

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA DURANTE EL PROCESO INFECCIOSO DE *Listeria monocytogenes* EN EL MODELO ANIMAL *Galleria mellonella*.



Muchas GRACIAS 🍀

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA DURANTE EL PROCESO INFECCIOSO DE *Listeria monocytogenes* EN EL MODELO ANIMAL *Galleria mellonella*.



A collage of presentation slides from a Prezi presentation. The slides are arranged in a curved path, showing various sections of a research paper. The visible sections include: 'INTRODUCCIÓN' with a diagram of a fly; 'OBJETIVOS' with a list of goals; 'METODOLOGÍA' with a flowchart; 'CONCLUSIONES' with a summary of findings; and 'MUCHAS GRACIAS' with a thumbs up icon. The slides are overlaid on a background of blue and white wavy lines with a dot pattern.



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA DURANTE EL PROCESO INFECCIOSO DE *Listeria monocytogenes* EN EL MODELO ANIMAL *Galleria mellonella*.

ANGELA LORENA CANTOR ORTÍZ
BIVIANA PAOLA CADENA SANCHEZ

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD BACTERIOLOGÍA Y
LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C
2019

INTRODUCCIÓN

1



<http://etasalmonella.blogspot.com/2015/11/la-listeriosis-es-una-infeccion.html>

2



<http://fundacionio.org/viajar/enfermedades/resistencia%20antibioticos.html>

3



Cortesía: Autoras



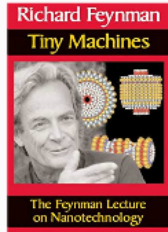
¿Las NPs Ag controlan el proceso de infección de *Listeria monocytogenes* en *Galleria mellonella*?

ANTECEDENTES



Murray y Col.
1926

Feynman R.
1959

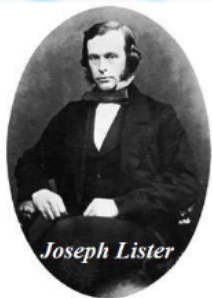
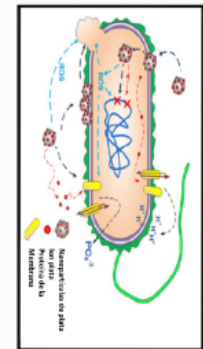


Determination of MIC value of antibiotics and AgNPs

Bacterial species	Amp	Chl	Ery	Gen	Tet	Van	AgNPs
<i>P. aeruginosa</i>	1.0	2.0	1.0	1.0	1.5	3.0	0.59
<i>S. flexneri</i>	1.0	2.0	1.0	1.0	1.5	3.0	0.60
<i>S. aureus</i>	2.0	4.0	2.0	2.0	3.0	2.0	0.75
<i>S. pneumoniae</i>	2.0	4.0	2.0	2.0	3.0	2.0	0.76

Gurunathan y Col.
2014

Markowska y
Col.
2018



Murray y Col.
1957

Pascale Cossart
1980

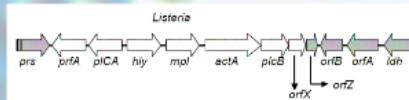


Figura 1: Organización transcripcional y física del grupo de genes de virulencia (LPI-1) de *Listeria monocytogenes*. Modificado de: (Vázquez-Boland 2007b).

Martinez y Col.
2017



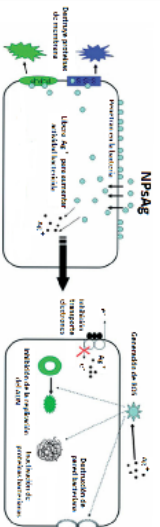
MARCO TEÓRICO

Galleria mellonella



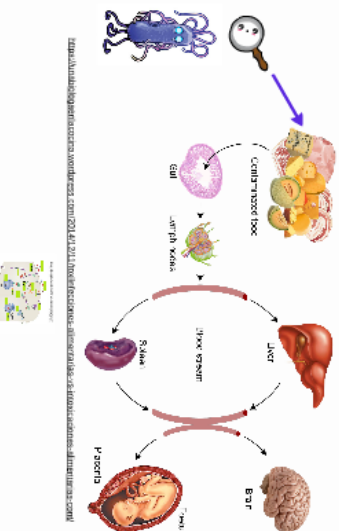
Conifis Auraria

Nanopartículas de Plata

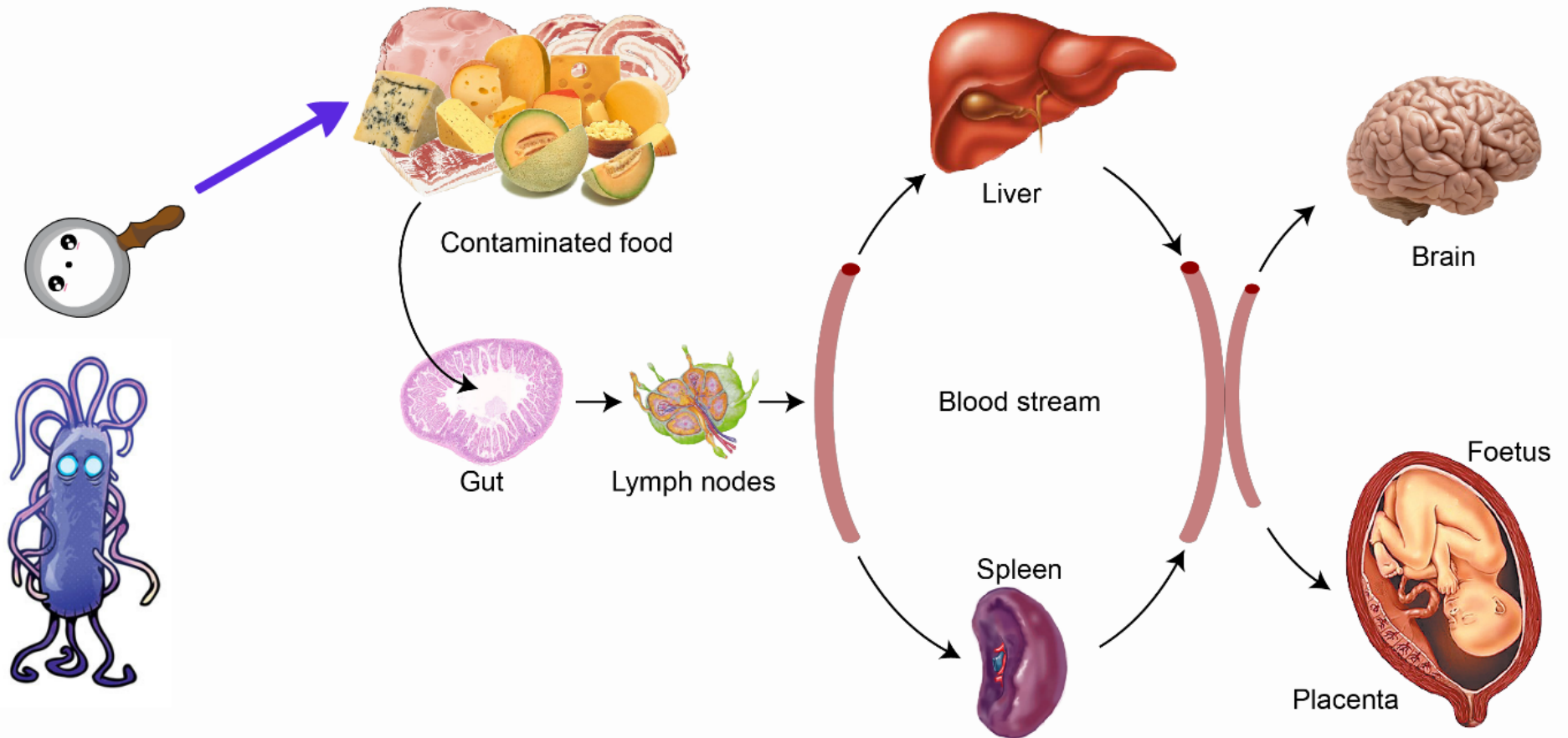


<https://repositorio.furcad.edu.co/index.php/revista/index/view/1077/900>

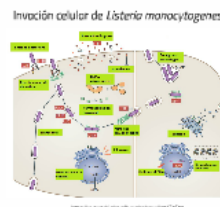
Listeria monocytogenes



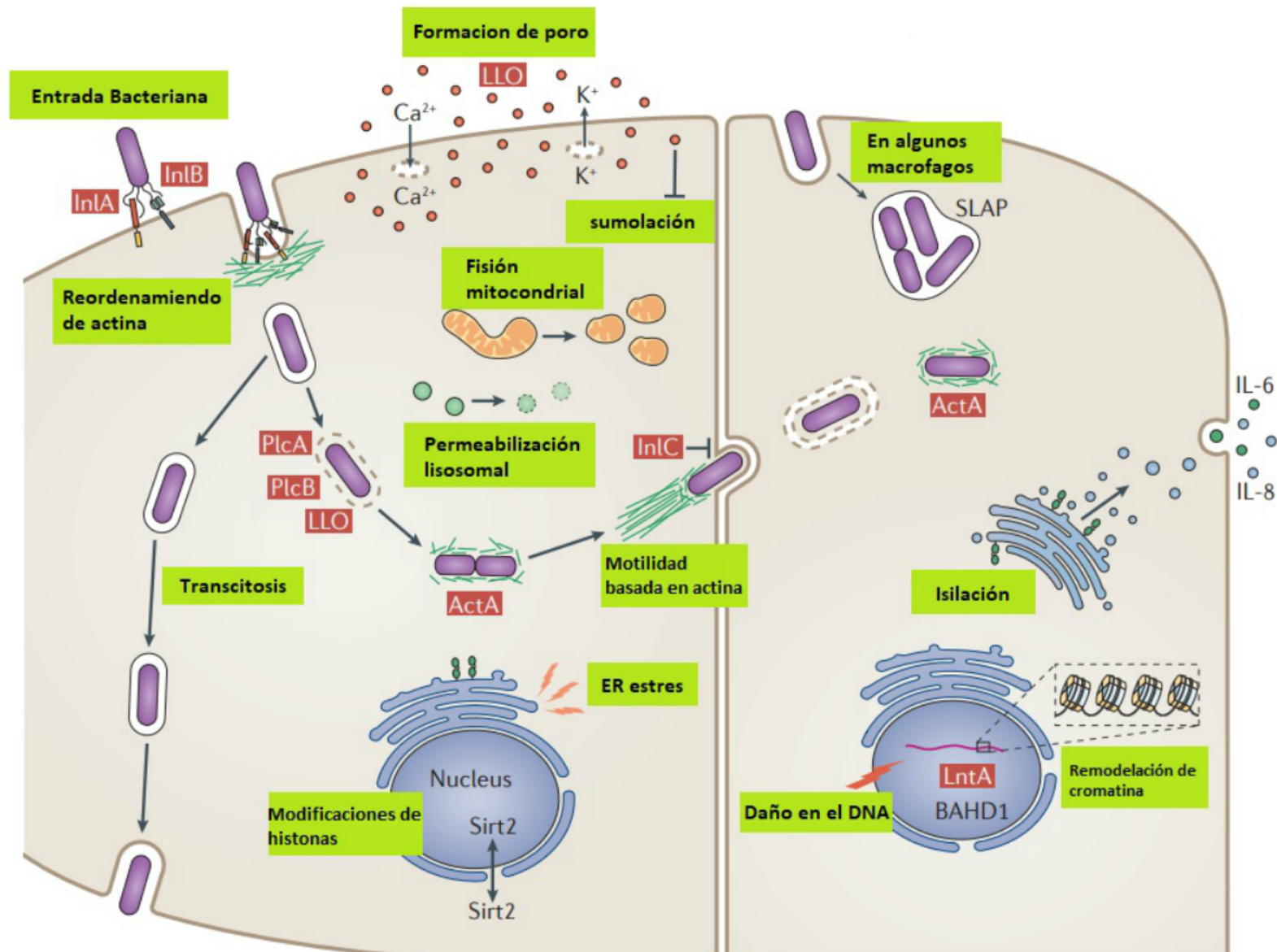
Listeria monocytogenes



<https://unabiologaenlacocina.wordpress.com/2014/12/11/toxiinfecciones-alimentarias-vs-intoxicaciones-alimentarias-cont/>



Invación celular de *Listeria monocytogenes*

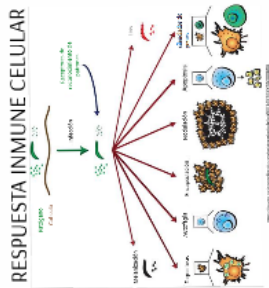


Galleria mellonella

1



[https://www.biodiversidadvirtual.org/insectarium/Galleria-mellonella-\(Linnaeus-1758\)-img1036862.html?sessionid=g3fnh7a33ct7vsk47l8vkv4js4](https://www.biodiversidadvirtual.org/insectarium/Galleria-mellonella-(Linnaeus-1758)-img1036862.html?sessionid=g3fnh7a33ct7vsk47l8vkv4js4)

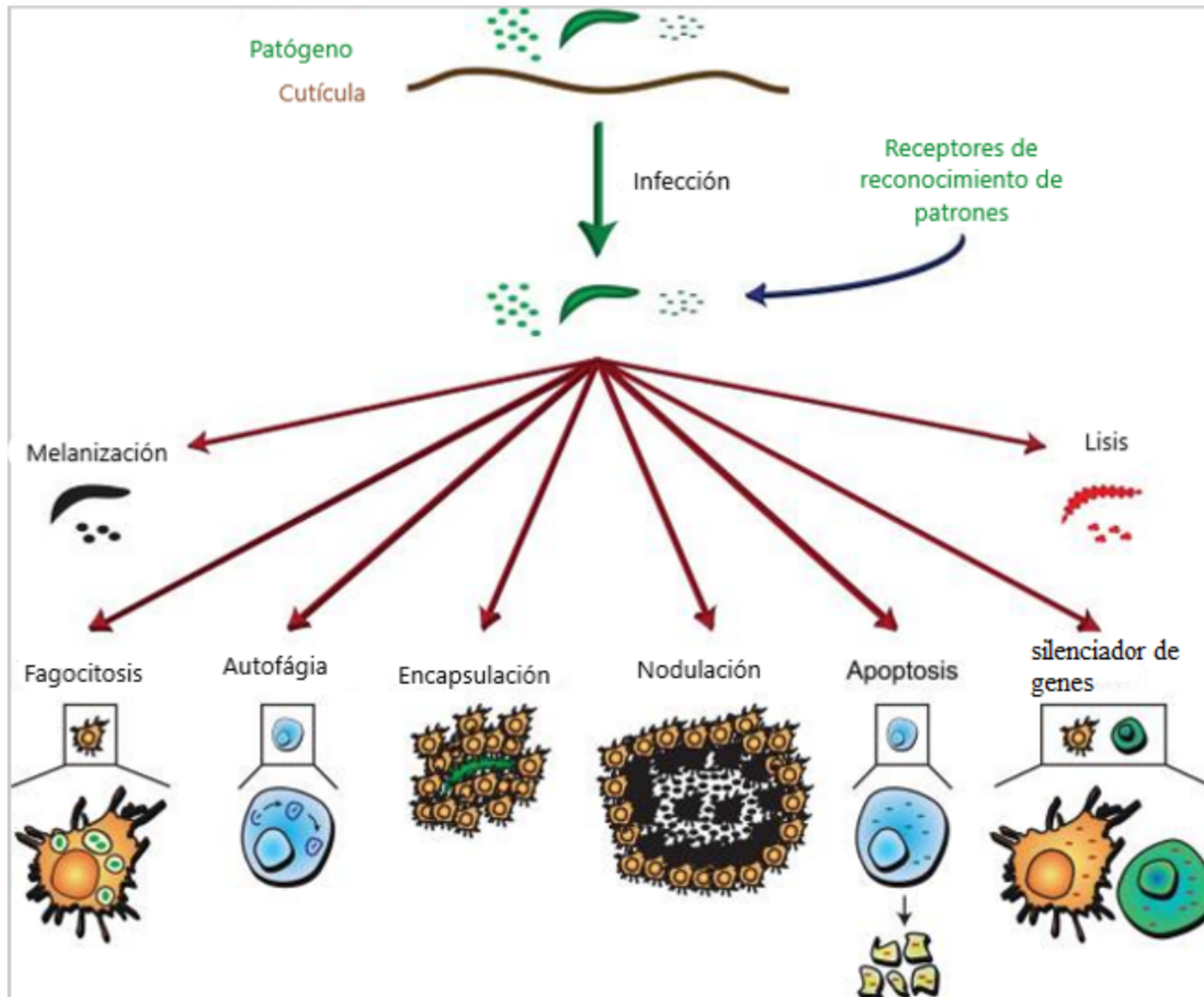


2

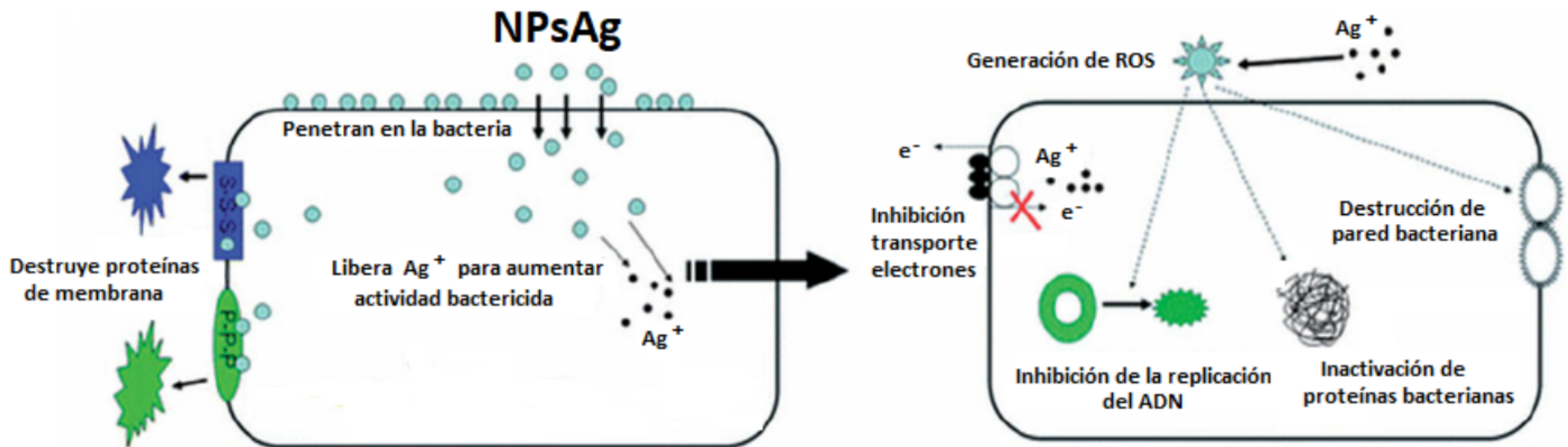


Cortesía: Autoras

RESPUESTA INMUNE CELULAR



Nanopartículas de Plata



<https://revistas.fucsalud.edu.co/index.php/repertorio/article/view/871/900>

OBJETIVOS

Evaluar el papel de nanopartículas de plata (NPs Ag) frente a la infección de *Listeria monocytogenes* en *Galleria mellonella*.

- Determinar la DL50 adecuada para la infección de *Galleria mellonella* con la bacteria *Listeria monocytogenes*.
- Evaluar el proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes* en *Galleria mellonella*.
- Estudiar el tratamiento del proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes* en *Galleria mellonella* con NPs Ag.
- Comparar la respuesta inmune de *Galleria mellonella* previamente inoculada con nanopartículas de plata y *Listeria monocytogenes*.

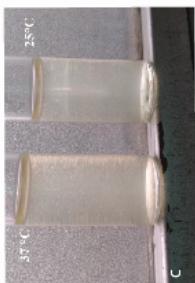
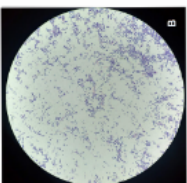
- Determinar la DL50 adecuada para la infección de *Galleria mellonella* con la bacteria *Listeria monocytogenes*.
- Evaluar el proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes* en *Galleria mellonella*.
- Estudiar el tratamiento del proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes* en *Galleria mellonella* con NPs Ag.
- Comparar la respuesta inmune de *Galleria mellonella* previamente inoculada con nanopartículas de plata y *Listeria monocytogenes*.

METODOLOGÍA

Población

ATCC 7644
Clínica

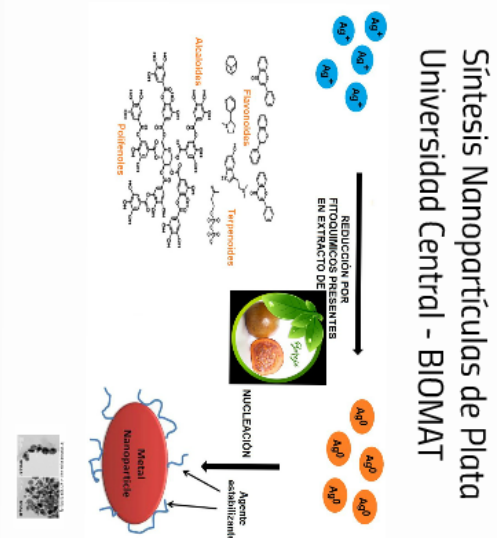
Listeria monocytogenes



Larvas

Parámetro	Criterio
Estadio	Última fase larvaria
Peso	180 a 200 mg
Tamaño	2.0 a 3.0 cm de largo
Salud	No deben presentar estado de letargo o que estén sin movimiento. No deben tener pigmentación que indiquen proceso de melanización. Se descartan aquellas que tengan signos de pupación.

Total de larvas usadas: 570



Larvas

Parámetro	Criterio
Estadio	Última fase larvaria
Peso	180 a 200 mg
Tamaño	2.0 a 3.0 cm de largo
Salud	No deben presentar estado de letargo o que estén sin movimiento. No deben tener pigmentación que indiquen proceso de melanización. Se descartan aquellas que tengan signos de pupación.

Total de larvas usadas: 570



Inoculación de larvas (Paez y Col. 2017)



Paez N, Villamarín L. Influencia de las nanopartículas de plata en los procesos infeccioso de *Candida albicans* en *Galleria mellonella*. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2017.

Seguimiento de larvas de *Galleria mellonella* (Loh JM 2013)

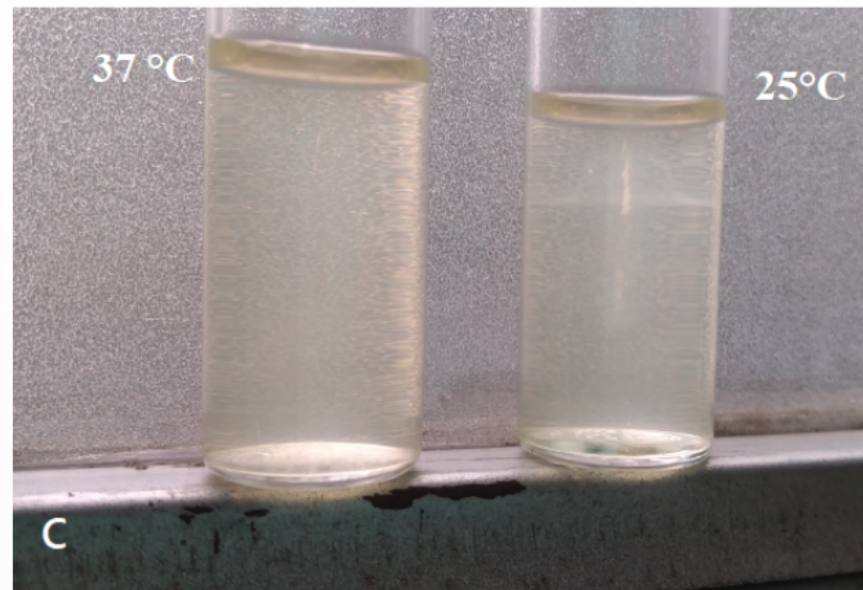
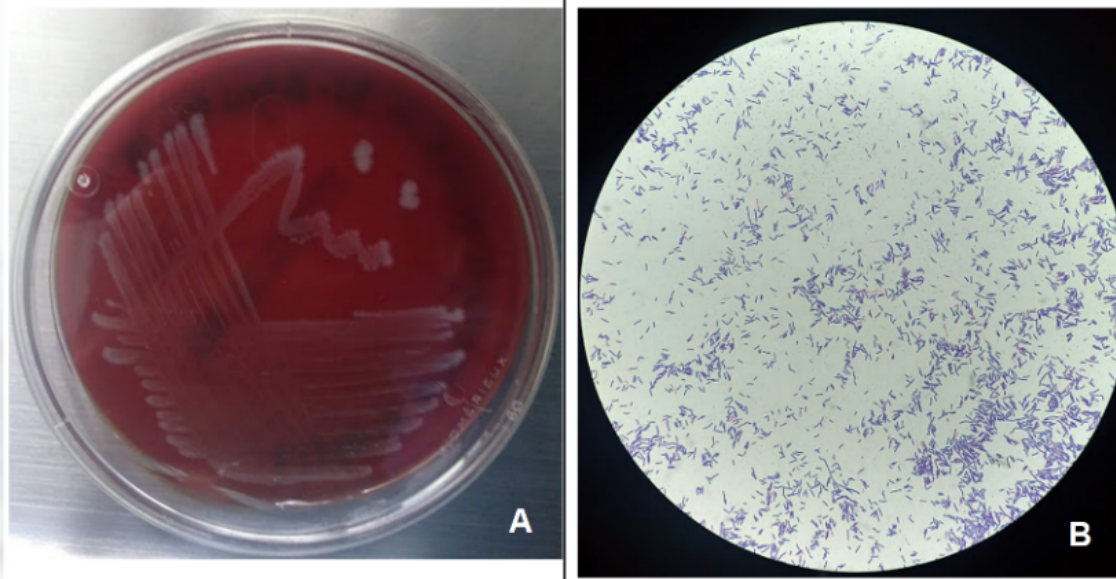
CATEGORIA	DESCRIPCIÓN	PUNTAJE
Actividad	Ninguna actividad	0
	Actividad mínima con estimulación	1
	Activo cuando es estimulada	2
	Activo sin estimulación	3
Formación de capullo	Sin capullo	0
	Capullo parcial	0.5
	Capullo lleno	1
Melanización	Melanización completa (negro)	0
	Manchas oscuras en gusano de cera marrón	0
	>3 manchas en el gusano de cera beige	2
	<3 manchas en el gusano de cera beige	3
	Sin melanización	4
Sobrevivencia	Muertas	0
	Vivas	2

Loh JM, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*. 2013;4(5):419-28.

Listeria monocytogenes

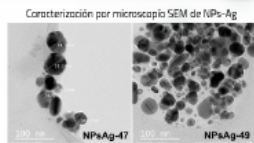
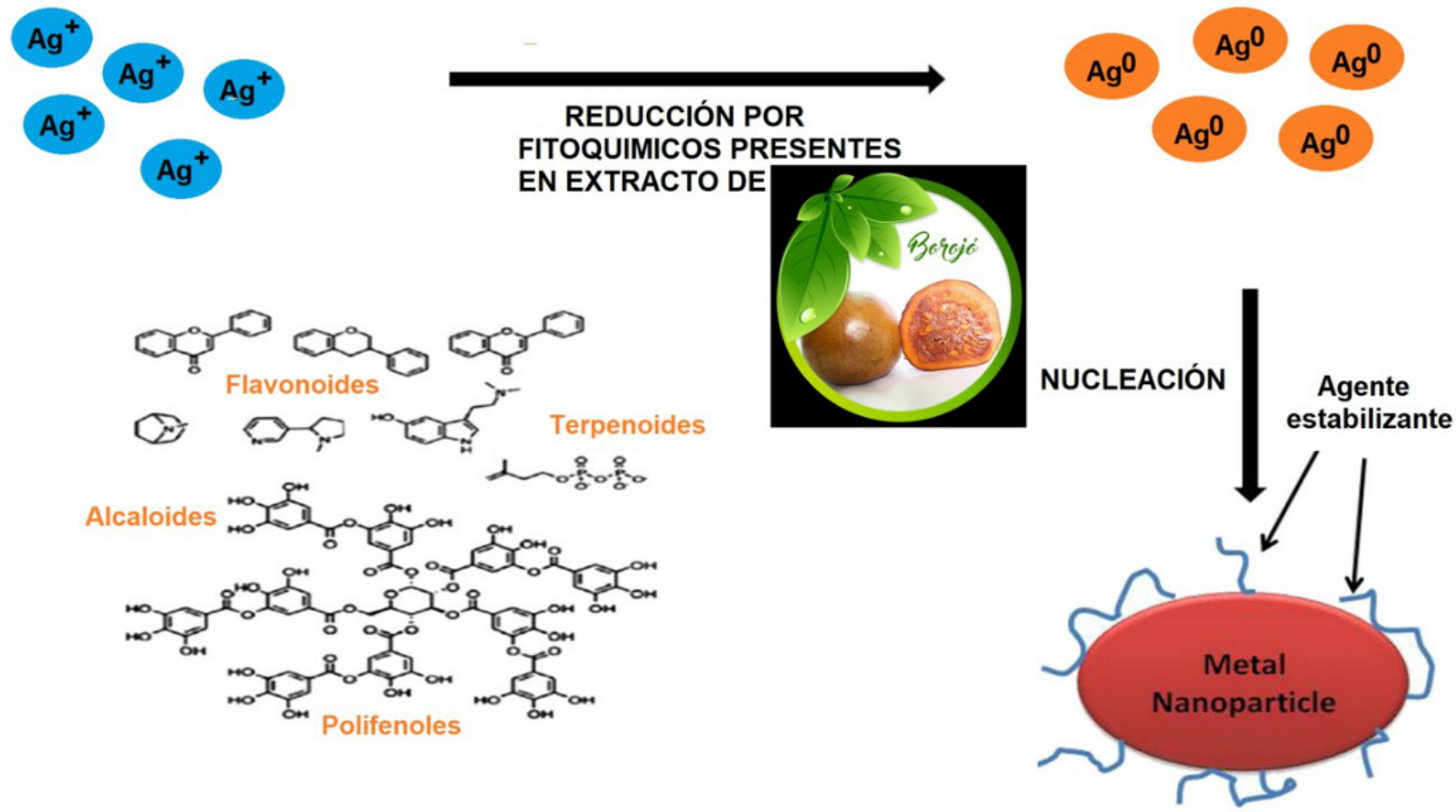
ATCC 7644

Clínica

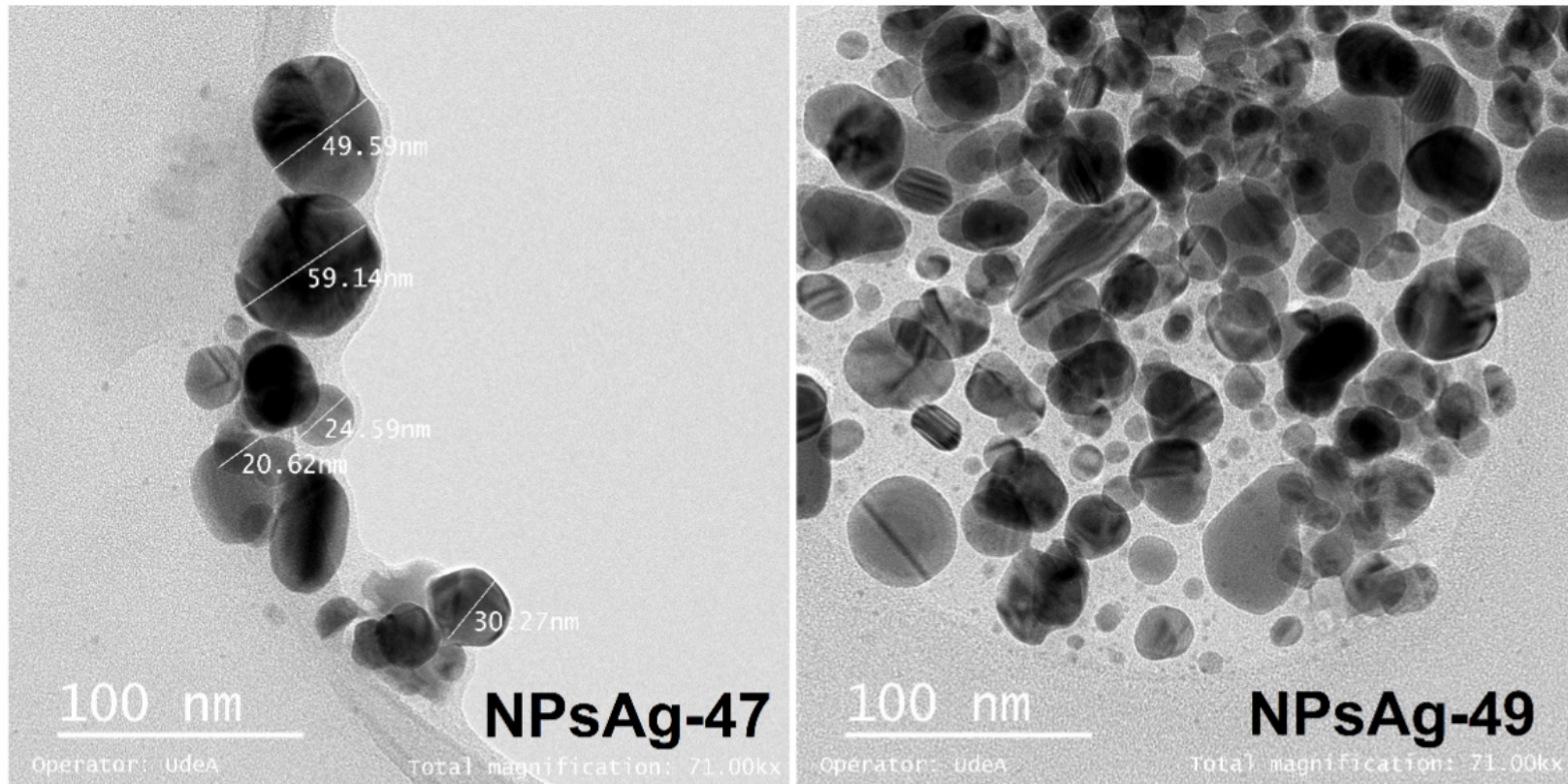


Síntesis Nanopartículas de Plata

Universidad Central - BIOMAT



Caracterización por microscopía SEM de NPs-Ag



FASE 1: DETERMINACIÓN DE LA DÓISIS LETAL 50 (DL50) *Listeria monocytogenes* EN LARVAS DE *Galleria mellonella*

GRUPO	CONCENTRACIÓN	LARVAS
1	1.5×10^8 UFC/mL	20
2	1.5×10^7 UFC/mL	20
3	1.5×10^6 UFC/mL	20
4	1.5×10^5 UFC/mL	20
5	1.5×10^4 UFC/mL	20
Control 1	Sin inocular	20
Control 2	10 μ L PBS	20

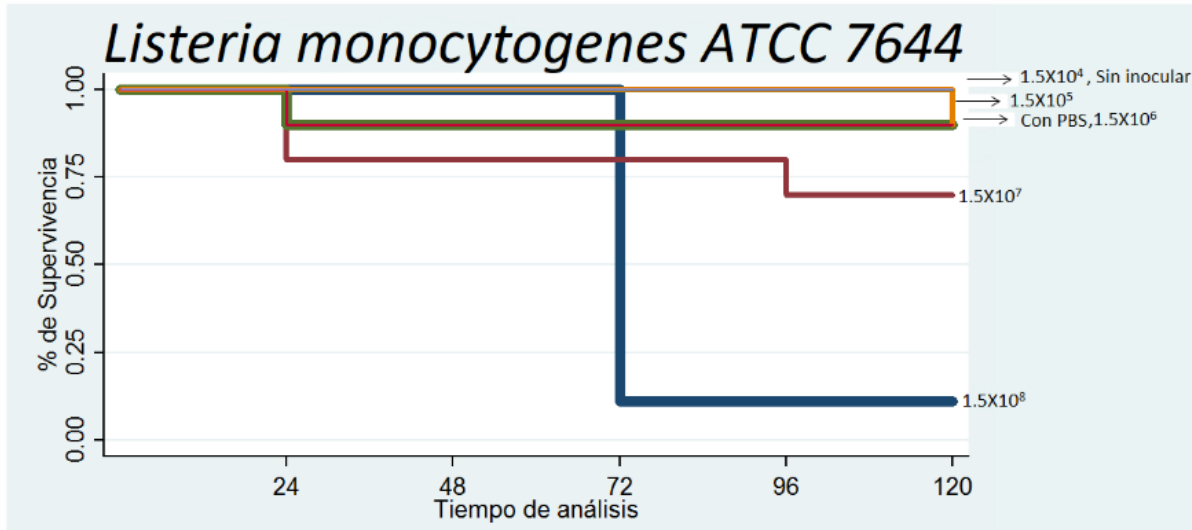


- Incubación a 37 °C
- Seguimiento 5 días
- Generación curvas de supervivencia por Kaplan meier.

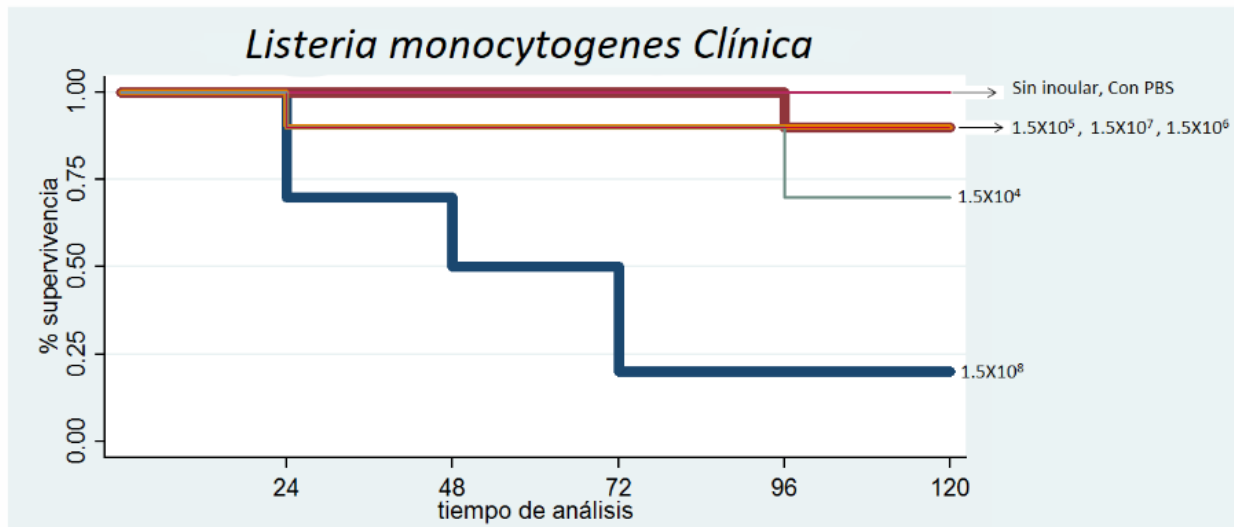


FASE 1: RESULTADO

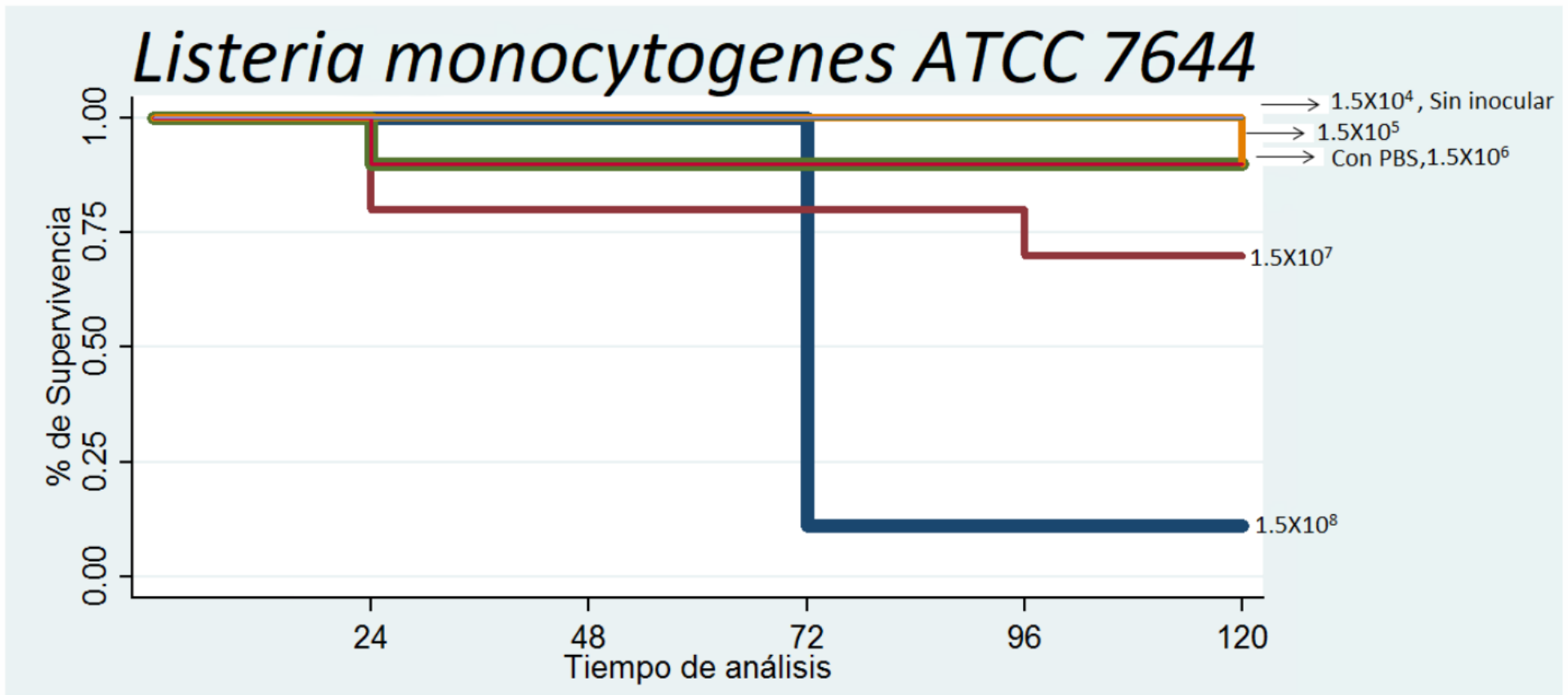
1



2

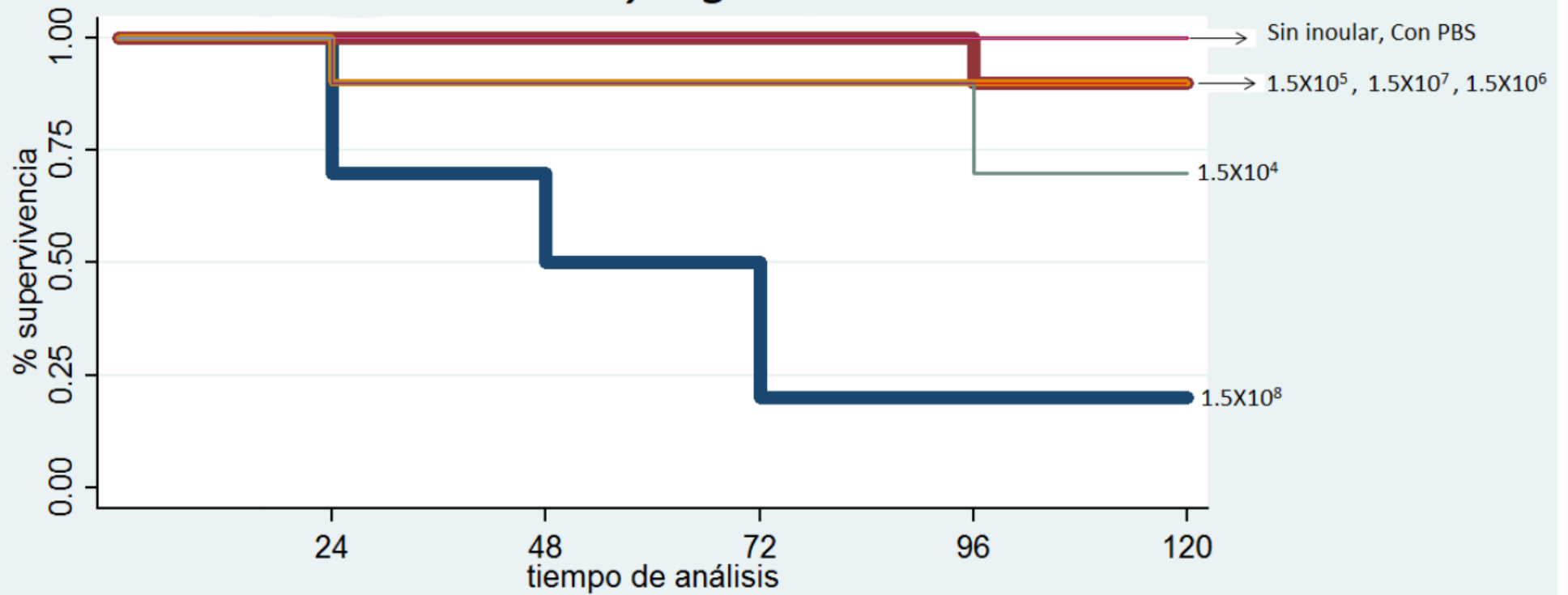


FASE 1: RESULTADO



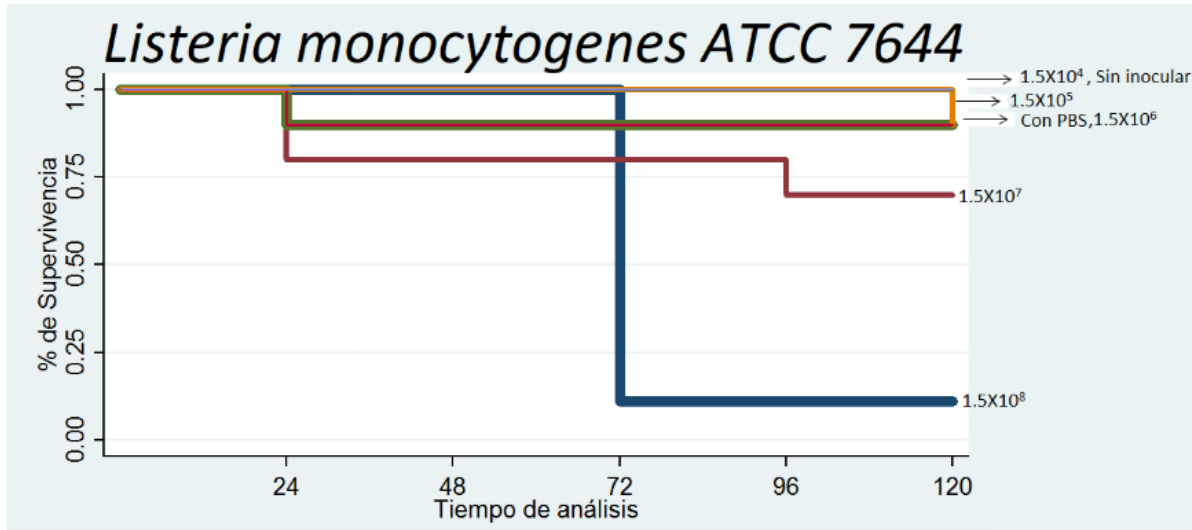
0.1
24 48 72 96 120
Tiempo de análisis

Listeria monocytogenes Clínica

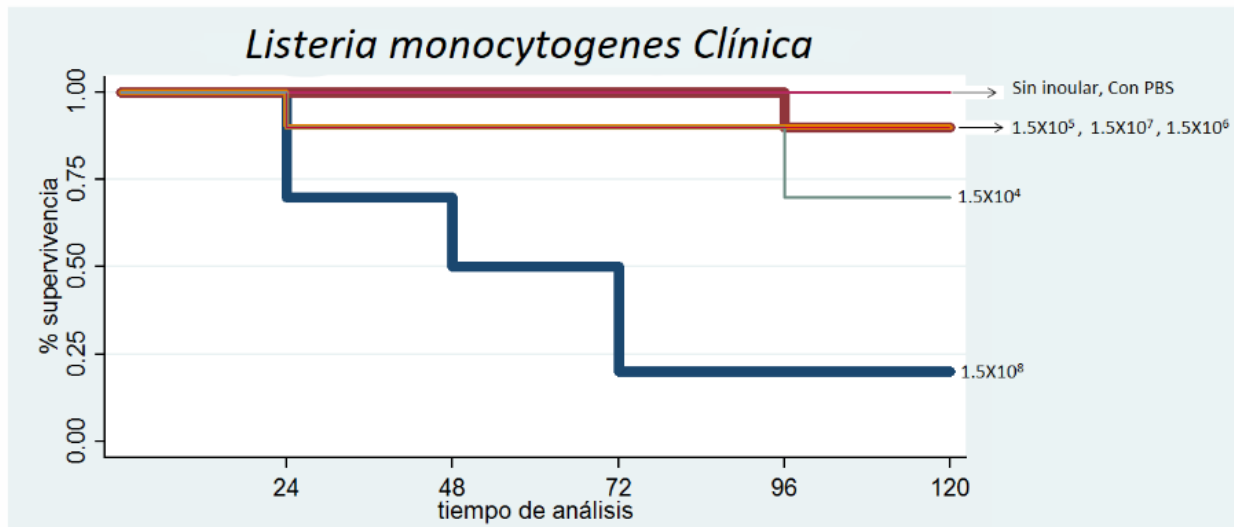


FASE 1: RESULTADO

1



2

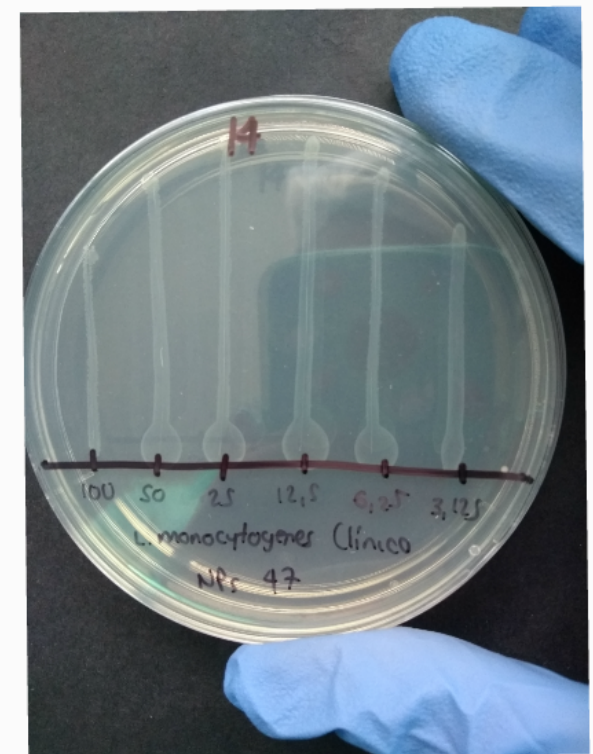


FASE 2: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) PARA NANOPARTÍCULAS DE PLATA



NPs Ag	Concentración ng/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> [1.5 x 10 ⁸ UFC/mL]
NPs Ag 47	100	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644
	50	
	25	
	12.5	
	6.25	
	3.125	<i>Listeria monocytogenes</i> Clínica
	100	
	50	
	25	
	12.5	
6.25	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	
3.125		
100		
50		
25		
12.5		
6.25	<i>Listeria monocytogenes</i> Clínica	
3.125		
100		
50		
25		
12.5	<i>Listeria monocytogenes</i> Clínica	
6.25		
3.125		
3.125		

- INCUBACIÓN 37°C
- LECTURA A LAS 24H



CLSI. M100 Estándares de rendimiento para antimicrobianos Pruebas de susceptibilidad 27 ed. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.



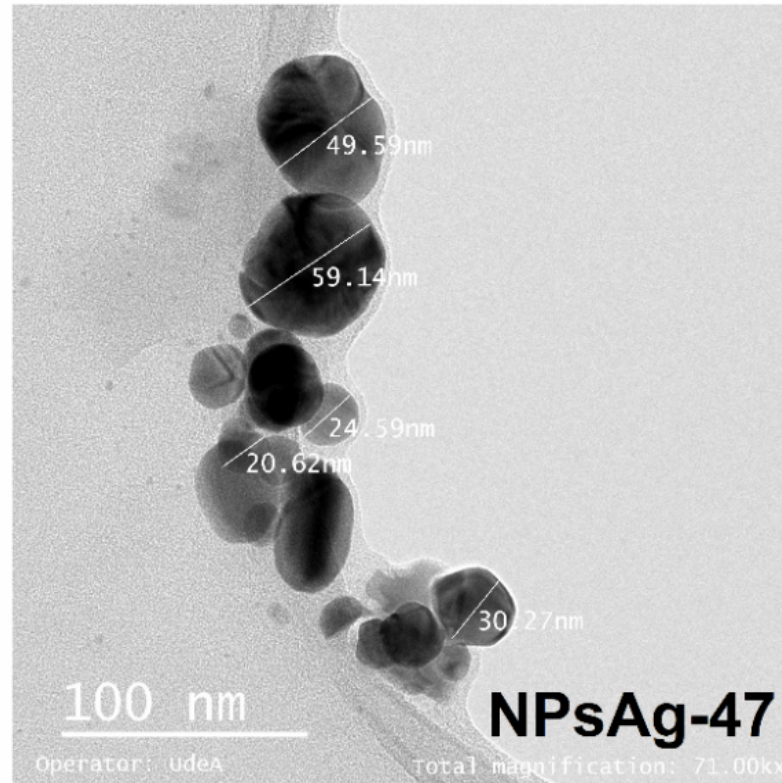
FASE 2: RESULTADO

1

	CMI $\mu\text{L/mL}$	CMB $\mu\text{L/mL}$
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (NPs Ag 47)	≥ 100	≥ 100
<i>Listeria monocytogenes</i> Clínica (NPs Ag 47)	100	≥ 100
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (NPs Ag 49)	≥ 100	≥ 100
<i>Listeria monocytogenes</i> Clínica (NPs Ag 49)	≥ 100	100

**Graham y colaboradores:
Concentraciones de NPs Ag
de 5 a 333 $\mu\text{g/mL}$**

Selección




Listeria monocytogenes
ATCC 7644



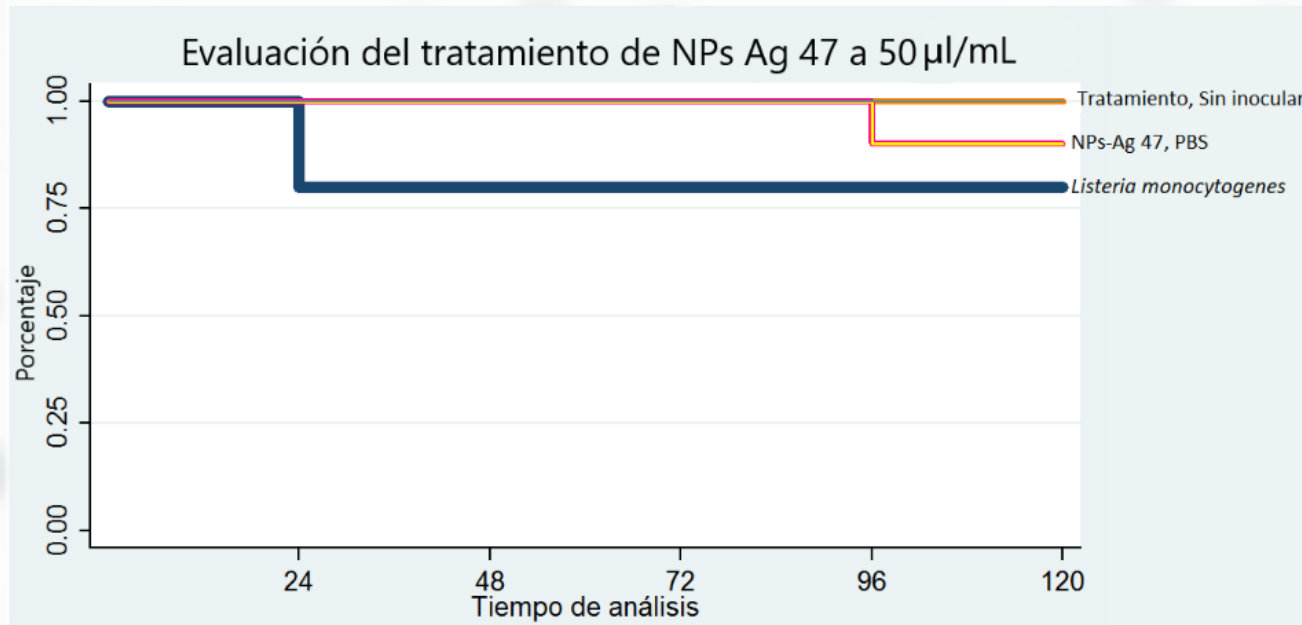
FASE 3: SUPERVIVENCIA DE *Galleria mellonella* INFECTADA CON *Listeria monocytogenes* Y TRATADA CON NPs - Ag47 A DOS CONCENTRACIONES

GRUPO	CANTIDAD Y CARACTERÍSTICAS
1	20 larvas con NPs Ag 47 a 100 $\mu\text{l/ml}$ y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644
2	20 larvas con NPs Ag 47 a 50 $\mu\text{l/ml}$ y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644
Control 1	20 larvas sin inocular
Control 2	20 larvas con PBS
Control 3	20 larvas con NPs Ag 47 a 100 $\mu\text{l/ml}$
Control 4	20 larvas con NPs Ag 47 a 50 $\mu\text{l/ml}$
Control 5	20 larvas con <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644

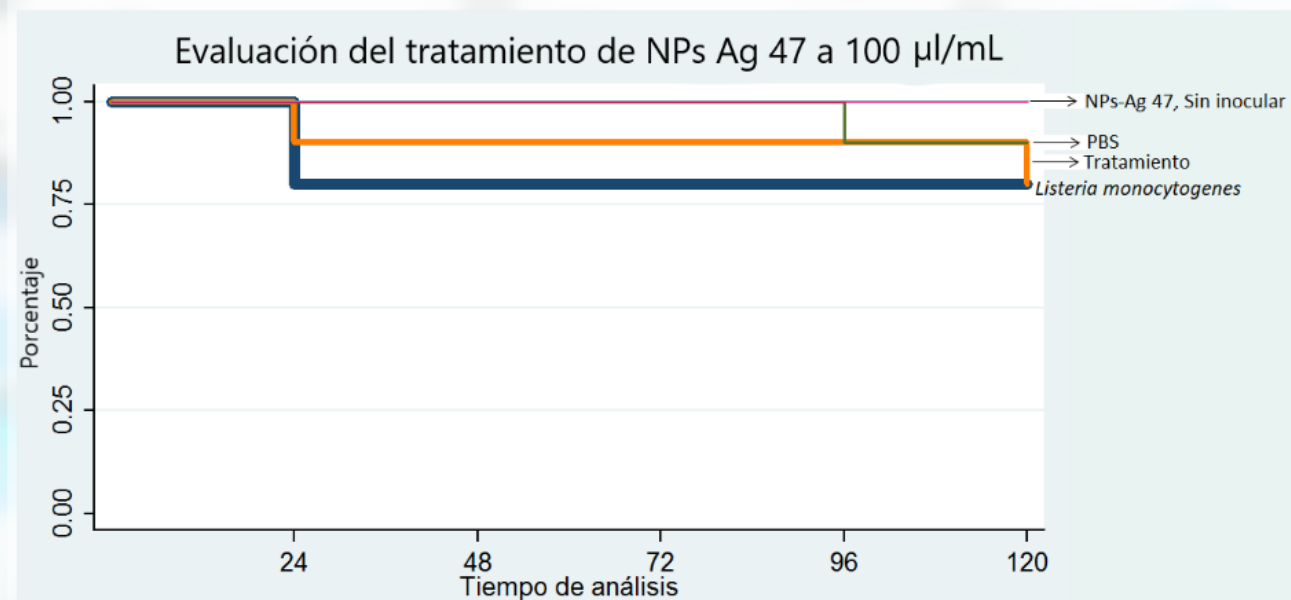
- 
- Incubación a 37°C
 - Seguimiento 5 días
 - Generación curvas de supervivencia por Kaplan meier.

FASE 3: RESULTADO

1

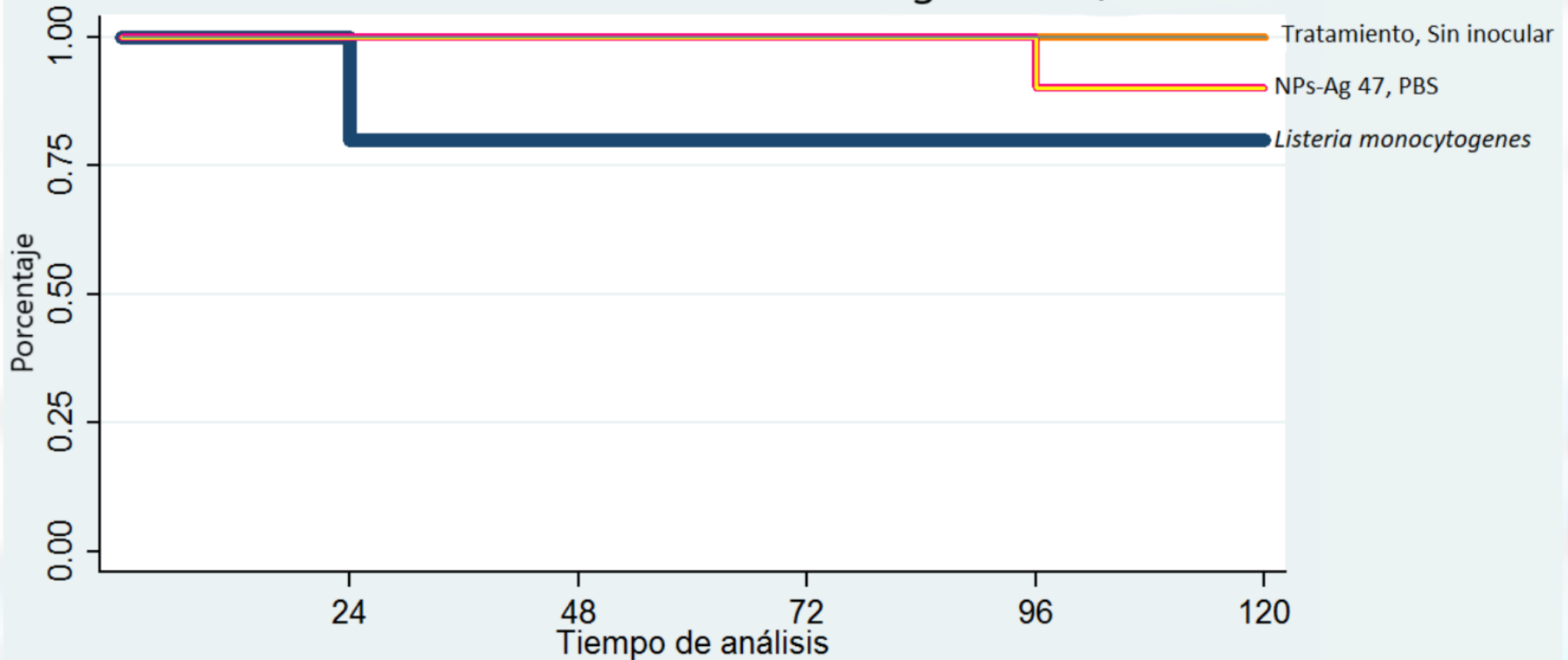


2

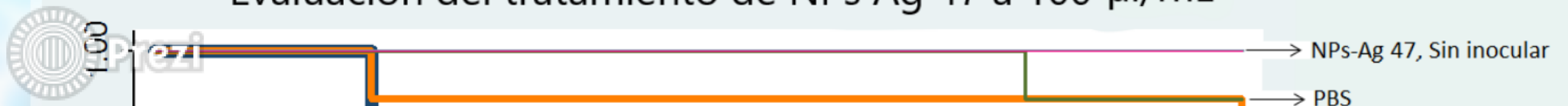


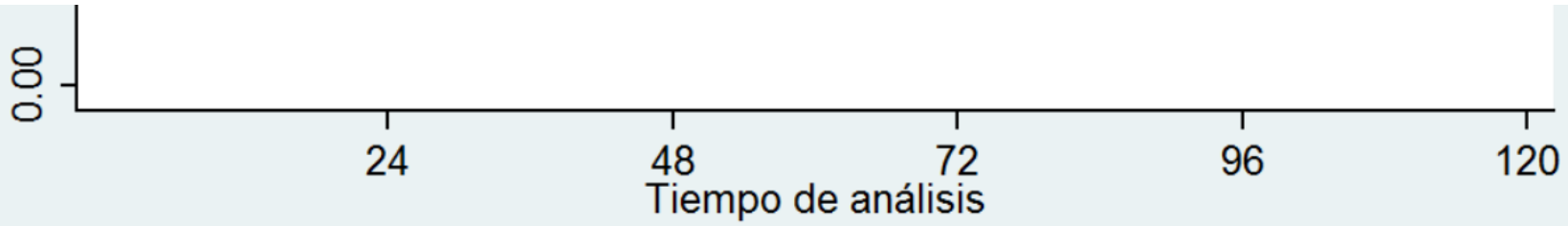
FASE 3: RESULTADO

Evaluación del tratamiento de NPs Ag 47 a 50 $\mu\text{l}/\text{mL}$

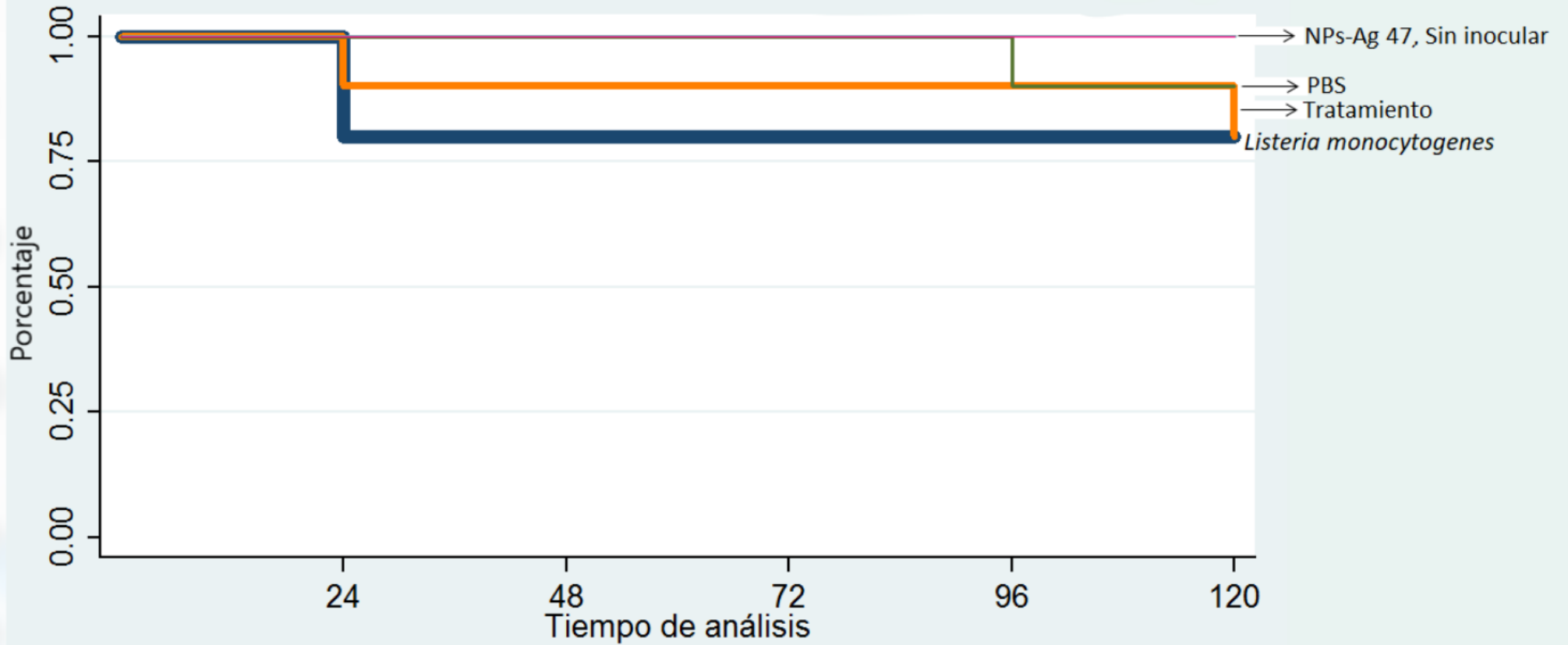


Evaluación del tratamiento de NPs Ag 47 a 100 $\mu\text{l}/\text{mL}$



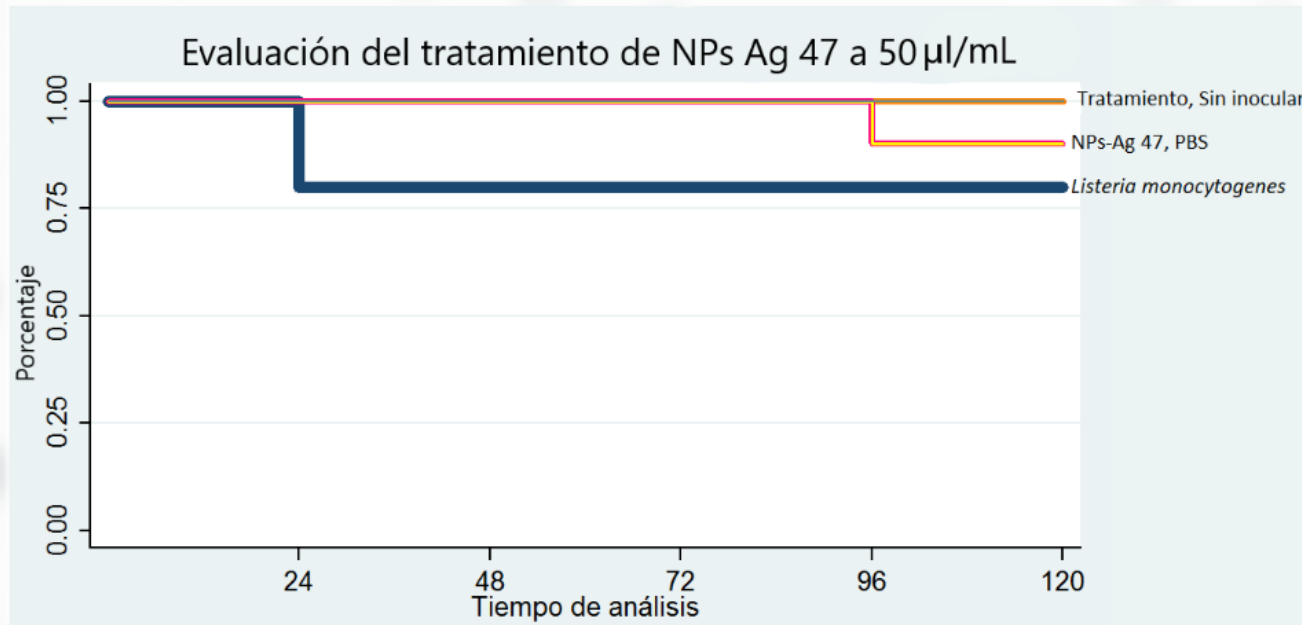


Evaluación del tratamiento de NPs Ag 47 a 100 µl/mL

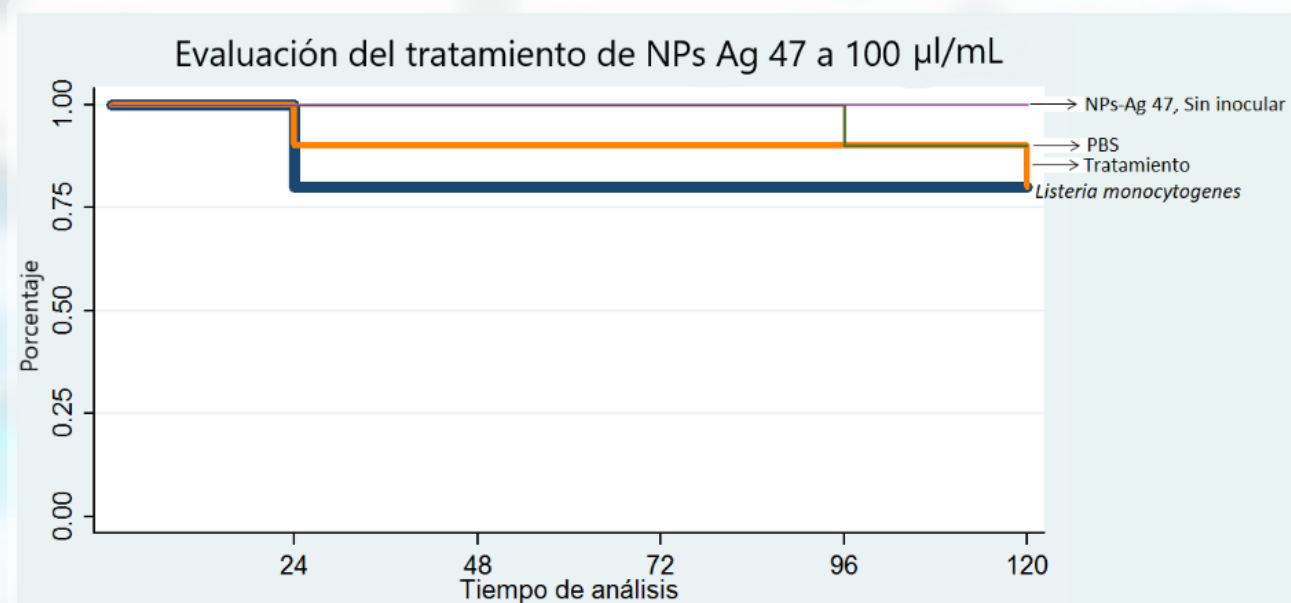


FASE 3: RESULTADO

1




2




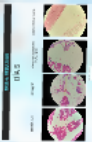
FASE 4: ESTUDIO HISTOLÓGICO DE INFECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN *Galleria mellonella*

GRUPO	CANTIDAD Y CARACTERÍSTICAS
1	20 larvas con <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 a 1.5×10^7 UFC/ml
2	20 larvas con <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 a 1.5×10^7 UFC/ml y NPs Ag 47
CONTROL 1	20 larvas sin inocular
CONTROL 2	20 larvas inoculadas con PBS

- 
- Incubación a 37°C
 - Seguimiento 5 días
 - Se evaluaron los días 0, 2, 3 y 5.
 - Se inocularon con FAATD



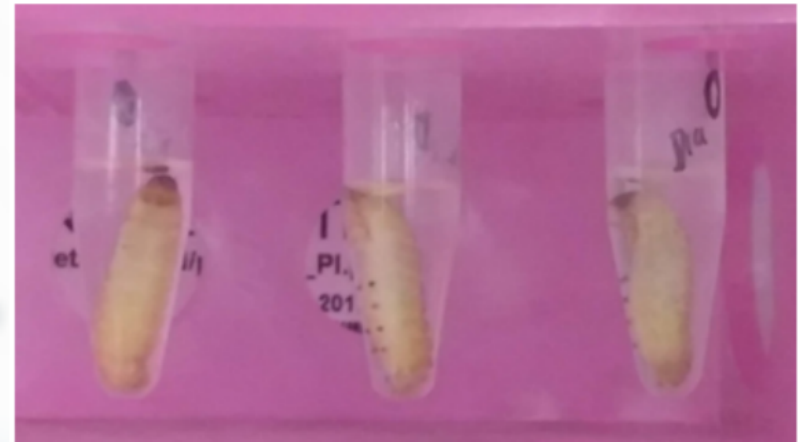
- 
- Fueron llevadas al laboratorio de citohistología de la FUCS para realizar láminas de cortes histológicos.



GRUPO	CANTIDAD Y CARACTERÍSTICAS
1	20 larvas con <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 a 1.5×10^7 UFC/ml
2	20 larvas con <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 a 1.5×10^7 UFC/ml y NPs Ag 47
CONTROL 1	20 larvas sin inocular
CONTROL 2	20 larvas inoculadas con PBS



- Incubación a 37°C
- Seguimiento 5 días
- Se evaluaron los días 0, 2, 3 y 5.
- Se inocularon con FAATD



- Fueron llevadas al laboratorio de citohistología de la FUCS para realizar láminas de cortes histológicos.

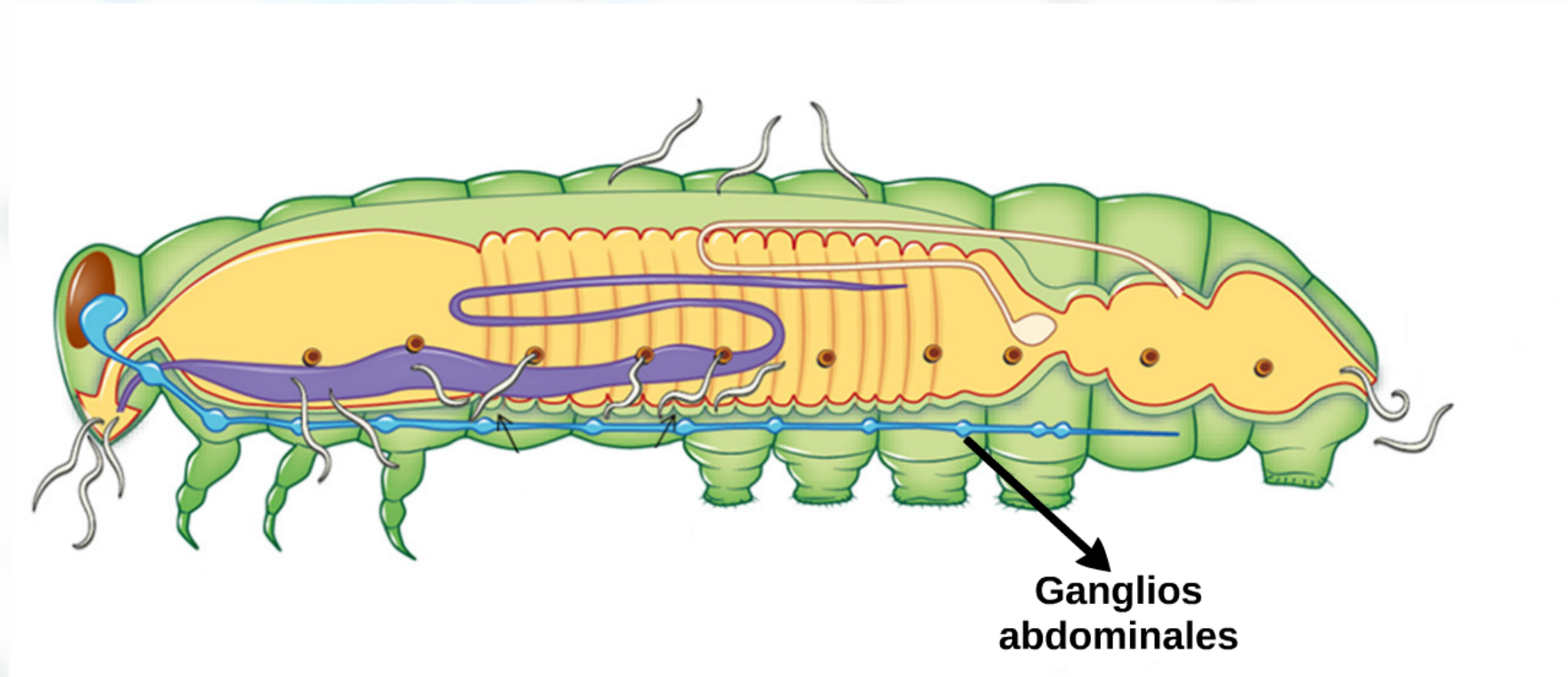
DÍA 0				
	LARVAS INOCULADAS CON NP ₃ Ag	LARVAS INOCULADAS CON NP ₃ + <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS INOCULADAS CON <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS SIN INOCULAR
CABEZA				
INTESTINO MEDIO				
INTESTINO BAJO				
CUERPO GRASO				
ESPACIO INTERSTICIAL				

DÍA 2				
	LARVAS INOCULADAS CON NP ₃ Ag	LARVAS INOCULADAS CON NP ₃ + <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS INOCULADAS CON <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS SIN INOCULAR
CABEZA				
INTESTINO MEDIO				
INTESTINO BAJO				
CUERPO GRASO				
ESPACIO INTERSTICIAL				

DÍA 3				
	LARVAS INOCULADAS CON NP ₃ Ag	LARVAS INOCULADAS CON NP ₃ + <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS INOCULADAS CON <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS SIN INOCULAR
CABEZA				
INTESTINO MEDIO				
INTESTINO BAJO				
CUERPO GRASO				
ESPACIO INTERSTICIAL				

DÍA 5				
	LARVAS INOCULADAS CON NP ₃ Ag	LARVAS INOCULADAS CON NP ₃ + <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS INOCULADAS CON <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS SIN INOCULAR
CABEZA				
INTESTINO MEDIO				
INTESTINO BAJO				
CUERPO GRASO				
ESPACIO INTERSTICIAL				

Morfología de *Galleria mellonella*



<https://www.mdpi.com/2072-6651/8/10/287>

FASE 4: RESULTADO

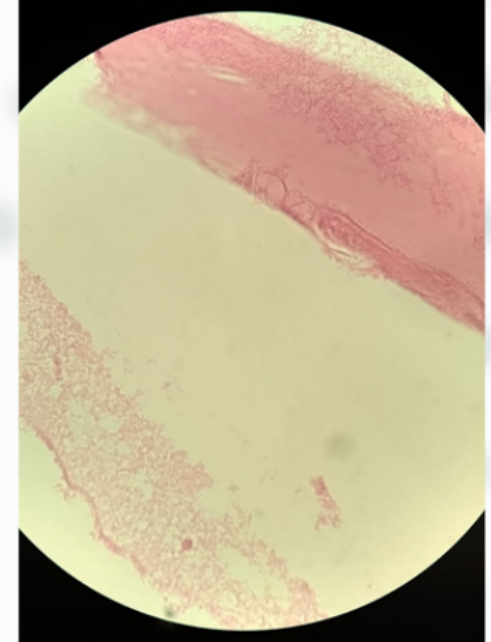
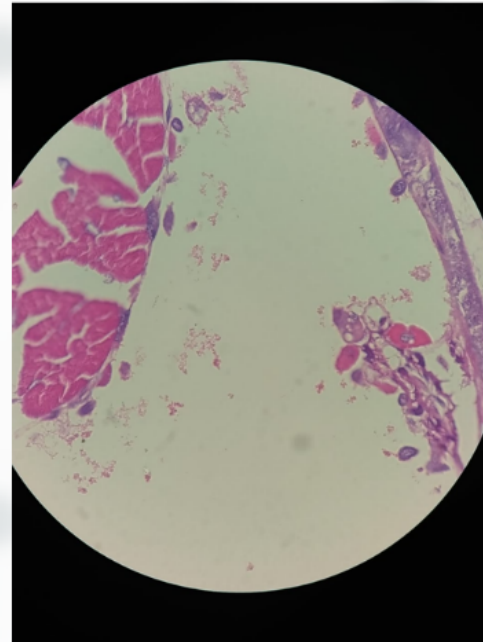
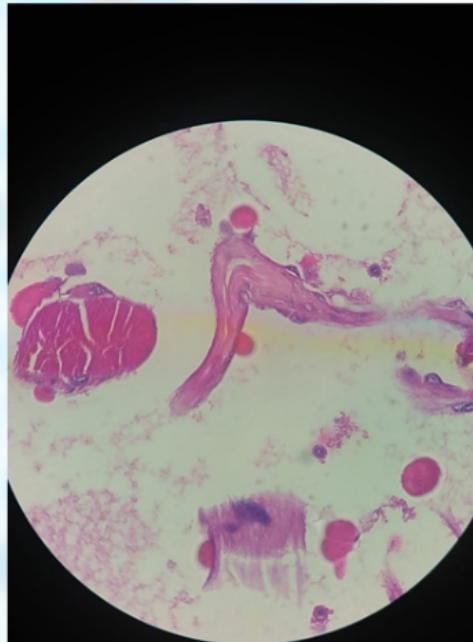
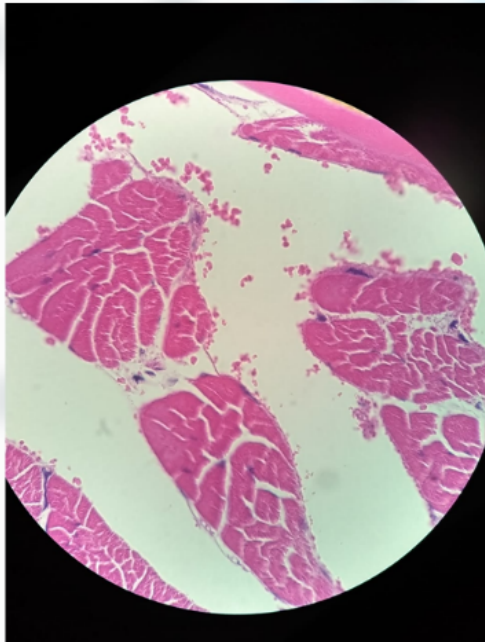
DÍA 5

SIN INOCULAR

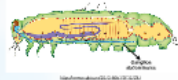
NPs-Ag 47

Listeria monocytogenes
+ NPs-Ag 47

Listeria monocytogenes



Morfología de *Galleria mellonella*



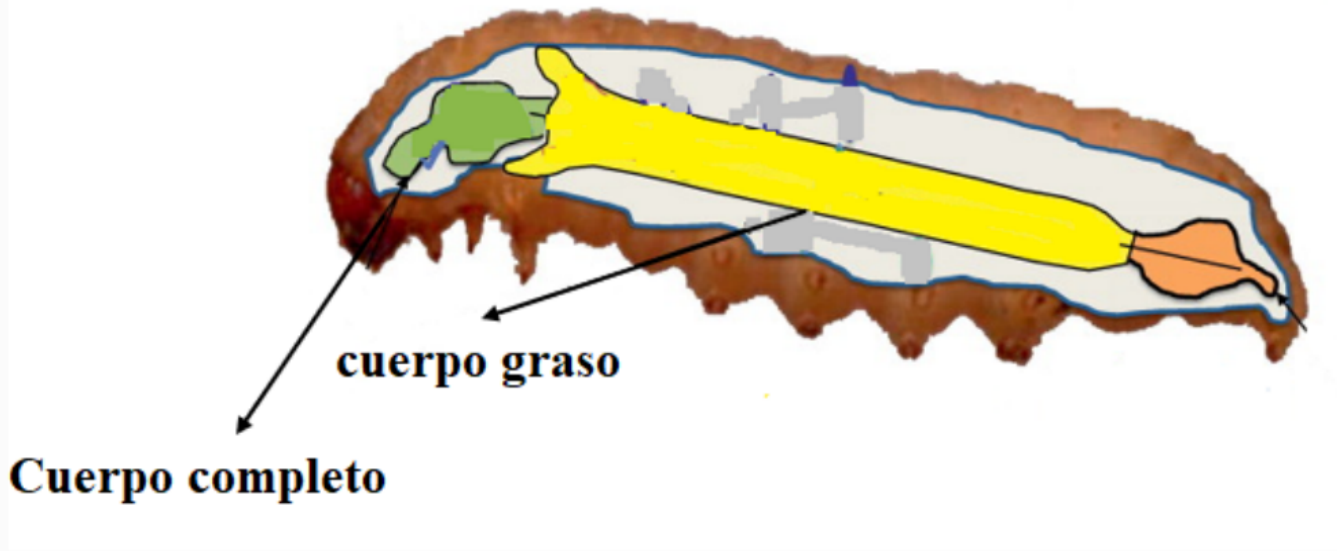
FASE 5: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE *Galleria mellonella* A LA INFECCIÓN POR *Listeria monocytogenes*

FASE 5 RESULTADOS RECuento DE UFC PARA EL GÉNERO *Listeria* INOCULADO CON *Listeria monocytogenes*

Se inocularon 40 larvas con *Listeria monocytogenes* ATCC 1644 en concentración de 1.5×10^7

Se incubaron a 37°C durante 5 días y se sacaron 4 larvas por día, dos para cuerpo gordo y dos para cuerpo completo

DÍA	CUERPO COMPLETO		CUERPO GORDO	
	CFU/ml	CFU/g	CFU/ml	CFU/g
1				
2				



Se realizó recuento de UFC para conocer el funcionamiento del sistema inmune de la larva en un proceso infeccioso.

FASE 5 RESULTADOS RECuento DE UFC PARA EL GÉNERO *Listeria* INOCULADO CON *Listeria monocytogenes*

Se inocularon 40 larvas con *Listeria monocytogenes* ATCC 1644 en concentración de 1.5×10^7

Se incubaron a 37°C durante 5 días y se sacaron 4 larvas por día, dos para cuerpo gordo y dos para cuerpo completo

DÍA	CUERPO COMPLETO		CUERPO GORDO	
	CFU/ml	CFU/g	CFU/ml	CFU/g
1				
2				

FASE 5 RESULTADOS: RECUENTO DE UFC/ML EN *Galleria mellonella* INOCULADA CON *Listeria monocytogenes*

Se inocularon 40 larvas con *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 en concentración de 1.5×10^7



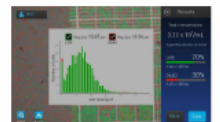
Se incubaron a 37 °C durante 5 días y se sacaron 4 larvas por día, dos para cuerpo graso y dos para cuerpo completo

DÍA	CUERPO COMPLETO	CUERPO GRASO
	UFC/ml	UFC/ml
0	50.000.000	30.000.000
5	5.000	100

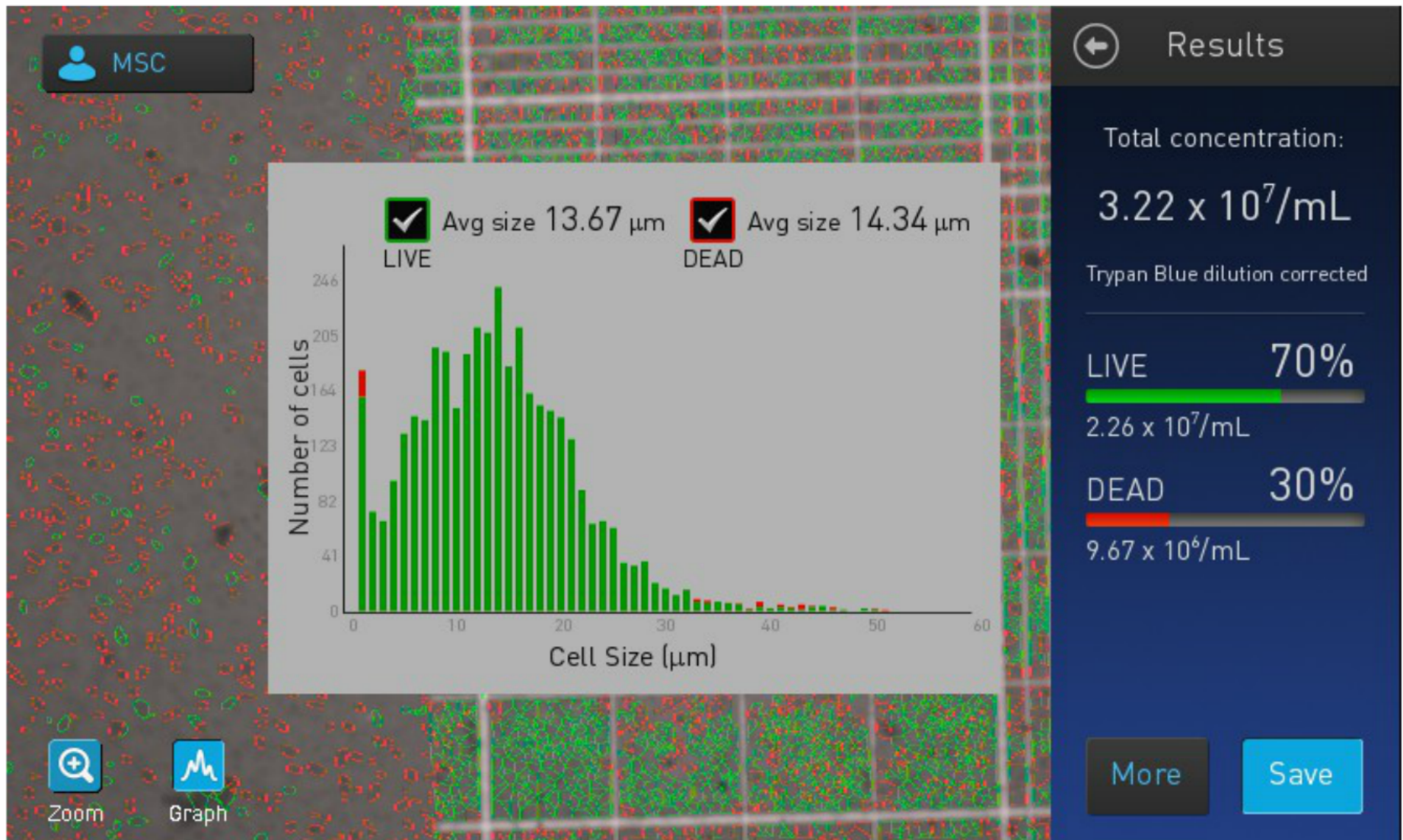
GRUPO	CANTIDAD Y CARACTERÍSTICAS
1	10 <i>Galleria mellonella</i> sin inocular
2	10 <i>Galleria mellonella</i> + <i>Listeria monocytogenes</i>
3	10 <i>Galleria mellonella</i> + <i>Listeria monocytogenes</i> + NPs Ag 47 (50µl/ml)
5	10 <i>Galleria mellonella</i> + NPs Ag 47 (50µl/ml)



- Se incubaron a 37°C
- Se hizo seguimiento por 5 días
- Se realizaron lecturas los días 0,2 y 5
- Se realizó recuento



Courtesy: FL Cell counter



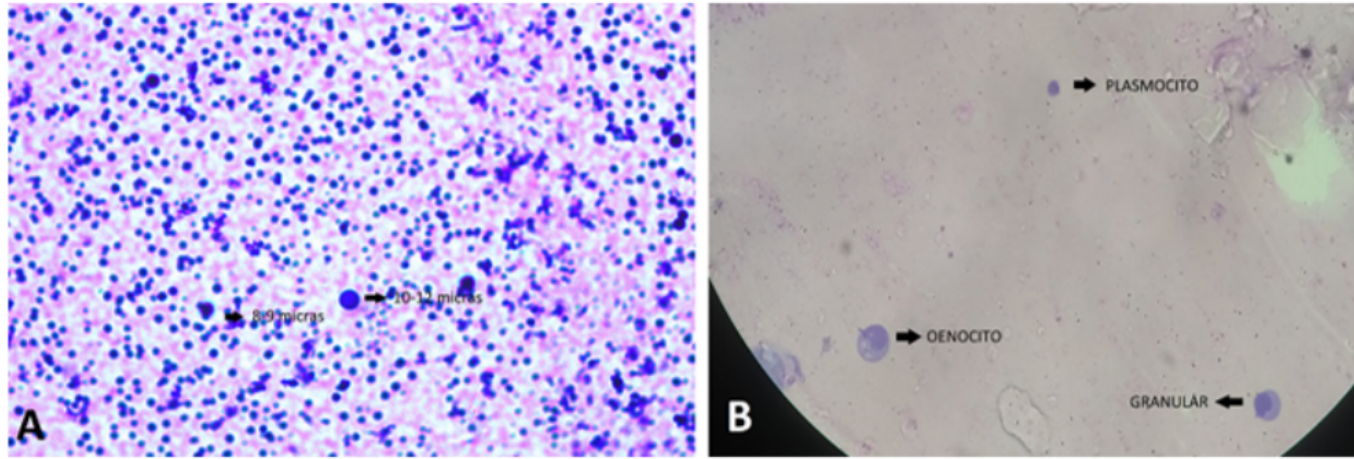
Countess II FL Cell counter

FASE 5 RESULTADOS: RECUENTO CELULAR Y DIFERENCIAL

1

	DÍA	PLASMOCITO	GRANULAR	ESFÉRICA	OENOCITOIDE	TOTAL
Sin inocular	0	796	1173	1028	883	3881
	2	759	1120	788	1045	3712
	5	1125	1397	1000	852	4374
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC	0	594	930	794	937	3255
	2	377	252	50	540	1219
	5	413	562	446	545	1966
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC y NPs Ag 47	0	557	998	868	972	3396
	2	675	1013	793	675	3157
	5	828	1080	876	876	3660

2



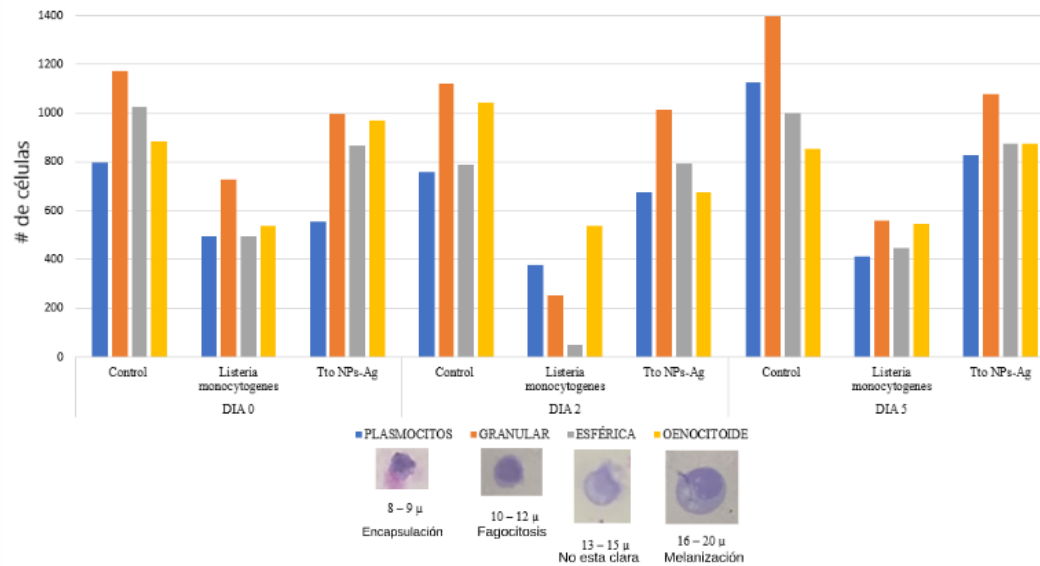
Wright

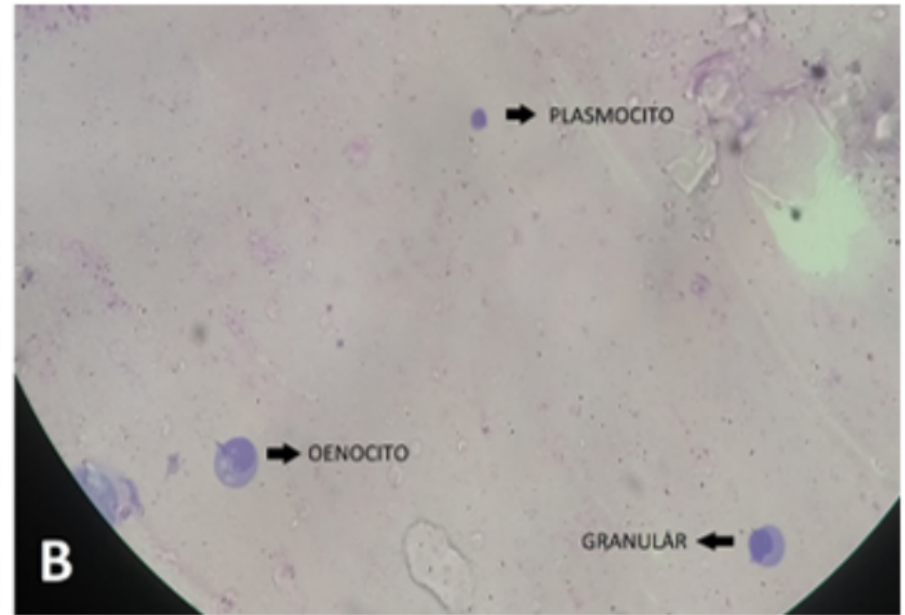
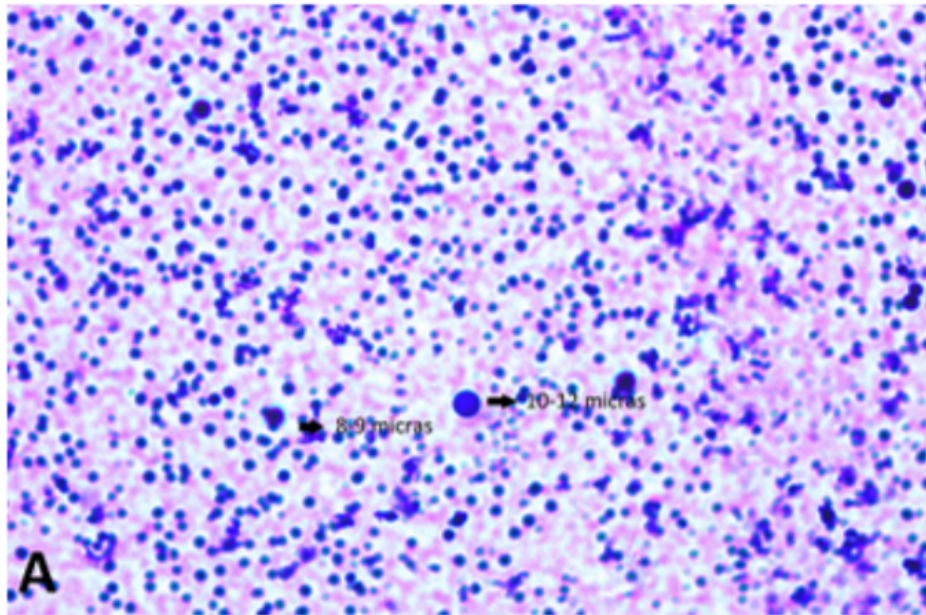
Giemsa

💡 Wu G. y Liu Y.

3

Comparación de la respuesta celular inmune de *Galleria mellonella* a infección por *Listeria monocytogenes* y durante el tratamiento con NPs-Ag





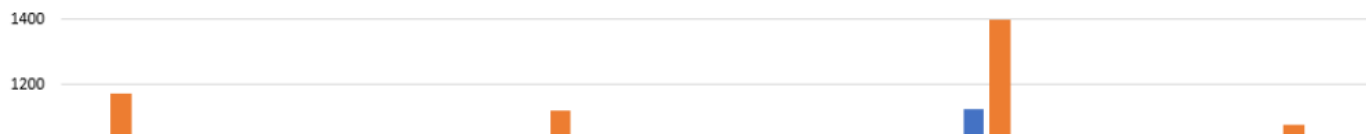
Wright



Wu G. y Liu Y.

Giemsa

Comparación de la respuesta celular inmune de *Galleria mellonella* a infección por *Listeria monocytogenes* y durante el tratamiento con NPs-Ag



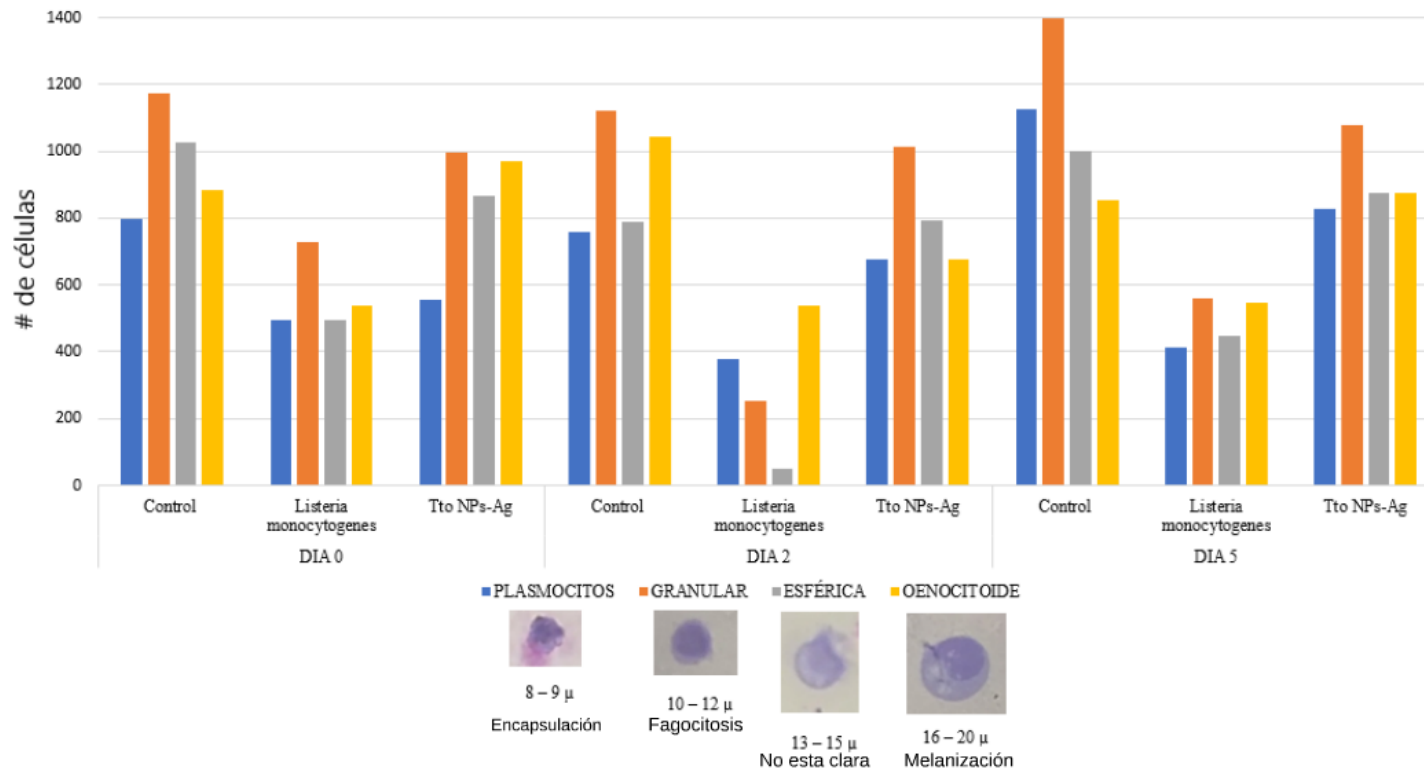
Wright



Wu G. y Liu Y.

Giemsa

Comparación de la respuesta celular inmune de *Galleria mellonella* a infección por *Listeria monocytogenes* y durante el tratamiento con NPs-Ag



CONCLUSIONES

- La DL 50 para la infección en *Galleria mellonella* fue de 1.5×10^7 UFC/mL para *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.
- La nanopartícula 47 generó el 90% de sobrevivencia sobre *Galleria mellonella*.
- El sistema inmune celular de *Galleria mellonella* se disminuye cuando hay una infección por *Listeria monocytogenes*, pero mejora al utilizar tratamiento con nanopartículas de plata y las células que están involucradas son las células Granulares.
- Las nanopartículas de plata inhiben el proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes* y potencian la respuesta inmune celular en la evaluación *in vivo* con las larvas de *Galleria mellonella*.

AGRADECIMIENTOS

- Doctora Marcela Gómez por la dirección del trabajo y la profesora Jovanna Acero por la asesoría.
- Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por toda nuestra formación.
- Fundación Universitaria de las Ciencias de la Salud por el financiamiento y locación.
- Finalmente a nuestras familias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Belluco S, Losasso C, Patuzzi I, Rigo L, Conficoni D, Gallochio F, et al. La plata como antibacteriano hacia *Listeria monocytogenes*. . *Frontiers in microbiology*. 2016;7:307.
2. Hof H. History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 35. England 2003. p. 199-202.
3. Cossart P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect*. 9. France 2007. p. 1143-6.
4. Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. 2005.
5. Camacho A, Castaño M, Cortes M, Correa D, Olivares M, Pérez T, et al. Evaluación de riesgos *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. 2011. Available from: https://www.researchgate.net/publication/266069853_EVALUACION_DE_RIESGOS_DE_Listeria_monocytogenes_EN_QUESO_FRESCO_EN_COLOMBIA
6. Alvarez DE, Agaisse H. The Metalloprotease Mpl Supports *Listeria monocytogenes* Dissemination through Resolution of Membrane Protrusions into Vacuoles. *Infection and Immunity*. 2016;84(6):1806.
7. Faralla C, Rizzuto GA, Lowe DE, Kim B, Cooke C, Shio LR, et al. InlP, a New Virulence Factor with Strong Placental Tropism. *Infect Immun*. 2016;84(12):3584-96.
8. Rodríguez L. Ciclo biológico de *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae). 2015.
9. NCBI. Taxonomy *Galleria mellonella* [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>].
10. Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp*. 2012(70):e4392.

Muchas
GRACIAS

