UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE SENSIBILIDAD EN LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA MIEL DE ABEJA SOBRE CEPA CERTIFICADA DE (*Staphylococcus aureus*)"

"Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista"

AUTOR: BETTY LORENA VAYAS MINANGO

TUTOR: DRA. MAYRA MONTERO

CEVALLOS– ECUADOR

2017

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

"El suscrito, BETTY LORENA VAYAS MINANGO, portador de cédula identidad número: 180381933-1 libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: "EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE SENSIBILIDAD EN LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA MIEL DE ABEJA SOBRE CEPA CERTIFICADA DE (*Staphylococcus aureus)* "es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas".

…….....

BETTY LORENA VAYAS MINANGO

C.I. 1803819331

DERECHOS DE AUTOR

"Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado "EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE SENSIBILIDAD EN LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA MIEL DE ABEJA SOBRE CEPA CERTIFICADA DE (*Staphylococcus aureus)* " como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él".

…….....

BETTY LORENA VAYAS MINANGO

C.I. 1803819331

"EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE SENSIBILIDAD EN LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA MIEL DE ABEJA SOBRE CEPA CERTIFICADA DE (*Staphylococcus aureus)*."

APROBADO POR:

_____

Dra. Mayra Montero

TUTOR

_____

Ing. Ricardo Guerrero

ASESOR DE BIOMETRÍA

REVISADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

_____ _____

Ing. Mg. Hernán Zurita Vázquez FECHA

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

_____ _____

Ing. Ricardo Guerrero FECHA

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

_____ _____

Dr. Efraín Lozada FECHA

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

HOJA DE AGRADECIMIENTOS

Primeramente doy gracias a Dios por permitirme haber culminado mi carrera, gracias a mi madre Martha Minango por haberme apoyado en cada paso que he dado en la universidad, a mi padre Fabián Vayas por haberme apoyado económicamente y moralmente, a mi hermana Alexandra Ruales por ser un ejemplo a seguir, a mi esposo Iván Lara por ser un pilar fundamental y económico en mi vida estudiantil , a mi hija Samantha Lara por ser mi motivo a seguir y nunca decaer, a mis amigos por apoyarme en el trabajo de grado.

A la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato por darme la oportunidad de prepararme para ser una excelente profesional

A mi tutora Dra. Mayra Montero por haber sido una gran guía en el proceso de elaboración y realización de mi tesis, al Dr. Efraín Lozada por haberme ayudado en la redacción y culminación de la tesis y al Ing. Ricardo Guerrero por ser una gran profesor y amigo en cada etapa estudiantil.

HOJA DE DEDICATORIAS

Mi tesis la dedico en primer lugar a Dios por darme la fuerza necesaria para salir adelante, a mis padres Fabián Vayas y Martha Minango por apoyarme en cada momento de mi vida estudiantil al estar presentes en cada etapa de mi vida y del mismo modo por haberle cuidado a mi hija en los momentos en los que yo tenía que estudiar, a mi hija Samantha Lara por ser la fuente de inspiración en mi vida y mi motivo a seguir cada vez adelante, a mi esposo Iván Lara por haber sido un apoyo incondicional en cada momento de mi vida y estar en los momentos buenos y malos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN 2
SUMMARY 3
CAPÍTULO I 4
INTRODUCCIÓN 4
CAPÍTULO II 6
REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO 6
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS 6
2.2. MARCO CONCEPTUAL 13
2.2.1 Métodos de Sensibilidad Antimicrobiana 13
➢ Métodos de Difusión 14
2.2.2 Miel de abeja (*Apis mellifera*) 16
➢ Propiedades 17
➢ Efecto Osmótico 18
➢ Peróxido de Hidrógeno 18
➢ pH 19
2.2.3 Staphylococcus aureus 19
➢ Taxonomía 21
➢ Producción de toxinas estafilocócicas 21
➢ Resistencia a antibióticos 21
➢ Enfermedades causadas por Staphylococcus aureus 22
2.2.4 Medios de cultivo 22
➢ Agar Mueller 22
➢ Agar Sal Manitol 22
2.2.5 Métodos de estudio de sensibilidad 23
➢ Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) 23
➢ Concentración Mínima Bactericida (CMB) 23
CAPÍTULO III 24
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 24
3.1 HIPÓTESIS 24
3.2 OBJETIVOS 24
CAPÍTULO IV 25
MATERIALES Y MÉTODOS 25
4.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO 25

4.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR 25
4.3.1 Reactivos 25
4.3.2 Agentes Biológicos 26
4.3.3 Material Experimental 26
4.3.4 Materiales de Laboratorio 26
4.3.5 Equipos 27
4.4. FACTORES EN ESTUDIO 27
4.4.1 Diluyente 27
4.4.2 Extracto 27
- Obtención del material experimental 27
- Obtención del material biológico 30
- Elaboración de los medios de cultivo 30
- Activación de la cepa 31
- Preparación del inóculo 31
- Elaboración de las concentraciones de la miel de abeja 31
- Preparación de los discos 32
4.4.3 Métodos de cultivo bacteriano 32
- Difusión en agar 32
- Método en pozos de agar 32
CAPÍTULO V 35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 35
5.1. RESULTADOS 35
5.2. DISCUSIÓN 38
CAPÍTULO VI 41
6.1. CONLUSIONES 41
6.2. BIBLIOGRAFÍA 41
6.3. ANEXOS 51
CAPÍTULO VII 57
PROPUESTA 57
7.1. DATOS INFORMATIVOS 57
7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTAS 57
7.3. JUSTIFICACIÓN 58
7.4. OBJETIVO 58
7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD 58
7.6. FUNDAMENTACIÓN 58
7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO 59

7.8. ADMINISTRACIÓN 59
7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN 59

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. DIÁMETROS DE INHIBICIÓN EXPRESADOS EN (MM)..... 15
TABLA 2.CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 21
TABLA 3. TÉCNICAS DE CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LA MIEL DE ABEJA 28
TABLA 4. DISTRIBUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS Y DESCRIPCIÓN DE LOS MISMOS A UTILIZARSE EN LA INVESTIGACIÓN 33
TABLA 5. PRUEBA T PARA DOS MUESTRAS SUPONIENDO VARIANZAS DESIGUALES..... 35
TABLA 6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA..... 36
TABLA 7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA..... 36
TABLA 8. DETERMINACIÓN DEL PH DE MIEL DE ABEJA PURA..... 37
TABLA 9. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LA MIEL DE ABEJA PURA..... 37

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 2. SIEMBRA DE LA CEPA ACTIVADA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 51
ANEXO 3. COMPARACIÓN DEL INÓCULO CON EL TUBO N°5 DE LA ESCALA DE MAC FARLAND 52
ANEXO 4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA AL 30%,50%,70% Y 90% DE MIEL DE ABEJA DE *APIS MELLIFERA* SOBRE CEPA CERTIFICADA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 52
ANEXO 5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA EN AGAR MACCONKEY CON EL 90% DE MIEL DE ABEJA DE *APIS MELLIFERA* SOBRE CEPA CERTIFICADA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 53
ANEXO 6. COLOCACIÓN DE MIEL DE ABEJA DE *APIS MELLIFERA* SOBRE LOS DISCOS 53
ANEXO 7. COLOCACIÓN DE AGUA PEPTONADA ESTÉRIL SOBRE LOS DISCOS COMO TRATAMIENTO TESTIGO 54
ANEXO 8. COLOCACIÓN DE LOS DISCOS IMPREGNADOS DE MIEL DE ABEJA DE *APIS MELLIFERA* SOBRE AGAR MULLER PREVIAMENTE SEMBRADO CON LA CEPA CERTIFICADA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. 54
ANEXO 9. MEDICIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN POR MEDIO DEL MÉTODO KIRBY BAUER 55
ANEXO 10. MEDICIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN POR MEDIO DEL MÉTODO POZOS DE AGAR 55
ANEXO 11. HALOS DE INHIBICIÓN FORMADOS POR M1C2 (KIRBY BAUER) Y M2C2 (POZOS MODIFICADOS DE AGAR) 56

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo evaluar dos métodos de sensibilidad Kirby Bauer y Método en pozos modificados de agar sobre *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC® 11632* mediante la utilización de miel de abeja pura de *Apis mellifera*. Se evaluó la sensibilidad mediante el uso de una concentración al 100%. Como resultado a través del análisis estadístico T de student se obtuvo que el método modificado en pozos de agar formó halos de inhibición en promedio de 25,04 mm, mientras que en el método Kirby Bauer presentó 21,15 mm; concluyendo que el método modificado en pozos de agar es más sensible que Kirby Bauer. Se determinó mediante el análisis bioquímico, que la miel de abeja contiene alcaloides, compuestos de agrupamiento lactónico, terpenos, azúcares reductores y saponinas componentes bioactivos que son atribuidos a propiedades antibacterianas.

Palabras Clave: *Apis mellifera*, Kirby Bauer, Método modificado en pozos de agar, Halos de inhibición, Análisis Bioquímico.

SUMMARY

SUMMARY

The research aimed to evaluate two methods of sensitivity Kirby Bauer and Method in modified agar wells on *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC® 11632* using pure honey from *Apis mellifera*. Concentrations were evaluated at 100%.. As a result, the student's T statistical analysis showed that the modified method in agar wells formed inhibition halos on average of 25.04 mm, whereas in the Kirby Bauer method it presented 21.15 mm; Concluding that the modified method in agar wells is more sensitive than Kirby Bauer. It was determined by the biochemical analysis that bee honey contains alkaloids, lactone grouping compounds, terpenes, reducing sugars and saponins bioactive components that are attributed to antibacterial properties.

Keywords: *Apis mellifera*, Kirby Bauer, modified method in agar wells, Inhibition halos, Biochemical analysis

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Una variedad de métodos de sensibilidad a nivel de laboratorio se pueden utilizar para medir la susceptibilidad in vitro de bacterias y agentes antimicrobianos; existen pruebas bacteriológicas que permiten conocer la sensibilidad bacteriana la cual es expuesta ante un fármaco, extracto de plantas o sustancias que puedan alterar su crecimiento; el test de difusión en agar es usado en forma rutinaria para bacterias de rápido crecimiento y en bacterias altamente patógenas(Praterner, 2006)

En la actualidad se cuenta con diversos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de sustancias sintéticas; éstos métodos se aplican mucho en el ámbito hospitalario como es el caso del método de difusión de discos (KirbyBauer), el método de pozos en agar y método de dilución en tubos (turbidimétrico) para hallar no sólo la potencia sino también la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos (Varaldo, 2002)

Los ensayos de susceptibilidad están indicados para apoyar la terapia antimicrobiana en procesos infecciosos por bacterias en las que la identidad del microorganismo no es suficiente para predecir en forma confiable su sensibilidad; los mecanismos de resistencia incluyen la producción de enzimas inactivantes de la droga, que alteran el objetivo, o alteran la acción del agente etiológico (Pérez, 2012)

La resistencia bacteriana es un tema de importancia en la salud pública y animal. Su extensión a nivel mundial, desarrollo de resistencia a nuevos agentes antimicrobianos, así como su presencia en patógenos relacionados con enfermedades prevalentes, le dan el carácter de problema prioritario. Por ello, el conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana debe orientar a la elaboración de esquemas de tratamiento más eficaces (Zurita, 2002)

Considerando éstos aspectos preliminares, se desprende que la vigilancia de la resistencia antimicrobiana es necesaria asegurando un diagnóstico y tratamiento eficaz (Mendoza *et al*, 2007), es por eso que el propósito de este trabajo fue evaluar métodos de sensibilidad en la efectividad antimicrobiana de la miel de abeja sobre cepa certificada de (*Staphylococcus aureu subsp. aureus ATCC® 11632)*

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Investigaciones realizadas por (Petit, Céspedes, & Nava, 2006) reportan que la miel de abeja exhibe efecto inhibitorio sobre los microorganismos, tanto de forma pura como diluida, manifestando que la actividad antimicrobiana de éste producto se debe no sólo a sus propiedades físico-químicas, sino también a otros factores incluyendo la actividad de la lisozima, la presencia de ácidos aromáticos y volátiles, así como a la producción de peróxido de hidrógeno asociada con la enzima glucosa oxidasa. Soluciones de mieles en concentraciones de 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% y 5% fueron utilizadas para inhibir cepas bacterianas como *S. aureus, P. aeruginosa, E. coli* y *P. mirabilis.* Las cepas analizadas tanto gram positivas como gram negativas, resultaron inhibidas en su crecimiento a nivel de todas las concentraciones de miel analizadas reportando que el mayor halo de inhibición fue de 17 mm y el menor fue de 8 mm, La cepa *S. aureus* fue la que resultó más sensible a dicha miel, presentando halos de inhibición de 17 mm a partir de la concentración del 40%.

Estrada, Gamboa, y Chaves (2005) evaluaron el uso de la miel de abeja a concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% contra S. aureus , S. epidermidis , P. aeruginosa , E. coli , S. enteritidis y L. monocytogenes obteniendo mejores resultados exponiendo a la bacteria a una concentración del 100% ya que a ese porcentaje ejerció su efecto inhibitorio con un 80% S. aureus, 68% S. epidermidis, 76% P. aeruginosa,84% E. coli ,92% S. enteritidis y 40 % L. monocytogenes.

En un estudio realizado por (Souza, Roubik, Barth, & Heard, 2006) en Costa Rica con miel de abeja comercial, se reporta una marcada resistencia de *S.epidermidis* contra ésta; sin embargo, en el presente estudio, únicamente 10% de las muestras fueron resistentes e, inclusive, se obtuvo inhibición a concentraciones tan bajas como al 25% de miel de abeja. Ésta diferencia de comportamiento se puede deber a que la miel de melipónidos tiende a ser más ácida que la de la abeja del género *Apis* y a las diferencias en composición química entre ambas.

Zamora y Arias (2011) evaluaron la miel de abejas sin aguijón a concentraciones del 100%, 75%, 50%, 25% y 12,5% siendo importante destacar que el 90% de las muestras de miel, a una concentración del 100%, ejercieron un efecto inhibidor sobre S. aureus y S. epidermidis y 87 % sobre E. coli O157:H7, contrario a L. monocytogenes donde únicamente 67% de las mieles lograron algún tipo de inhibición sobre ésta. También, cabe destacar que muestras de miel diluidas a 25% presentaron actividad contra S.aureus, S.epidermidis, E.coli O157:H7 y L.monocytogenes y aún a 12.5% contra ésta última.

Malika, Mohamed, y Chakib (2004) recogieron muestras de miel de cuatro plantas diferentes principalmente: Thymus broussonetti Boiss, Origanum vulgare, glóbulos de eucalipto, Euphorbia resinifera y multifloral de diferentes regiones de Marruecos. Las diluciones de miel que realizaron van desde 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 se ensayaron mediante el método de difusión de pozos de agar sobre diversas cepas de bacterias incluyendo E. coli, Staphylococcus aureus, Bacillus y Pseudomonas. Los resultados revelaron que la mayoría de las cepas fueron inhibidas por la dilución 1/2 y 1/4. Las bacterias Gram negativas fueron más sensibles a la miel que las bacterias Gram positivas. No se observaron diferencias entre los diferentes orígenes de la miel (plantas).

Cruzado, Gutiérrez, y Ruiz (2007) en un estudio in vitro establecieron los compuestos químicos y el efecto antibacteriano de la miel de abeja ante bacterias gram positivas y gram negativas comúnmente causantes de enfermedades prevalentes, utilizaron el método de difusión de discos para el efecto de antibiosis, identificaron metabolitos primarios como esteroides, flavonoides, leucoantocianidinas los cuales producen efecto antibacteriano en la miel de abeja. Con respecto a las mieles evaluadas, 87% mostró un efecto inhibitorio sobre Escherichia coli, 84% sobre Salmonella sp. y 80% sobre Pseudomonas aeruginosa , a concentraciones de 50%.

Badawy, Shafii, y Tharwat (2004) utilizaron muestras de miel (miel de trébol egipcio) tratadas térmicamente y almacenadas durante un largo período de tiempo, el contenido de agua disminuyó, se produjo hidroximetil furfural (HMF) y aumentó la concentración, disminuyendo la actividad enzimática. Para estudiar el efecto terapéutico de la miel sobre E. coli y S. typhimurium, se aislaron 25 cepas de E. coil O157: H7 (18,5%) y 49 cepas de S. Typhimurium (36,2%) de 135 muestras tomadas de niños y terneros (30 muestras de heces de niños y 105 muestras de órganos de terneros y frotis de heces). La mayoría de los aislamientos de E. coli O157: H7 y S. typhimurium eran altamente resistentes a la mayoría de los discos antibióticos. In vitro, el efecto antibacteriano de la miel fue más pronunciado en E. bobina O157: H7 que en S. typhimurium.

Abril y Ramírez (2009) determinaron la capacidad antibacteriana, de 37 mieles de la especie Tetragonisca angustula de siete regiones de Colombia, con la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a tres especies de bacterias Gram positivas y tres Gram negativas. La técnica CMI se evaluó en microdiluciones (v/v) al 90%, 45%, 22,5%, 12,3%, 5,6% de miel, contra las cepas Gram negativas Salmonella enterica sp. enterica serovar Typhimurium, ATCC 14028; Escherichia coli, ATCC 31617 y Klebsiella pneumoniae sp. pneumoniae, ATCC 700603 y Gram positivas Bacillus subtilis sp. spizizenii, ATCC 6633; Staphylococcus aureus sp. aureus Rosenbach, ATCC 6538 y Micrococcus luteus Kocuria rhizophila, ATCC

9341. Las mieles analizadas por prueba binomial presentaron efecto bactericida contra todas las cepas bacterianas del ensayo con mayor efectividad para E. coli, M. luteus y S. enterica, con una dilución de 90%.

Efem e Iwara (1992) reportan que el espectro antimicrobiano de miel se investigó colocando dos gotas en cada uno de los pocillos hechos en medio de cultivo en el que se cultivaron cultivos puros de diversos organismos obtenidos a partir de muestras quirúrgicas. Los cultivos fúngicos de hongos comunes que causan infecciones quirúrgicas o contaminaciones de heridas se mezclaron con miel 100%, 50% y 20% sin procesar. La inhibición del crecimiento fue completa en los medios que contenían el 100%, parcial en los medios que contenían el 50% y no se produjo inhibición en el 20% de miel. La miel sin procesar inhibió la mayoría de los hongos y bacterias que causaron la infección de la herida y la infección quirúrgica excepto Pseudomonas aeruginosa y Clostridium oedematiens.

Cooper y Molan (2002) reportan la sensibilidad a la miel natural de 18 cepas de S. aureus meticilina-resistentes aisladas de heridas infectadas y de 20 cepas de enterococos vancomicina-resistentes aisladas de superficies de ambientes hospitalarios en concentraciones de 10% o menos, con el método de concentración mínima inhibitoria.

Subrahmanyam, Hemmady, y Pawar (2001) se probó el efecto antibacteriano de diferentes mieles locales contra varias bacterias aisladas de heridas de quemaduras, incluyendo S .aureus, encontrándose que ninguna de las bacterias aisladas logró crecer en agar Muller-Hinton con concentraciones de 100% de miel. Estos datos son de gran importancia tomando en cuenta dos factores: este es uno de los microorganismos más frecuentemente aislado de heridas infectadas y muchas cepas han desarrollado una gran resistencia a los antibióticos.

Paredes y Poveda (2008) reportan que se observó que el Staphylococcus aureus fue el microorganismo cuyo crecimiento se vio mayormente afectado por la miel, obteniéndose halos de inhibición de 25 mm aún con concentraciones de 50% y de 25% .El 90% de las muestras de miel, a una concentración del 50%, ejercieron un efecto inhibidor sobre S. aureus y S. epidermidis, Las cepas de Staphylococcus fueron susceptibles a muy bajas concentraciones de las mieles ensayadas.

Muñoz et al., (2009) reportan la miel tiene poca actividad antibacteriana contra el Staphylococcus aureus. La actividad antibacteriana de mieles analizadas, procedente de las cuatro zonas del estado de Zulia, se observó que las bacterias ensayadas, resultaron ser inhibidas a nivel de todas las concentraciones 25%, 50%, 75% y 100%, excepto Pseudomona aeruginosa, Steptococcus aureus resultó menos afectada, con diferencias significativas (P<0,001) en relación a las concentraciones de la miel. En concentraciones más altas de miel se encuentra mayor probabilidad de acción bactericida.

Estudios realizados por (Fiorilli, 2015) reportan que se realizaron ensayos con 33 microorganismos diferentes. De ellos, 5 eran cepas de referencia: Escherichia coli ATCC 25922 , Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 , Acinetobacter baumannii ATCC 19606 , Staphylococcus aureus ATCC 25923 , Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 y 28 eran cepas clínicas: Klebsiella pneumoniae portadora de carbapenemasa tipo KPC , Acinetobacter baumannii resistente a carbapenemes portador de carbapenemasa tipo OXA, Acinetobacter junii portador de metalo-beta-lactamasa tipo IMP, Staphylococcus aureus resistente a meticilina y se probaron tres mieles poliflorales, una proveniente de Tandil (provincia de Bs As), marca “Aleluya” y dos producidas en la provincia de San Luis: una envasada directamente del apicultor pero sin marca registrada, de la localidad de Carpintería y otra proveniente de la ciudad de Merlo, marca “La Delfina”. En los casos en que la miel estaba diluida al medio con caldo Mueller Hinton se produjo un descenso de al menos 3 logaritmos en el crecimiento bacteriano comparado con los controles a los que no se les agregó miel,

independientemente de la miel usada. La miel pura diluida al medio con caldo Mueller Hinton resultó bactericida frente a todos los microorganismos ensayados.

Según estudios realizados por (Ordoñez, 2015) se evaluó el efecto antimicrobiano de la miel de abeja en tres distintas concentraciones (100%, 50% y 30%), la cual fue administrada por vía intramamaria en 30 cuartos que resultaron positivos a mastitis subclínica por medio de la prueba de California Mastitis Test (CMT). Al primer grupo se le administró un tratamiento de miel pura (100%), al segundo grupo se le administró un tratamiento con una concentración de 50% de miel y al tercer grupo se le administró un tratamiento con una concentración de 30% de miel. Se realizó un muestreo control para determinar la carga bacteriana inicial y luego muestreos pos tratamientos una vez a la semana durante un mes. Se observó que la miel posee un efecto antimicrobiano reduciendo la cantidad de UFC/ml cuando es administrada por vía intramamaria, lo cual se observó en el primer muestreo post-tratamiento, posteriormente se observó un aumento progresivo de las cargas bacterianas.

En investigaciones realizadas por (Adams, Manley-Harris, y Molan, 2009) se evidenció actividad antimicrobiana en mieles de A. mellifera enfrentadas con las dos bacterias utilizadas a diferentes concentraciones 25%,50%,75% y 100% . La capacidad de inhibición fue mayor contra S. aureus a concentraciones de 50 y 100%. Se determinó que el factor de inhibición de estas mieles es el peróxido de hidrógeno y que esta propiedad se pierde en el tiempo, también se observó que la CMI de las mieles analizadas fue del 50% con un almacenaje de 60 días.

Torrejon y Ureña (2016) En un estudio in vitro evaluaron el efecto antimicrobiano de la miel de abeja en comparación con un antibiótico de uso común para las quemaduras infectadas. También evaluaron el efecto que se producía cuando la miel de abeja se añade a los discos con antibióticos. En el estudio se seleccionó 30 pacientes con infección por quemaduras, se obtuvo microorganismos de aquellas quemaduras y se cultivaron en placas de agar sangre. Los microorganismos aislados fueron inoculados en agar Mueller - Hinton. En conclusión, la miel mostró más

efecto inhibitorio (85,7%) en bacterias gram negativas (Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp, Klebsiella) que los antibióticos de uso común, también se obtuvo un efecto sinérgico de la miel cuando se agregó a los antibióticos para dichas bacterias gram negativas

Fujiwara et al., (1990) Evaluaron la actividad antimicrobiana de nueve mieles venezolanas, en el estudio utilizaron cepas ATCC de Escherichia coli y Staphylococcus aureus. Las mieles se utilizaron concentradas y diluidas (1:2; 1:4; 1:8). Se observó la inhibición del crecimiento de Staphylococcus aureus en todas las mieles utilizadas sin diluir y diluido al 1:2, mientras que no se observó inhibición del crecimiento de las cepas de Escherichea coli a ninguna concentración.

Elijah, Imohiosen, Lamidi, y Umar (2015) reporta que la miel pura utilizada en este estudio reveló la presencia de componentes bioactivos como azúcares reductores, saponinas, glucósidos, alcaloides y flavonoides que tienen efecto tanto bactericida y bacteriostático; utilizaron la miel de abeja pura a una dosis de 0,2 ml contra Staphylococcus aureus, Salmonella typhi, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa dando halos de inhibición de diferentes medidas reportándose que en Staphylococcus aureus formó 24 mm, Salmonella typhi 18 mm, Escherichia coli 30 mm, Klebsiella pneumonia 20 mm, Pseudomonas aeruginosa 22 mm.

Nwankwo, Ezekoye, e Igbokwe (2014) determinaron la actividad antimicrobiana de la miel en aislamientos hospitalarios frescos: Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Candida albicans obtenidos de Glanson Medical Laboratory Awka mediante el método de difusión de pozos. El resultado muestra que la miel producida por mellifera tiene una fuerte actividad antimicrobiana contra E. coli y S. aureus pero no contra C. albicans. El resultado obtenido muestra que la miel produjo una zona de separación de 45 y 34 mm sobre S. aureus y E. coli, respectivamente. El resultado de la concentración inhibitoria mínima (CIM) determinada en cultivo líquido fue de 20% tanto para S. aureus como para E. coli, mientras que la concentración mínima de

concentración bactericida (MBC) de la muestra mostró un 20% y un 30% para S. aureus y E. coli, respectivamente.

Jenkins, Burton, y Cooper (2011) reportaron que el crecimiento de Staphylococcus aureus metilresistente (MRSA) fue inhibido por miel artificial de manuka al 5%, 10% y 20% y miel artificial de 10% que contenía metilglioxal. Se encontró un aumento estadísticamente significativo del número de células que contenían septa y un mayor diámetro de las células (P <0,001 y P <0,001, respectivamente) en MRSA expuesto a miel de manuka al 5%, 10% o 20%, pero no al 10%. de miel artificial con y sin metilglioxal.

2.2. MARCO CONCEPTUAL

2.2.1 Métodos de Sensibilidad Antimicrobiana

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. El antibiograma define la actividad in vitro de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Su resultado, la farmacología del antimicrobiano, en particular en el lugar de la infección, y los aspectos clínicos del paciente y de su infección, sustentan la elección de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Juan J Picazo et al., 2000)

- **Métodos de Difusión**

- **Método del antibiograma Disco-Placa (Kirby- Bauer)**

- **Fundamento**

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición. Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI (Catarina, 2012). Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS (Tabla 1)

TABLA 1. DIÁMETROS DE INHIBICIÓN EXPRESADOS EN (mm)

	CIM ug/ml	**HALOS DE INHIBICIÓN mm**
Sensible	≤4	≥20
Intermedio	8-16	15-19
Resistente	≥32	≤14

Fuente: (NCCLS, 2012)

El término sensible indica que la infección ocasionada por la cepa para la que se ha determinado la CMI o su correspondiente halo de inhibición puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales de antimicrobiano, en función del tipo de infección y de la especie considerada.

El término intermedio indica que el halo de inhibición traducido en valores de CMI se aproxima a las concentraciones de antimicrobiano alcanzables en sangre o tejidos y que puede esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones en las que se alcanzan altas concentraciones de antimicrobiano. Finalmente, el término resistente se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del correspondiente antimicrobiano, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencias específicos para el agente estudiado en los que no ha habido una adecuada respuesta clínica cuando se ha usado como tratamiento el correspondiente antimicrobiano (Carlos Malbrán, 2012)

- **Indicaciones y limitaciones**

El antibiograma está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales. Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido como Enterobacteriaceae,

Pseudomonas spp., Stenotrophomonas maltophilia, Burkholderia cepacia, Acinetobacter spp. , Staphylococcus spp. y Enterococcus spp. Además, con ligeras modificaciones, puede ser aplicado a Haemophilus spp., Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae y Streptococcus spp (Catarina, 2012).

- **Método modificado en pozos de agar**

Es un método de difusión en el cual se realiza pozos con la ayuda de una cuchara sacabocados de 6 mm los agares seleccionados para el correcto crecimiento bacteriano y se coloca el extracto para poder incubarlo a 37 grados centígrados por 24 horas (Rojas, García, & López, 2005)

2.2.2 Miel de abeja (*Apis mellifera*)

La miel de abeja (*Apis mellifera*) se define como la sustancia dulce elaborada por las abejas a partir del néctar de las flores, las cuales recogen, combinan con sustancias específicas, transforman y almacenan en panales para servir posteriormente como alimento energético. La transformación de néctar a miel se produce debido a cambios físicos y químicos. Los primeros se deben principalmente a un proceso de evaporación, en el cual, el néctar pierde hasta una tercera parte de su contenido de humedad durante su almacenamiento en la colmena, y los segundos se deben a la acción de enzimas que las obreras adicionan al néctar, como es la invertasa (sacarasa), la cual hidroliza la sacarosa presente en el néctar a glucosa y fructosa (Chagnon y Gingras, 1993).

Al final de los procesos de transformación, el néctar es convertido en miel, la cual es una solución sobresaturada de azúcares, y una de las mezclas de carbohidratos más complejas producidas en la naturaleza(Swallow y Low, 1990). Contiene además pequeńas cantidades de ácidos orgánicos, aminoácidos, minerales, vitaminas, compuestos fenólicos y compuestos volátiles (Dardón y Enríquez, 2008).

La composición química de la miel depende principalmente de las fuentes vegetales de las cuales se deriva, pero también de la influencia de factores externos, como el clima, el manejo de extracción y almacenamiento (Crane, 1980). Un mal manejo de la miel puede reducir su calidad; los factores que más influyen en ello son las altas temperaturas, el tiempo de almacenamiento y contenido de humedad superior a 21 %, los cuales ocasionan fermentaciones, formación de hidroximetilfurfural (Suárez-Luque, Mato, Huidobro, Simal-Lozano, & Sancho, 2002), pérdida de la actividad enzimática, cambio del sabor, obscurecimiento (Vit & Gutiérrez, 2009) y crecimiento microbiano en la miel (Schocken-Iturrino et al., 1999)

- **Propiedades**

Cook (2007) describe una serie de propiedades de la miel sobre la curación de las heridas: acción antimicrobiana, que estaría dada por la alta osmolaridad de la miel y, principalmente, debido al efecto del peróxido de hidrógeno producido en forma lenta y sostenida por la enzima glucoxidasa, manteniendo un efecto antimicrobiano con una concentración 1.000 veces más alta que un antiséptico usado comúnmente, sin los efectos adversos sobre la cicatrización (Andrades, Sepúlveda, & González, 2002). La acidez de la miel y la acidificación local de la herida previene el efecto nocivo que produce el amoniaco resultante del metabolismo bacteriano, incluso permite una mejor cesión del oxígeno que transporta la hemoglobina.

La miel tiene asimismo cierto poder desbridante del tejido necrótico. La alta osmolaridad que presenta la miel es debida a su elevada concentración de azúcares. Esto le permite extraer suero de los tejidos circundantes por ósmosis creando en la herida un medio ambiente húmedo que favorece la formación del tejido de granulación. Además se promueve el desbridamiento autolítico mediante la conversión del plasminógeno inactivo en la matriz de la herida a su forma activa, la cual es la mayor enzima proteolítica encontrada en la sangre; sería un efectivo desodorizante debido a la metabolización de la glucosa por parte de la bacteria, en

preferencia al tejido necrótico, resultando en la producción de ácido láctico y no en los compuestos malolientes generados de la degradación de proteínas; estimularía la actividad antinflamatoria en las células del cuerpo, mediante la proliferación de linfocitos B y T y la activación de los fagocitos con concentraciones de miel tan reducidas como un 1% (Subrahmanyam et al., 2001). También estimularía a los monolitos y la liberación de citoquinas, el factor de necrosis tumoral [TNF] alfa, interleuquina [IL] -1, e IL-6 (Cooper & Molan, 2002). Estos efectos rápidamente reducirían el dolor, el edema y el exudado y minimizarían la cicatrización hipertrófica.

Del mismo modo, estimularía el desarrollo de nuevos capilares en el tejido herido y la multiplicación celular, lo que llevaría a la estimulación del crecimiento de fibroblastos y células epiteliales, y con ello, a la reparación del daño (Gutiérrez et al., 2005).

- **Efecto Osmótico**

La miel es una solución saturada o super saturada de azúcares, de los sólidos de la miel, el 84% es una mezcla de monosacáridos fructosa y glucosa, la fuerte interacción de éstas moléculas de azúcares con las moléculas de agua dejando muy pocas moléculas de agua disponibles para los microorganismos. Esta agua "libre" es lo que se mide como la actividad del agua (Aw): los valores medios para la miel han sido reportados como 0,562 y 0,58991, 0,572 y 0,60710 y 0,62117. Muchas especies de bacterias tienen su crecimiento completamente inhibido por el aw estar en el intervalo 0,94-0,9960,102 (Cooper & Molan, 2002).

- **Peróxido de Hidrógeno**

El peróxido de hidrógeno se produce enzimáticamente en la miel. La enzima glucosa oxidasa se secreta de la glándula hipofaríngea de la abeja en el néctar para ayudar en la formación de miel del néctar (Al Somal, Coley, Molan, & Hancock, 1994).

El ácido glucónico más agua sirve para preservar la miel. En la dilución de la miel, la actividad aumenta en un factor de 2500 a 50.000, dando así antisépticos de "liberación lenta" a un nivel, que es antibacteriano, pero no daño tisular (Al Somal, Coley, Molan, & Hancock, 1994)

Los factores fitoquímicos han sido descritos como factores antibacterianos no peróxidos, que se cree que son muchos fenoles complejos y ácidos orgánicos a menudo, denominados flavonoides. Estos químicos complejos no se descomponen bajo el calor o la luz o afectados por la dilución de la miel. La estabilidad de la enzima varía en miel diferente. Ha habido reportes de mieles con una estabilidad bien superior a esta variación mostrando que debe haber un factor antibacteriano adicional implicado (es decir, no se descomponen bajo calor o luz ni afectado por dilución). La evidencia más directa de la existencia de factores antibacterianos no peróxidos en la miel se observa en los informes de actividad que persisten en mieles tratadas con catalasa para eliminar la actividad de peróxido de hidrógeno (Willix, Molan, & Harfoot, 1992).

- **pH**

La miel es característicamente ácida con un pH entre 3,2 y 4,5, que es lo suficientemente bajo como para inhibir a muchos patógenos animales (Allen, Molan, & Reid, 1991). Los valores mínimos de pH para el crecimiento de algunas especies patógenas comunes son: Escherichia coli (4.3), Salmonella spp (4.0),Staphylococcus aureus (4,2), Pseudomonas aeruginosa (4.4), Streptococcus pyogenes (4.5) . Así, en la miel no diluida, la acidez es un factor antibacteriano significativo (Finch, 2002).

2.2.3 Staphylococcus aureus

Los estafilococos son un amplio grupo de bacterias Gram-positivas, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras. Se caracterizan porque se dividen en agrupaciones que asemejan racimos de uva (Harris, Foster, & Richards, 2002) y, a la fecha, se han

reportado 35 especies conocidas con 17 subespecies en el género *Staphylococcus*. Dicho género tiene una gran capacidad de adaptación, por lo cual afectan a todas las especies conocidas de mamíferos, incluyendo a los roedores comunes de laboratorio. Es por ello que, gracias a su fácil propagación, pueden transmitirse de una especie a otra, siendo frecuentes los casos humano-animales y viceversa(Hardy, Fox, Rossor, 2009). El más patogénico de ellos es el Staphylococcus aureus, que típicamente causa infecciones de la piel y a veces neumonía, endocarditis y osteomielitis. En general se lo asocia con la formación de abscesos. Algunas cepas elaboran toxinas que causan gastroenteritis, síndrome de la piel escaldada y síndrome de shock tóxico. El diagnóstico se realiza con tinciones de Gram y cultivos.

En los últimos años, la incidencia de bacteremia por Staphylococcus (BS) ha aumentado significativamente, ya que una especie de esta familia bacteriana ha aumentado su frecuencia de aparición; se trata de la especie Staphylococcus aureus, que se ha convertido en la principal causa de infecciones en el torrente circulatorio (BSI) e intoxicaciones ocasionadas por alimentos. De esta manera, al ser una especie bacteriana relativamente común, es natural que surjan investigaciones para mantenerse al tanto de la evolución de este patógeno. Una de las interrogantes, que antes consternaba mucho a los científicos, era cómo podía ser tan fácil la diseminación de esta bacteria. La respuesta está en la gravedad de su virulencia. La patogenicidad de las infecciones por Staphylococcus aureus se relaciona con diversos componentes de la superficie bacteriana (Lina, Piémont, & Godail-Gamot, 1999); de manera general, los componentes del microbio son peptidoglicanos y ácidos teicoicos, además de la proteína A. Así pues, la patogenia provocada por este microorganismo surge cuando se produce la combinación de los factores de virulencia con la disminución de las defensas del huésped (Hardy, Fox, Rossor, 2009); estas condiciones propician que Staphylococcus aureus posea características de virulencia y daño bastante particulares (Bustos-Martínez & Hamdan-Partida, 2006); aunado a esto, la situación se ve agravada debido a que el patógeno ha ido desarrollando múltiple resistencia contra los antibióticos, propiciando que cada vez sea mucho más difícil el tratamiento y la curación de las enfermedades ocasionadas por esta bacteria (Perazzi, Camacho, & Bombicino, 2010)

- **Taxonomía**

Cervantes et al. (2014) clasifican taxonómicamente a la bacteria *Staphylococcus aureus* de la siguiente manera:

TABLA 2.CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Staphylococcus aureus*

CATEGORÍA TAXONÓMICA	CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA
Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacili
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Género	Staphylococcus
Especie	S. aureus

Cervantes et al., 2014

- **Producción de toxinas estafilocócicas**

Staphylococcus aureus es un microorganismo capaz de producir componentes superficiales llamados toxinas y producir enzimas extracelulares. En general, estos componentes son capaces de provocar severas intoxicaciones alimentarias dependiendo de la cantidad ingerida de alimento (Lina et al., 1999)

- **Resistencia a antibióticos**

Muchas cepas de estafilococos producen penicilinasas, enzimas que inactivan varios antibióticos betalactámicos. Estas cepas son resistentes a penicilina G, ampicilina y penicilinas antiseudomónicas. La mayoría de las cepas extrahospitalarias son sensibles a penicilinas resistentes a penicilinasas (como meticilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina), a cefalosporinas, a carbapemicos (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem), a los macrólidos, las

fluoroquinolonas, la asociación trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX), a la gentamicina, la vancomicina y la teicoplanina. (Larry M. Bush & Maria T. Perez, 2016)

- **Enfermedades causadas por Staphylococcus aureus**

Las infecciones causadas por la bacteria *Staphylococcus aureus* por lo general involucran una intensa supuración y necrosis de tejido. Y en general pueden agruparse en infecciones cutáneas localizadas como la foliculitis, forúnculo e impétigo; infecciones de diversas heridas; infecciones profundas que se diseminan a partir de la piel para causar bacteriemia y comprometer huesos, articulación, órganos y tejidos profundos; causan muchos síndromes patológicos como abscesos en la piel, osteomielitis, endocarditis, neumonía y síndrome de shock tóxico. Ya que la cepa de *Staphylococcus aureus* se encuentra colonizando continuamente la piel, está expuesta a todas las terapias con antibióticos surgiendo de ésta manera los microorganismos resistentes (Bae et al., 2004; García, 2006).

2.2.4 Medios de cultivo

- **Agar Mueller**

El agar Mueller-Hinton es un medio sólido estandarizado para pruebas de sensibilidad a antimicrobianos mediante los métodos de difusión en agar o de dilución en agar (Murray y Zeitinger, 1983)

- **Agar Sal Manitol**

Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos.Es recomendado para el aislamiento de estafilococos patogénicos a partir de muestras clínicas, alimentos, productos cosméticos y otros materiales de importancia sanitaria (Cervantes-García, García-González, & Salazar-Schettino, 2014b)

2.2.5 Métodos de estudio de sensibilidad

- **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Es la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos, cuando la CMI sea menor, la susceptibilidad del microoganismo será mayor al fármaco usado (Botana, 2002)

- **Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

Corresponde a la mínima concentración de antibiótico que elimina el 99,9% del número original de bacterias. Refleja la capacidad de un fármaco de disminuir de forma sustancial el número de bacterias (Botana, 2002)

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Ha: Los métodos de sensibilidad antimicrobiana in vitro influyen en el crecimiento de *Staphylococcus aureus subsp. Aureus ATCC 11632* utilizando miel de abeja pura de *Apis mellifera.*

3.2 OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar métodos de sensibilidad en la efectividad antimicrobiana de la miel de abeja sobre cepa certificada de *Staphylococcus aureus*

Objetivos Específicos:

Establecer el método de mayor sensibilidad (Kirby Bauer y Pozos de Agar) a la cepa de *Staphylococus aureus subsp. aureus ATCC® 11632*

Determinar la sensibilidad antimicrobiana mediante el uso de diferentes concentraciones de miel de abeja para establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El proyecto se realizó en el laboratorio de Bacteriología de la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias sector Querochaca

Altitud: 2 865 msnm

Latitud: 1º 22' 2" S

Longitud: 78º 36' 20" W

4.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

El Laboratorio de Bacteriología es un lugar que se encuentra bajo condiciones de ambiente controlado, conservándose a una temperatura promedio de 20ºC y una humedad del 48%.

4.3 EQUIPOS Y MATERIALES

4.3.1 Reactivos

- Agar Mueller
- Agua Peptonada estéril
- Agar Manitol

4.3.2 Agentes Biológicos

- *Staphylococus aureus subsp. aureus ATCC® 11632*

4.3.3 Material Experimental

- 1 litro de Miel de abeja pura de *Apis mellifera*

4.3.4 Materiales de Laboratorio

- Balanza ADAM (Max 150 g d = 0.001 g)
- Microscópio (4x , 10x, 40x, 100 x)
- Vaso de Precipitación (40 ml,100 ml,250 ml)
- Probetas
- Varilla Agitadora
- Estufa
- Espátula
- Pipeta
- Cajas petri
- Cocineta
- Mandil
- Mecheros de vidrio
- Tubo #5 de la escala de Mc Farland
- Tubos de ensayo
- Espátula
- Pipetas volumétricas (1 ml 5 ml y 10 ml)
- Discos de sensibilidad en blanco marcas OXOID
- Pizeta
- Gorros
- Fósforos
- Calculadora
- Masky
- Mascarillas

- Guantes
- Tubos eppendorf
- Cuaderno de apuntes
- Esferos, lápices y borrador

4.3.5 Equipos

- Autoclave automático
- Cámara de flujo laminar vertical
- Incubadora
- Agitador magnético con calentador
- Refrigeradora

4.4. FACTORES EN ESTUDIO

4.4.1 Diluyente

- Agua Peptonada Estéril 100%.

4.4.2 Extracto

- Miel de abeja pura.

- **Obtención del material experimental**

Se recolectó la miel de abeja pura de *Apis mellifera* procedente de la parroquia Santa Rosa Barrio Lomas de Garcés perteneciente a la ciudad de Ambato provincia de Tungurahua y se envasó en vidrio color ámbar cerrado y guardado fuera de la luz hasta su utilización en el experimento.

Posteriormente se la sometió a calentamiento a 170°C por un minuto sobre la hornilla.

- **Determinación del pH de la miel de abeja**

En la práctica la medición del pH se llevó a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea igual o analógico. Ésta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo (solución buffer 7.00 pH). Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación. Posteriormente se determinó el valor del pH de la muestra.

TABLA 3. TÉCNICAS DE CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LA MIEL DE ABEJA

ENSAYO	METABOLITO	PROCEDIMIENTO	RESULTADO
Sudan	Compuestos grasos	Se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente.	+ Presencia de gotas o una película coloreada de rojo
Dragendorff	Alcaloides	Disolver la alícuota del extracto en un solvente orgánico, éste debe evaporarse, en un baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado. Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo	(+) Opalescencia (++) Turbidez (+++) Precipitado.

Baljet	Compuestos con agrupamiento lactónico	Evaporar el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1mL). En estas condiciones se adiciona 1mL de reactivo	(++) Aparición de una coloración (+++) Precipitado rojo
Borntrager	Quinonas	Evaporar el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1mL de cloroformo. Se adiciona 1mL hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5% en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación	Si la fase acuosa alcalina se colorea: (++) Coloración rosada (+++) Coloración roja.
LiebermannBuchart	Triterpenos y/o Esteroides	Se adiciona 1mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.	1. Rosado 2. Verde intenso – visible 3. Verde oscuro – negro
Resinas	Resinas	Adicionar a 2mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada	Precipitado
Fehling	Azúcares reductores	Evaporar el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 – 2 mL de agua. Se adicionan 2mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5 – 10 min la mezcla.	Solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo
Espuma	Saponinas	Diluir con 5 veces su volumen en agua y agitar la mezcla fuertemente durante 5 – 10 min	Si aparece espuma en la superficie del líquido
Cloruro Férrico (FeCl3)	Compuestos fenólicos y/o	Añadir acetato de sodio para neutralizar	Coloración rojo – vino, verde

	taninos	y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica A una alícuota del extracto alcohólico se adiciona el reactivo	intensa, azul
Shinoda	Flavonoides	Diluir con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico, se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen	Cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.

Fuente: Miranda, 2002

- **Obtención del material biológico**

Se obtuvo una cepa certificada de *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC® 11632* .

- **Elaboración de los medios de cultivo**

En el caso del agar Sal Manitol se siguió las especificaciones del Laboratorio, suspendiendo 111.02 g por cada 1000 ml de agua destilada en agitación constante, para luego esterilizar la solución a 121° C en autoclave por 15 minutos. Para el agar Mueller Hinton , se diluyó 38 g en 1000 ml de agua con agitación constante para luego ser esterilizado en autoclave a 121° C por 15 minutos. Mientras que para elaborar el caldo Cerebro - Corazón se usó 37 g por cada 1000 ml de agua destilada.

- **Activación de la cepa**

Se activó la cepa *Staphylococcus aureus subsp.aureus ATCC® 11632* en agar sal manitol, se cultivó mediante el método de estriación escocés y se incubó a 37 ˚C por 24 horas ubicándolos en la incubadora en posición invertida.

- **Preparación del inóculo**

Se tomó con un hisopo estéril 5 colonias bien definidas y se inoculó en 5 mililitros de caldo cerebro corazón, se incubó a 37˚ C, por 2 horas hasta que se observó una turbidez ligeramente visible. Se estandarizó la densidad del inóculo mediante el espectofotómetro a 620 nm comparándola con la turbidez estándar del tubo número 5 de la escala de Mc Farland dando como resultado una suspensión que contiene 1 a 2 X 10^8 Unidades formadoras de colonias (CFU)/ mL (NCCLS, 2012)

- **Elaboración de las concentraciones de la miel de abeja**

Se obtuvo un total de 20 ml de miel de abeja; se realizaron 4 diluciones: 30% (v/v), 50%(v/v), 70% (v/v), y 90% (v/v) con agua destilada (Becerra et al., 2016; Bautista, 2011; Abril et al., 2009). Se transfirió 1 ml del inóculo estandarizado más 1 ml de las concentraciones de miel de abeja, se incubaron a 37°C a 24 horas estableciendo la concentración mínima inhibitoria (CMI), la misma que fue valorada por la falta de turbidez en los tubos, determinación de ésta variable permitió la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) a través de la siembra de los tubos que no presentaron turbidez en agar MacConkey y su interpretación valorada a través del cero crecimiento de colonias en placa.

- **Preparación de los discos**

Se tomó 0,5 mililitros de la miel de abeja pura homogenizada y se impregnó cada disco con la concentración al 100% de miel de abeja durante 24 horas (Becerra et al., 2016).

4.4.3 Métodos de cultivo bacteriano

- **Difusión en agar**

Se embebebió completamente un hisopo estéril del inóculo estandarizado al 0,5 de la escala de Mac Farland y se sembró el inóculo en agar Mueller Hinton estriándose con un hisopo estéril en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie del agar repitiendo el proceso rotando la placa 60° en dos oportunidades más y dejando secar 5 minutos antes de colocar los discos los mismos que se ubicaron con una pinza anatómica estéril, presionando sobre el agar suavemente para permitir su adherencia. Se ubicó los discos en la placa a 15 mm del borde de la misma y se ubicaron los 4 discos impregnados con miel de abeja al 100% en cada placa sumando un total de 24 repeticiones con 4 tratamientos. Y se incubó a 37°C en grupos no mayores a cinco placas durante 24 horas de manera invertida. Se procedió a realizar la lectura de la prueba de sensibilidad por medio de una regleta de medición y se interpretaron los resultados categorizándolos según: sensible (S), intermedio (I), resistente (R) (NCCLS, 2012)

- **Método en pozos modificados de agar**

Se embebebió completamente un hisopo estéril del inóculo estandarizado al 0,5 de la escala de Mac Farland y se sembró el inóculo en agar Mueller Hinton estriándose con un hisopo estéril en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie del agar repitiendo el proceso rotando la placa 60° en dos oportunidades más y dejando secar 5 minutos antes de realizar los pozos con la cuchareta sacabocados de

6 mm, se vertió en cada uno de ellos 50 uL de miel de abeja pura donde se dejó reposar por un tiempo de 30 minutos y se incubó a 37°C por 24 horas; Se realizó la lectura de sensibilidad igual que en el método Kirby Bauer (Abril et al., 2009)

4.5 TRATAMIENTOS

TABLA 4. DISTRIBUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS Y DESCRIPCIÓN DE LOS MISMOS A UTILIZARSE EN LA INVESTIGACIÓN

NÚMERO DE TRATAMIENTOS	REPETICIONES	TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
1	24	T M1C1	Método de Kirby Bauer al 100% Agua Peptonada estéril
2	24	M1C2	Método de Kirby Bauer con 100% Miel de abeja
3	24	T M2C1	Método de pozos modificados de agar con 100% Agua Peptonada estéril
4	24	M2C2	Método de pozos modificados de agar con 100% miel de abeja
TOTAL	96		

4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se analizó los resultados por el método estadístico T de Student para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

4.7 VARIABLES RESPUESTA

Sensibilidad antimicrobiana de dos métodos Kirby Bauer y método de pozos modificados de agar

4.8 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Para la interpretación de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se utilizó el Software Estadístico INFOSTAT 2015.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. RESULTADOS

TABLA 5. PRUEBA T PARA DOS MUESTRAS SUPONIENDO VARIANZAS DESIGUALES.

	KIRBY BAUER	MÉTODO EN POZOS MODIFICADOS DE AGAR
Media	21,16666667	25,04166667
Varianza	9,710144928	7,346014493
Observaciones	24	24
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	45	
Estadístico t	-4,596599912	
P(T<=t) una cola	1,73881E-05	
Valor crítico de t (una cola)	1,679427393	
P(T<=t) dos colas	3,47762E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	2,014103389	

En la tabla 5 se concluye que el método de pozos modificados de agar mostró mayor sensibilidad mediante el uso de miel de abeja de *Apis mellifera* contra la cepa bacteriana de *Staphylococus aureus subsp. aureus ATCC® 11632* al dar en promedio los halos de inhibición de 25,04 mm, mientras que Kirby Bauer formó halos de inhibición en promedio 21,16mm.

TABLA 6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) CON LA MIEL DE ABEJA PURA

CONCENTRACIÓN	CMI DE LA MIEL DE ABEJA
30%	+
50%	+
70%	-
90%	-

Presenta turbidez (+); No presenta turbidez (-)

Con respecto a la tabla 6 la miel de abeja no presentó turbidez a las concentraciones del 70% y 90% confirmando que no existió crecimiento bacteriano, por lo tanto la miel de abeja presenta actividad bactericida a concentraciones altas frente a *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC® 11632* ,siendo la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento de microorganismo (Zamora & Arias, 2011)

TABLA 7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) CON LA MIEL DE ABEJA PURA

CONCENTRACIÓN	CMB DE LA MIEL DE ABEJA
30%	+
50%	+
70%	+
90%	-

Formación de colonias bacterianas (+); Cero crecimiento bacteriano (-)

Con respecto a la concentración mínima bactericida como se muestra en la tabla 7 no existió crecimiento bacteriano en agar Mueller Hinton con la concentración del 90%, concluyendo que la miel de abeja de *Apis mellifera* utilizándola al 90% tiene un efecto bactericida sobre la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC® 11632* (Becerra et al., 2016).

TABLA 8. DETERMINACIÓN DEL pH DE MIEL DE ABEJA PURA

pH	3.42

El pH determinado fue de 3.42, refiriendo que la miel de abeja pura es ácida favoreciendo su potencial bactericida (Orozco, 2013)

TABLA 9. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LA MIEL DE ABEJA PURA

CONSTITUYENTE QUÍMICO	CONFIRMACIÓN
Compuestos grasos	-
Alcaloides	+
Compuestos de agrupamiento lactónico	++
Quinonas	-
Terpenos / esteroides	+
Resinas	-
Azúcares Reductores	+
Saponinas	+
Fenoles	+
Flavonoides	+

+++ Alta presencia de Constituyente

++ Media presencia de Constituyente

+ Baja presencia de Constituyente

- Ausencia de Constituyente

De acuerdo a los resultados expresados en la tabla 9, se determinó la presencia de ciertos componentes bioactivos como: alcaloides, terpenos, azúcares reductores, saponinas, fenoles y flavonoides; y en media presencia compuestos de agrupamiento lactónico y la ausencia de compuestos grasos, resinas, quinonas, información que concuerda con los resultados de (Elijah et al., 2015)

5.2. DISCUSIÓN

En la investigación el método de mayor sensibilidad fue pozos modificados de agar sobre la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC® 11632* mediante el uso de miel de abeja de *Apis mellifera* resultados que se aproximan con la investigación realizada por (Abril & Ramírez., 2009) al usar miel de abeja colocándola en pozos a volúmenes de 100 microlitros, donde *Staphylococcus aureus* posee una probabilidad significativamente alta de ser atacada a altas concentraciones de miel de abeja corroborando éstos resultados (Zamora y Arias, 2011) utilizando el mismo procedimiento concluyen que el método en pozos es sensible al utilizarlo contra *Staphylococcus aureus* a una concentración alta de miel de abeja del género *Meliponini.* Confirmando nuestra investigación, en el estudio realizado por (Rojas et al., 2005) mencionan que es recomendable utilizar el método modificado de pozos en agar para realizar ensayos de actividad antimicrobiana debido a su alta sensibilidad.

La prueba de sensibilidad antimicrobiana con el método Kirby Bauer mediante el uso de miel de abeja pura de *Apis mellifera* sobre *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC® 11632* determinó valores de halos de inhibición entre 15 mm y 28mm, datos que se asemejan a los obtenidos por (Elijah et al., 2015) quien utilizó la miel de abeja al 100% a una dosis de 0.2 ml obteniendo halo de inhibición de 24mm. Resultados similares los obtuvo (Muñoz et al., 2009; Manisha & Shyamapada, 2011) quienes reportan datos de 12 mm, 15 mm y 20 mm mediante el uso de miel de abeja pura. Este mismo comportamiento lo reporta (Paredes & Poveda, 2008) quienes observaron que *Staphylococcus aureus* fue el microorganismo cuyo crecimiento se vió mayormente afectado por la miel, obteniéndose halos de inhibición de 25 mm. Por otro lado (Petit et al., 2006) utilizando diferentes concentraciones de miel de abeja reporta que la cepa *Staphylococcus aureus* fue la que resultó más sensible a la miel de abeja presentando halos de inhibición de 17 mm datos que se aproximan a los realizados por la presente investigación.

La concentración que se utilizó en la investigación fue del 100% ya que según (Lavandera, 2011) la concentración de miel tiene un impacto en la actividad antibacteriana mencionando que cuanto mayor sea la concentración de miel, mayor será su utilidad como agente antibacteriana. De la misma manera (Zamora y Arias,

2011; Efem y Iwara, 1992) destacaron que el 90% de las muestras de miel, a una concentración del 100% ejercieron un efecto inhibidor sobre *Staphylococcus aureus* además muestras de miel diluidas al 25% también presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus*. Sin embargo (Malika, Mohamed y Chakib, 2004) reportan que obtuvieron como resultado que *Staphylococcus aureus* fue inhibida a las concentraciones de 25% y 50% concluyendo que se obtienen buenos resultados a menores concentraciones.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) evidenció un efecto bactericida a la miel de abeja a una concentración del 70% sobre cepa de *Staphylococcus aureus*, siendo éstos resultados diferentes a los reportados por (Abril et al., 2009) al indicar que las mieles del Valle del Cauca probadas frente a *Staphylococcus aureus* posee una probabilidad significativamente alta de ser atacada en concentraciones de miel de 90% y 45% por otro lado (Cooper et al., 2002) en su estudio reportan que los valores mínimos de concentración inhibitoria (MIC) para las cepas de *Staphylococcus aureus* resultaron ser notablemente consistentes ya que ninguna de las cepas fueron inhibidas por el 30% de miel de abeja en agar nutritivo siendo la concentración más alta alcanzable en éste ensayo concluyendo que a mayores concentraciones se obtienen mejores resultados confirmando con lo expuesto en la presente investigación y con la investigación realizada por (Efem & Iwara, 1992) quienes reportan que la inhibición del crecimiento bacteriano fue completa en los medios que contenían miel de abeja al 100%, parcial en los que contenían el 50% y no se produjo inhibición en el 20% de miel.

El resultado de la prueba bioquímica realizada sobre miel de abeja pura como se muestra en la tabla 9 reveló la presencia de algunos componentes bioactivos tales como alcaloides, compuestos de agrupamiento lactónico, terpenos, azúcares reductores y saponinas, mientras que los fenoles, flavonoides, resinas y quinonas están ausentes. Se sabe que éstos compuestos tienen propiedad bactericida como lo menciona (Domingo, 2003) al indicar que el mecanismo de acción de los alcaloides es mediante la intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo así mismo (Elijah *et al.*, 2015) encontraron que las saponinas son unas sustancias bactericidas que actúan a nivel de la pared celular de las bacterias. Además (Pelczar, 1992) menciona que los compuestos esteroidales pueden interferir determinados procesos de síntesis en la célula bacteriana y los terpenos poseen acción depresora

sobre la tensión superficial lo cual, cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana, altera la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias. La ausencia de fenoles y flavonoides se puede dar por ciertos factores como las condiciones climáticas, la temperatura y la fertilidad del suelo.

Los resultados mostrados con la miel de abeja de *Apis mellifera* revelan que se presentó efecto bactericida sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* debido a que la miel es característicamente ácida presentando un pH de 3.42 como se muestra en la tabla 8 que es lo suficientemente bajo para inhibir a varios patógenos bacterianos (Koochak, Seyyednejad, & Motamedi, 2010).

CAPÍTULO VI

6.1. CONLUSIONES

- El método de mayor sensibilidad fue el método en pozos modificados de agar ya que formó halos de inhibición en promedio de 25,46 mm; mientras que Kirby Bauer formó halos menores con un promedio de 21,16 mm.
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) de la miel de abeja de *Apis mellifera* fue a partir del 70% al no observarse presencia de turbidez en el tubo y la concentración mínima bactericida (CMB) fue del 90% ya que se observó cero crecimiento de colonias bacterianas.

6.2. BIBLIOGRAFÍA

Abril, J. A., Ramírez, R. (2009). La miel de abeja y su importancia. Revista Fuente, 2(4), 11-18.

Adams, C. J., Manley-Harris, M., & Molan, P. C. (2009). The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey. *Carbohydrate Research*, *344*(8), 1050–1053. https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.03.020

al Somal, N., Coley, K. E., Molan, P. C., & Hancock, B. M. (1994). Susceptibility of Helicobacter pylori to the antibacterial activity of manuka honey. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *87*(1), 9–12. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8308841

Allen, K. L., Molan, P. C., & Reid, G. M. (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *43*(12), 817–22. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1687577

Andrades, D. P., Sepúlveda, S., & González, Y. E. U. J. (n.d.). Curación avanzada de heridas. Retrieved from http://cirujanosdechile.cl/revista_anteriores/PDF Cirujanos 2004_04/Rev.Cir.4.04.(18).AV.pdf

Badawy, O., Shafii, S., & Tharwat, E. (2004). Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against Escherichia coli O157: H7 and Salmonella typhimurium infection. *Revue Scientifique et*. Retrieved from http://europepmc.org/abstract/med/15861897

Bae, T., Banger, A. K., Wallace, A., Glass, E. M., Aslund, F., Schneewind, O., & Missiakas, D. M. (2004). Staphylococcus aureus virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(33), 12312–12317. https://doi.org/10.1073/pnas.0404728101

Bang, L. M., Buntting, C., & Molan, P. (2003). The Effect of Dilution on the Rate of Hydrogen Peroxide Production in Honey and Its Implications for Wound Healing. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, *9*(2), 267–273. https://doi.org/10.1089/10755530360623383

Basualdo, C., Sgroy, V., Finola, M. S., & Marioli, J. M. (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*, *124*(3–4), 375–381. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.039

Becerra, D; Cabrera, J; Solano, M.(2016). Efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones frente a staphylococcus aureus. Rev Cient Cienc Méd vol.19 no.2

Bustos-Martínez, J., & Hamdan-Partida, A. (2006). reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev*. Retrieved from http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2006/bio064f.pdf

Carlos Malbrán. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Revista de Microbiología*, *32*(2), 1–48. Retrieved from http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf

Catarina, J. (2012). .2. Método de difusión en agar según Kirby Bauer, *3*, 15. Retrieved from http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lcf/aguilar_g_ae/apendiceB.pdf

Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014a). Características generales del Staphylococcus aureus. *Revista Latinoamericana de Pa- Tología Clínica Y Medicina de Laboratorio*, *61*(1), 28–40.

Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014b). Características generales del Staphylococcus aureus. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, *61*(1), 28–40. Retrieved from www.medigraphic.com/patologiaclinica

Chagnon, M., & Gingras, J. (1993). Complementary Aspects of Strawberry Pollination by Honey and IndigenQus Bees (Hymenoptera). *Journal of Economic*. Retrieved from https://academic.oup.com/jee/article-abstract/86/2/416/2215976

Cooper, R., & Molan, P. (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied*. Retrieved from http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2002.01761.x/full

Crane, E. (1980). A book of honey. Retrieved from https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19801408221

Cruzado, L., Gutiérrez, C., & Ruiz, R. (2007). Ensayo químico y efecto de antibiosis in vitro de la miel de abeja sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos. *Rev. Med. Vallejiana*.

Dardón, M., & Enríquez, E. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. *Interciencia*. Retrieved from http://www.redalyc.org/html/339/33913809/

De Salud, M., & Perú, D. (n.d.). MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN Organismo Público Descentralizado de Sector Salud. Retrieved from http://190.102.152.73/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_l sensibilidad.pdf

Domingo, D.; López, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Española Quimioterapia. 16(4):385-393.

Efem, S., & Iwara, C. (1992). The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. *Infection*. Retrieved from http://www.springerlink.com/index/QH855Q55512K1263.pdf

Elijah, Imohiosen, O., Lamidi, & Umar. (2015). Biochemical screening of pure honey and its antibacterial activity on some bacterial isolates compared with a common antibiotics. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention ISSN (Online*, *4*, 2319–6718. Retrieved from www.ijpsi.org

Estrada, H., Gamboa, M. del M., & Chaves, C. (2005). EvaluaciÓn de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia. *Archivos*. Retrieved from http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=17304133

Finch, R. G. (Roger G. . (2005.). *Antibiotic and chemotherapy : anti-infective agents and their use in therapy.*

Fiorilli, M. S., (2015). Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology*

Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(19), 11333–7. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2358464

García, C. (2006). *Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de Staphylococcus aureus con resistencia múltiple (Tesis pregrado)*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torrión-México.

Gutiérrez Samperio, C., Garay, C. C., Sánchez, A. G., & Malagón, J. A. V. (2005). *Cirujano General. Cirujano General* (Vol. 27). [publisher not identified]. Retrieved from http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=4746

Hardy, Fox, Rossor, C. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature*. Retrieved from https://www.nature.com/ng/journal/v41/n10/abs/ng.440.html

Harris, L. G., Foster, S. J., & Richards, R. G. (2002). An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cells & Materials*, *4*, 39–60. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14562246

Jenkins, R., Burton, N., & Cooper, R. (2011). Manuka honey inhibits cell division in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(11), 2536–2542. https://doi.org/10.1093/jac/dkr340

Juan J Picazo, García Rodríguez, J. A., Cantón, R., Elías, J., Sánchez, G., Gómez-Lus, L., … Vila, J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Espana. Retrieved from https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf

Koochak, H., Seyyednejad, S. M., & Motamedi, H. (2010). Preliminary study on the antibacterial activity of some medicinal plants of Khuzestan (Iran). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *3*(3), 180–184. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60004-1

Lavandera Rodríguez, Iván. (2011). Curación de heridas sépticas con miel de abejas. *Revista Cubana de Cirugía*, *50*(2), 187-196.

Lina, G., Piémont, Y., & Godail-Gamot, F. (1999). Involvement of Panton-Valentine leukocidin—producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious*. Retrieved from http://cid.oxfordjournals.org/content/29/5/1128.short

Lu, J., Carter, D. A., Turnbull, L., Rosendale, D., Hedderley, D., Stephens, J., … Harry, E. J. (2013). The Effect of New Zealand Kanuka, Manuka and ClKwakman, P. H. S., te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-GraKwakman, P. H. S., te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D.,

Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Zaat, S. A. J. (2010). How hon. *PLoS ONE*, *8*(2), e55898. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055898

Malika, N., Mohamed, F., & Chakib, E. (2004). Antimicrobial activities of natural honey from aromatic and medicinal plants on antibio-resistant strains of bacteria. *International Journal of*. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Mohamed_Faid/publication/237276328_Antimicrobial_Activities_of_Natural_Honey_from_Aromatic_and_Medicinal_Plants_on_Antibio-resistant_Strains_of_Bacteria/links/551c12e80cf2909047b9c032.pdf

Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *1*(2), 154–60. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6

María Paz Cook. (2007). MIEL EN EL TRATAMIENTO DE HERIDAS: ¿CREENCIA O REALIDAD? *Journal of Medicina*, 81–86. Retrieved from http://www.enfermeriaaps.com/portal/wp-content/uploads/2011/04/Miel-en-el-tratamiento-de-heridas-creencia-o-realidad.pdf

Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., & Henle, T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (Leptospermum scoparium)honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition & Food Research*, *52*(4), 483–489. https://doi.org/10.1002/mnfr.200700282

Mendoza Ticona, Carlos Alberto ; Velasquez Talavera, Renato ; Mercado Diaz, Ludwig ; Ballon Echegaray, Jorge ; Maguiña Vargas, C. (2007). Revista médica herediana : órgano oficial de la Facultad de Medicina "Alberto Hurtado", Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2003000400006

Miranda, L. G., Cristales, R., & FR Miranda, H. (2002). Composición química y valor nutritivo de algunas leguminosas de grano [Phaseolus vulgaris, Vigna unguiculata, Cajanus cajan, Glycine max]. Chemical composition and nutritive value of some leguminous grains [Phaseolus vulgaris, Vigna unguiculata,

Cajanus cajan, Glycine max]. *Turrialba (IICA) v. 26 (4) p. 375-380*.

Muñoz, D., Marín, C. de, Martínez, C., Marval, H., & Zerpa, A. (2009). Prevalence of Staphylococcus aureus, Vibrio spp., and enterobacteria in pepitona, Arca zebra, commercialized in Cumaná, Venezuela. Retrieved from https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/64313

Murray, P. R., & Zeitinger, J. R. (1983). Evaluation of Mueller-Hinton agar for disk diffusion susceptibility tests. *Journal of Clinical Microbiology*, *18*(5), 1269–71. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6643674

(NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standars. 2012. Performance Standars for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. M02-A11. 32(1): 76 p.

Nwankwo, C. M., Ezekoye, C. C., & Igbokwe, S. O. (2014). Phytochemical screening and antimicrobial activity of apiary honey produced by honey bee (Apis mellifera) on clinical strains of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans. *African Journal of Biotechnology*, *13*(23), 2367–2372. https://doi.org/10.5897/AJB2013.13570

Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., & Ola, I. O. (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, *7*(3), 159–65. https://doi.org/10.5555/afhs.2007.7.3.159

Ordoñez, W. (2015). Cinética de degradación térmica de betacianinas, betaxantinas y vitamina C en una bebida a base de jugo de remolacha (Beta vulgaris L.) y miel de abeja. *Scientia Agropecuaria*, *6*(2), 111-118.

Orozco, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., ... & Adhihetty, P. J. (2013). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, *12*(1), 1-222.

Paredes, K y Poveda, L. (2008). Vigilancia y control de Staphylococcus aureus resistente a meticilina en hospitales españoles. Documento de consenso GEIH-SEIMC y SEMPSPH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *26*(5), 285-298.

Pelczar,M., Reid, D. (1992). Microbiología.Editorial Pueblo y Educación. La

Habana.664pp

Perazzi, B., Camacho, M., & Bombicino, K. (2010). Staphylococcus aureus: nuevos y antiguos antimicrobianos. *Revista Argentina de*. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412010000300010

Pérez, C. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Microbiology Hournal*, *32*, 1–48. Retrieved from http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf

Petit, L. C. de, Céspedes, E., & Nava, R. (2006). Actividad antibacteriana no-peróxido de mieles zulianas. *Revista*. Retrieved from http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/28498

Praterner, O., Borges, R., Loyo, N., Galindo, W., Belisario, D., Rodríguez, N., ... & Convit, J. (2006). Comparación de cinco métodos para el diagnostico de leishmaniasis cutánea. *Dermatología Venezolana*, *40*(4)

Rojas, J. J., García, A. M., & López, A. J. (2005). EVALUACIÓN DE DOS METODOLOGÍAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINALES (Evaluation of two methodologies to determine the antimicrobial activity of medicinal plants), *4*(2). Retrieved from http://www.redalyc.org/pdf/856/85640204.pdf

Schocken-Iturrino, R. P., Carneiro, M. C., Kato, E., Sorbara, J. O. ., Rossi, O. D., & Gerbasi, L. E. . (1999). Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *24*(3), 379–382. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01309.x

Simon, A., Traynor, K., Santos, K., Blaser, G., Bode, U., & Molan, P. (2009). Medical Honey for Wound Care—Still the “Latest Resort”? *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *6*(2), 165–173. https://doi.org/10.1093/ecam/nem175

Soledad Prat M Lab Susceptibilidad Sección Bacteriología, T. M. (n.d.). PRUEBA

DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR. Retrieved from http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf

Souza, B., Roubik, D., Barth, O., & Heard, T. (2006). Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. *INTERCIENCIA*-. Retrieved from http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/16271

Suárez-Luque, S., Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., & Sancho, M. T. (2002). Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *955*(2), 207–214. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00248-0

Subrahmanyam, M., Hemmady, A., & Pawar, S. (2001). Antibacterial activity of honey on bacteria isolated from wounds. *Ann Burns Fire Disasters*. Retrieved from http://www.medbc.com/annals/review/vol_14/num_1/text/vol14n1p22.htm

Swallow, K., & Low, N. (1990). Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food*. Retrieved from http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf00099a009

Torrejon, D. B., & Ureña, J. C. (2016). Efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones frente a staphylococcus aureus. *Revista Científica*. Retrieved from http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1817-74332016000200007&script=sci_arttext&tlng=es

Varaldo, P. E. (2002). Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *50*(1), 1–4. https://doi.org/10.1093/jac/dkf093

Vit, P., & Gutiérrez, M. (2009). Comparación de mieles producidas por la abeja yateí (Tetragonisca fiebrigi) en Argentina y Paraguay. *Acta Bioquímica*. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572009000200007&script=sci_arttext&tlng=pt

Viviana Gamboa Abril, M., & Ramírez., F. (2009). PODER ANTIBACTERIAL DE MIELES DE Tetragonisca angustula, VALORADA POR CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Antibacterial Power Of Honeys From Tetragonisca angustula Assessed By Minimum Inhibitory Concentration. *Scielo*, 20–28.

Retrieved from http://search.proquest.com/docview/1677391471?pq-origsite=gscholar

Willix, D. J., Molan, P. C., & Harfoot, C. G. (1992). A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *The Journal of Applied Bacteriology*, *73*(5), 388–94. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1447054

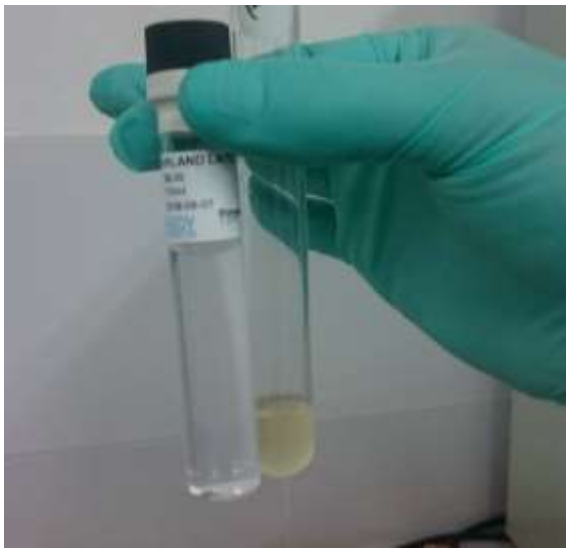
Zamora, L., & Arias, M. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Rev Biomed*. Retrieved from http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2011/bio112c.pdf

Zurita, R., Corso, A., Gagetti, P., Faccone, D., Galas, M., & MRSA, G. C. (2002). Detección de meticilino-resistencia en Staphylococcus aureus: Comparación de métodos convencionales y aglutinación con mrsa-Screen latex. *Revista argentina de microbiología*, *36*(1), 36-40.

6.3. ANEXOS

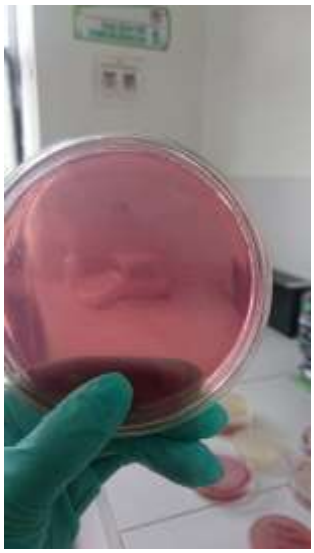
Anexo 1. Cepa Certificada de *Staphylococcus aureus*

Anexo 1. Siembra de la cepa activada de *Staphylococcus aureus*



Anexo 2. Comparación del inóculo con el tubo N°5 de la escala de Mac Farland

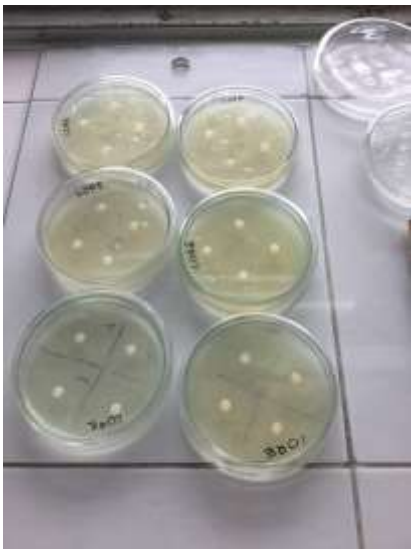
Anexo 3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria al 30%,50%,70% y 90% de miel de abeja de *Apis mellifera* sobre cepa certificada de *Staphylococcus aureus*



Anexo 4. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida en agar MacConkey con el 90% de Miel de abeja de *Apis mellifera* sobre cepa certificada de *Staphylococcus aureus*

Anexo 5. Colocación de miel de abeja de *Apis mellifera* sobre los discos

Anexo 6. Colocación de Agua peptonada estéril sobre los discos como tratamiento testigo



Anexo 7. Colocación de los discos impregnados de miel de abeja de *Apis mellifera* sobre agar muller previamente sembrado con la cepa certificada de *Staphylococcus aureus*.

Anexo 8. Medición de halos de inhibición por medio del método Kirby Bauer

Anexo 9. Medición de halos de inhibición por medio del método pozos de agar

	M1C2	M2C2
R1	23mm	27 mm
R2	21mm	22 mm
R3	18mm	26 mm
R4	19mm	25 mm
R5	21mm	23 mm
R6	22mm	20 mm
R7	17mm	25 mm
R8	22mm	24 mm
R9	18 mm	30 mm
R10	15 mm	26 mm
R11	16 mm	25 mm
R12	20 mm	28 mm
R13	25 mm	25 mm
R14	24 mm	26 mm
R15	20 mm	24 mm
R16	21 mm	25 mm
R17	21 mm	24 mm
R18	21 mm	18 mm
R19	22 mm	25 mm
R20	21 mm	23 mm
R21	28 mm	28 mm
R22	26 mm	28 mm
R23	25 mm	25 mm
R24	22mm	29 mm

Anexo 10. Halos de inhibición formados por M1C2 (Kirby Bauer) y M2C2 (Pozos modificados de Agar)

CAPÍTULO VII

PROPUESTA

Recomendar la utilización del método en pozos modificados de agar para determinar la sensibilidad bacteriana de *Staphylococcus aureus*.

7.1. DATOS INFORMATIVOS

La institución involucrada en la presente propuesta es la Universidad Técnica de Ambato en el laboratorio de bacteriología.

7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTAS

Hoy en día antibióticos utilizados comúnmente como (tetraciclinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y macrólidos) se encuentran en peligro de perder su eficacia debido al aumento de la resistencia microbiana que desarrolla el sistema inmunológico (Mayers *et al.*, 2009). Actualmente, su impacto es considerable con los fracasos de tratamiento asociados con bacterias multirresistentes y se ha convertido en una preocupación mundial para la salud pública (Guschin *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2015).

La emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento en los últimos años del número de publicaciones, relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana (Redo *et al.*, 1989; Silver, 1993). Por esta razón los ensayos de susceptibilidad están indicados para apoyar la terapia antimicrobiana en procesos infecciosos por bacterias en las que la identidad del microorganismo no es suficiente para predecir en forma confiable su sensibilidad; los mecanismos de resistencia incluyen la producción de enzimas inactivantes de la droga, que alteran el objetivo, o alteran la acción del agente etiológico (Pérez, 2012).

7.3. JUSTIFICACIÓN

En base a los resultados de la investigación el método en pozos modificados de agar es recomendable utilizar debido a que en el presente caso el extracto está en contaco directo con la bacteria , formó halos de inhibición superiores a los del otro método utilizado, y los resultados se observan a las 18 horas de incubación de las muestras optimizando tiempo y calidad de resultados

7.4. OBJETIVO

Utilizar el método en pozos modificados de agar para medir la sensibilidad de *Staphylococcus aureus*

Determinar el tiempo de la formación de halos de inhibición

7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

Considerando los aspectos según el requerimiento que se desea obtener el resultado a nivel de laboratorio se puede decir que es un método en el cual el tiempo de formación de halos es el más óptimo a nivel de exámenes que se requieran realizar.

7.6. FUNDAMENTACIÓN

En la actualidad investigaciones se centran en terapias alternas mediante la utilización de extractos microbianos, plantas, aceites esenciales, puros metabolitos secundarios y nuevas moléculas sintetizadas como agentes antimicrobianos potenciales (Runyoro *et al.*, 2006; Nazzaro *et al.*, 2013).

Se puede utilizar una variedad de métodos de laboratorio para evaluar o analizar la actividad antimicrobiana *in vitro* de un extracto o un compuesto puro. Varios bioensayos como la difusión en disco, la difusión de pozos y la dilución en caldo o en agar son de uso común, pero otros como los métodos cytofluorométricos y bioluminiscentes de flujo no son ampliamente utilizados porque requieren equipo especificado y una evaluación adicional para reproducibilidad y estandarización (Balouri *et al.*, 2016).

7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO

Se toma un hisopo estéril del inóculo estandarizado al 0,5 de la escala de Mac Farland y se siembra el inóculo en agar Mueller Hinton estriándose con un hisopo estéril en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie del agar repitiendo el proceso rotando la placa 60° en dos oportunidades más y dejando secar 5 minutos antes de realizar los pozos con la cuchareta sacabocados de 6 mm, se vierte en cada uno de ellos 50 uL de miel de abeja pura donde se dejó reposar por un tiempo de 30 minutos y se incubó a 37°C por 24 horas; Se realizó la lectura de sensibilidad igual que en el método Kirby Bauer (Abril *et al*., 2009)

7.8. ADMINISTRACIÓN

La Universidad Técnica de Ambato mediante la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia así como el laboratorio de Bacteriología serán responsables de la realización de ésta propuesta que pueda llevar a una mejor expresión de los resultados a nivel de laboratorio

7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Mediante la realización de la propuesta se podrá dar una mejor interpretación de resultados, disminuyendo el tiempo de espera de formación de halos.