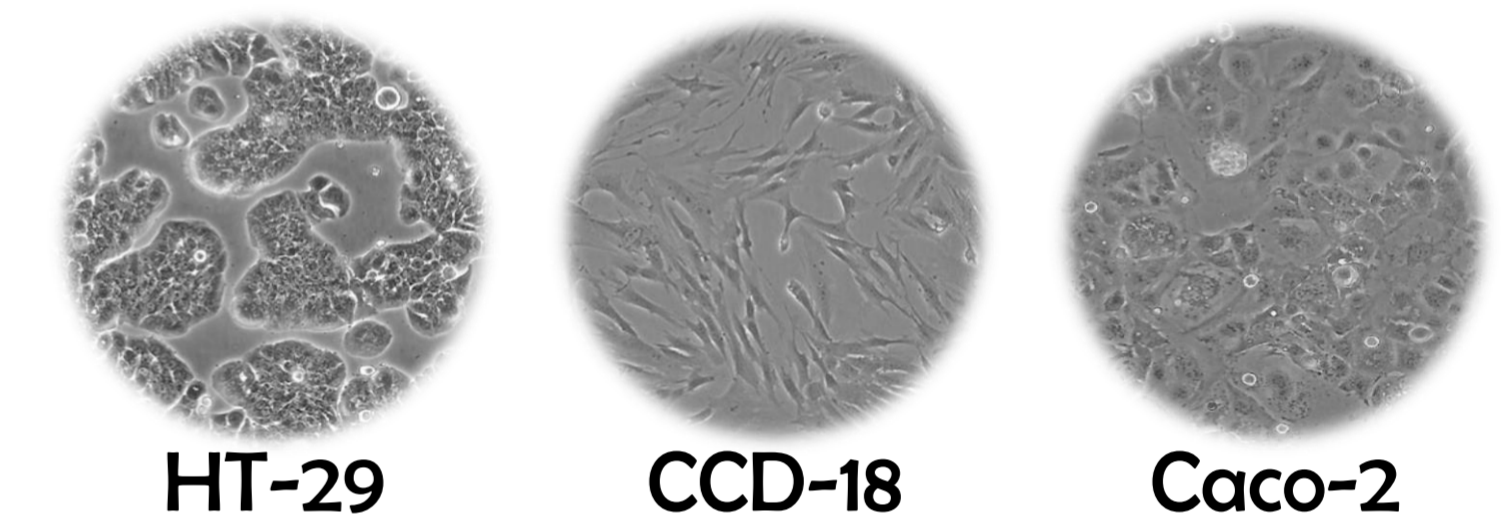
2) Ensayo de la actividad antibacteriana:

- Mezcla del ensayo:
 - 4 mL medio BB
 - 1 mL diferentes concentraciones de NPs Ag-GSH
 - 50 µL cultivo bacteriano en fase estacionaria
- Incubación 24 h, agitación 130 rpm, 42°C en microaerofilia (VAIN)
- Diluciones decimales y siembra en MHS
- Incubación 48 h en microaerofilia (VAIN)
- Recuento de UFC/mL
- Cálculo de CMI y CMB



Viabilidad celular

Líneas celulares intestinales humanas usadas:



Estimación de la viabilidad celular por el método colorimétrico del MTT:

- Siembra celular ~5x10⁴ células/pocillo en placas de 96 pocillos
- Incubación 24 h a 37°C y 5% CO₂ (confluencia celular ~70%)
- Incubación celular con diferentes concentraciones de NPs Ag-GSH durante 24 h a 37°C y 5% CO₂
- Lavado celular con PBS
- Incubación 1 h con solución de MTT (5 mg/mL)
- Revelado colorimétrico con DMSO
- Cálculo de la viabilidad celular respecto al control no tratado

Resultados

Actividad antibacteriana

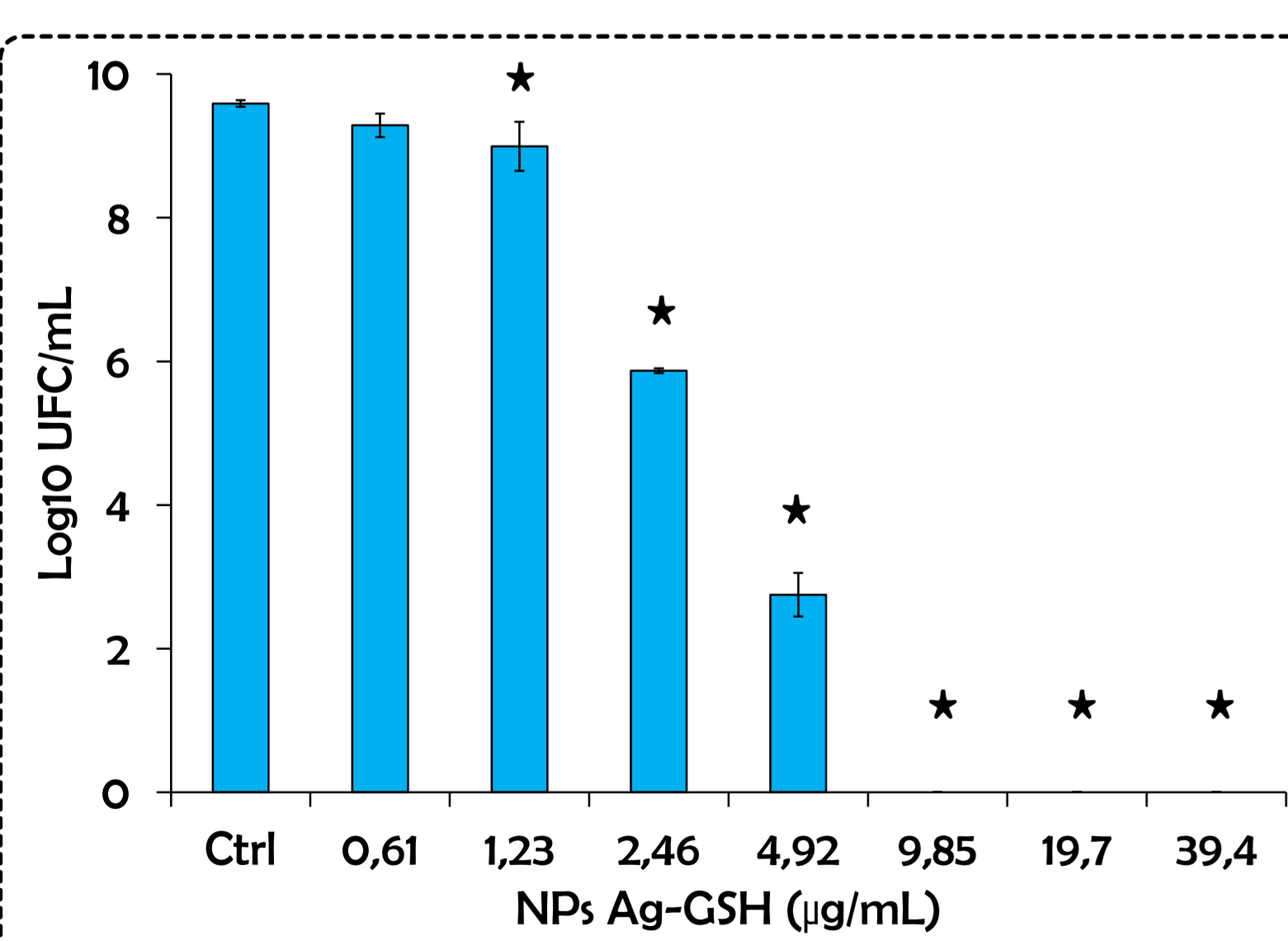


Figura 1. Actividad antibacteriana de las NPs Ag-GSH a diferentes concentraciones frente a la cepa de referencia *C. jejuni* 11168 tras 24 h de incubación. Los resultados representan la media ± desviación estándar del Log₁₀ UFC/mL (n=3). Las barras con asterisco indican diferencias significativas (p<0,05) respecto al control de crecimiento (bacterias sin tratar con NPs) obtenidas mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Dunnett para múltiples comparaciones.

Tabla 1. Actividad antibacteriana de las NPs Ag-GSH frente a cepas multiresistentes de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de la cadena alimentaria (CA) y de pacientes hospitalarios (H).

CA	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	H	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
CA1	19,7	19,7	H1	9,85	19,7
CA2	9,85	9,85	H2	19,7	39,4
CA3	9,85	9,85	H3	9,85	39,4
CA4	9,85	9,85	H4	19,7	19,7
CA5	39,4	39,4	H5	19,7	19,7
CA6	4,92	9,85	H6	9,85	19,7
CA7	4,92	9,85	H7	9,85	19,7
CA8	9,85	19,7	H8	19,7	19,7
CA9	19,7	19,7	H9	19,7	19,7
CA10	19,7	19,7	H10	19,7	19,7
CA11	39,4	39,4	H11	19,7	39,4
CA12	19,7	39,4	H12	19,7	19,7
CA13	19,7	39,4	H13	19,7	19,7
CA14	19,7	39,4	H14	19,7	39,4
CA15	19,7	39,4	H15	19,7	19,7
CA16	19,7	19,7	H16	19,7	39,4
CA17	19,7	39,4	H17	39,4	39,4
CA18	19,7	19,7	H18	39,4	39,4
CA19	9,85	19,7	H19	19,7	39,4
CA20	19,7	39,4	H20	39,4	39,4

CMI, concentración mínima inhibitoria; CMB, concentración mínima bactericida; CMI₅₀, CMI que inhibe el 50% de las cepas; CMI₉₀, CMI que inhibe el 90% de las cepas. CMI₅₀ = 19,7 µg/mL; CMI₉₀ = 39,4 µg/mL.

Viabilidad celular

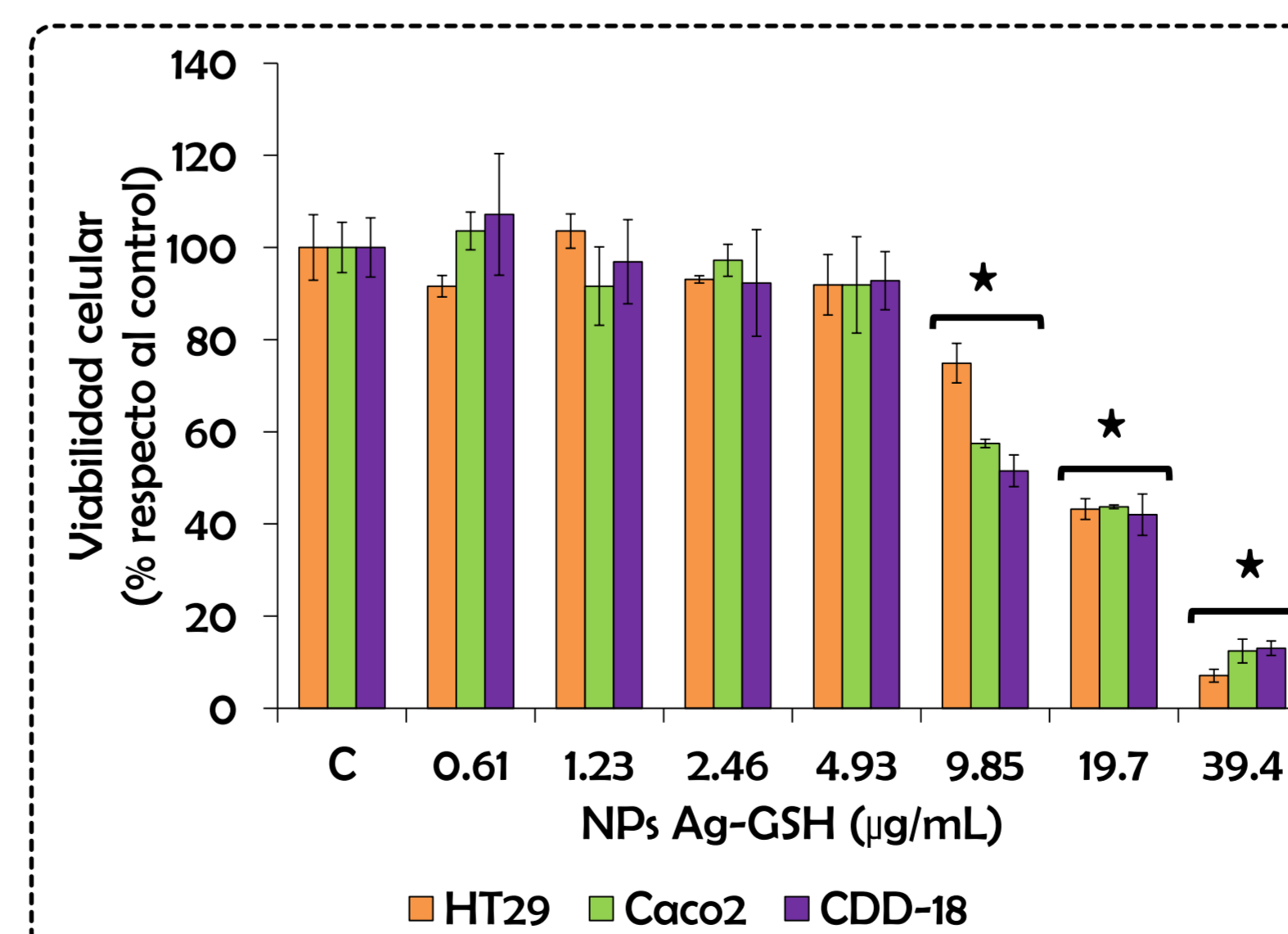


Figura 2. Efectos de las NPs Ag-GSH en la viabilidad de células intestinales humanas HT-29, Caco-2 y CCD-18. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad respecto del control celular sin tratar y se representan por la media ± desviación estándar (n=3). Las barras con asterisco indican diferencias significativas (p<0,05) respecto a su correspondiente grupo de control obtenidas mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Dunnett para múltiples comparaciones.

Conclusiones

- Las NPs Ag-GSH utilizadas en el presente trabajo fueron altamente efectivas para inhibir el crecimiento de diferentes cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de la cadena alimentaria de la carne de pollo y de pacientes hospitalarios.
- Las concentraciones mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB) se situaron en el rango de 4,92 a 39,4 µg/mL y de 9,85 a 39,4 µg/mL, respectivamente.
- Las cepas aisladas de la cadena alimentaria mostraron mayor susceptibilidad a las NPs (CMB 9,85 a 19,7 µg/mL para el 60% de las cepas) que las cepas clínicas (CMB 19,7 a 39,4 µg/mL para el 100% de las cepas), lo que sugiere que las cepas clínicas resisten mejor la acción de las NPs.
- La exposición de células intestinales humanas a las NPs Ag-GSH mostró cierto efecto citotóxico, el cual fue dependiente de la concentración utilizada en todas las líneas celulares en el rango de 9,85 a 39,4 µg/mL.
- Más del 60% de las cepas utilizadas en este estudio fueron susceptibles a concentraciones de NPs ≤9,85 µg/mL, indicando que el efecto antibacteriano podría alcanzarse a concentraciones sin potencial efecto citotóxico.
- Estos resultados sugieren el empleo de NPs Ag-GSH como una potencial alternativa para el control del patógeno alimentario *Campylobacter* en diferentes lugares de la cadena alimentaria, o como una prometedora alternativa al uso de los desinfectantes químicos actuales utilizados para el control de la formación de biofilms de *Campylobacter*.

Bibliografía

- [1] Ganan, M., Silván, J. M., Carrascosa, A. V., and Martínez-Rodríguez, A. J. *Food Control*, 2012, 24: 6–14.
 [2] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. *EFSA Journal*, 2017, 15: 4694.