



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE MIELES DE MELIPÓNIDO FRENTE  
A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, MRSA, *STAPHYLOCOCCUS*  
*EPIDERMIS* Y *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EN RELACIÓN AL  
ANTIBIÓTICO COMERCIAL

AUTOR

ISABEL SOFÍA SROLIS ANDRADE

AÑO

2020



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE MIELES DE MELIPÓNIDO FRENTE  
A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *MRSA*, *STAPHYLOCOCCUS*  
*EPIDERMIDIS* Y *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EN RELACIÓN AL  
ANTIBIÓTICO COMERCIAL.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Médico Veterinario Zootecnista.

Profesor Guía

Dr. David Francisco Andrade Ojeda

Co tutor

MSc. Irina Villacrés Granda

Autor

Isabel Sofía Srolis Andrade

Año 2020

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Actividad antimicrobiana de mieles de melipónido frente a *Staphylococcus aureus*, *mrsa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae* en relación al antibiótico comercial, a través de reuniones periódicas con el estudiante Sofía Isabel Srolis Andrade, en el semestre 202020, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

A handwritten signature in blue ink, reading "David Francisco Andrade Ojeda", written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

MVZ. David Francisco Andrade Ojeda

C.I. 1712693165

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Actividad antimicrobiana de mieles de melipónido frente a *Staphylococcus aureus*, *mrsa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae* en relación al antibiótico comercial, del Sofía Isabel Srolis Andrade, en el semestre 202020, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



---

Dra. Claire Muslin

PhD en Virología

C.I. 1759007733

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Sofía Srolis

---

Sofía Isabel Srolis Andrade

C.I. 1716821051

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Madre y hermana Paulina por el apoyo constante e incondicional durante toda mi carrera universitaria.

A mi tutor David Andrade por la ayuda y dedicación para la elaboración de este proyecto y al equipo de Investigación de la UDLA por abrirme sus puertas y especial colaboración por parte de Irina Villacrés como co tutora del proyecto.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo va dedicado a mi papá Winston, que desde el cielo guía mis pasos y me da fuerza para lograr todas mis metas.

## RESUMEN

La miel de abeja se ha estudiado por poseer efectos antibacterianos frente a diferentes microorganismos, la miel más estudiada es la de abeja con aguijón del género *Apis Mellifera* la cual posee grandes efectos antimicrobianos.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón del grupo Meliponini en comparación con la actividad antimicrobiana de un antibiótico comercial para el tratamiento alternativo de bacterias asociadas a mastitis bovina, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae*.

Se utilizaron muestras de miel de 5 provincias y se realizaron diluciones de la misma al 20%, 15%, 10%, 8%, 5% y 3%, y se realizaron pruebas de concentración mínima inhibitoria. Se realizó el mismo procedimiento con los cultivos bacterianos sometidos al antibiótico comercial en dosis sensible y resistente según el manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y se llevó a cabo la prueba de concentración mínima inhibitoria.

Como resultados se observó resistencia de las cuatro bacterias en estudio hacia el antibiótico comercial, por otro lado la miel presentó una actividad antibacteriana en contra de las cuatro bacterias y se evaluó a través de la concentración mínima inhibitoria donde se identificó la mínima dilución de miel de abeja capaz de tener efectos inhibitorios sobre el crecimiento bacteriano. La bacteria que mayor sensibilidad presentó frente a la miel fue *Staphylococcus epidermidis* la cual presentó muerte desde la menor dilución de miel hasta obtener el 100% de inhibición con las diluciones más altas. Todas las bacterias en estudio fueron inhibidas por el tratamiento con la miel de abeja, dando como

resultado que la miel de abeja podría ser utilizada como alternativa de antibióticos para el tratamiento de bacterias asociadas a mastitis bovina.

## ABSTRACT

Bee honey has been studied for its antibacterial effects against different microorganisms, the most studied honey is the one of bee with Sting of the *Apis mellifera* gender which has great antimicrobial effects.

The present study aims to evaluate the antimicrobial activity of honey from stingless bee of the Meliponini group in comparison with the antimicrobial activity of a commercial antibiotic for the alternative treatment of bacteria associated with bovine mastitis, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistan *Staphylococcus aureus*.

Honey samples from 5 provinces were used and diluted to 20%, 15%, 10%, 8%, 5% and 3%, and minimum inhibitory concentration (MIC) tests were performed. The same procedure was performed with the bacterial cultures submitted to the commercial antibiotic with sensitive and resistant doses according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) manual and the minimum inhibitory concentration test was carried out.

As results, resistance of the four bacteria under study towards the commercial antibiotic was observed, on the other hand the antibacterial activity of honey was evaluated through the minimum inhibitory concentration where the minimum dilution of bee honey capable of having inhibitory effects on the bacterial growth was identified. The bacterium which presented the greatest sensitivity against honey was *Staphylococcus epidermidis*, which presented death from the lowest dilution of honey until obtaining 100% inhibition with the highest dilutions. All the bacteria in study were inhibited by the treatment with the bee honey, giving as result that the bee honey could be used as alternative of antibiotics for the treatment of bacteria associated to bovine mastitis.

# INDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos .....	3
1.1.1 Objetivo General.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
1.2 Hipótesis.....	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO:.....	5
2.1 Miel .....	5
2.1.1 Composición bromatológica de la miel.....	5
2.1.2 Características fisicoquímicas de la miel .....	7
2.1.3 Miel de abeja sin aguijón .....	9
2.1.4 Propiedades terapéuticas .....	10
2.2 Mastitis Bovina .....	12
2.2.1 Mastitis Clínica .....	13
2.2.2 Mastitis Subclínica.....	14
2.2.3 Fisiopatología de la glándula mamaria.....	14
2.2.4 Principales patógenos causantes de mastitis bovina .....	16
2.2.5 Diagnóstico.....	17
2.3 Microorganismos Bacterianos.....	18
2.3.1 <i>Staphylococcus Aureus</i> .....	19
2.3.2 <i>Staphylococcus Aureus</i> Resistente a Meticilina .....	20
2.3.3 <i>Staphylococcus Epidermidis</i> .....	21
2.3.4 <i>Streptococcus Agalactiae</i> .....	22
2.4 Pruebas de Susceptibilidad antimicrobiana .....	23
2.4.1 Prueba de difusión por disco .....	24
2.4.2 Pruebas CIM, Concentración Mínima Inhibitoria.....	24
CAPÍTULO III. Materiales y Métodos .....	26
3.1 Delimitación Geográfica .....	26
3.2 Población y Muestra.....	26
3.3 Materiales .....	27
3.3.1 Materiales de Oficina .....	27
3.3.2 Materiales de Laboratorio .....	27
3.3.3 Equipos de Laboratorio.....	28

3.3.4 Insumos de Laboratorio .....	28
3.3.5 Bacterias utilizadas .....	28
3.4 Variables .....	29
3.5 Metodología .....	30
3.5.1 Dilución de miel .....	30
3.5.2 Dilución antibiótico .....	31
3.5.3. Cultivo de microorganismos .....	32
3.5.4 Concentración mínima inhibitoria (CIM) de miel .....	33
3.5.5 Concentración mínima inhibitoria (CIM) de antibiótico .....	35
3.5.6 Codificaciones .....	36
3.5.7 Cálculo MIC .....	37
CAPÍTULO IV. Resultados y Discusión .....	38
4.1 Resultados bivariados .....	38
4.1.1 Comparación efecto inhibitorio de bacterias y la dilución de miel al 3% .....	42
4.1.2 Comparación efecto inhibitorio de bacterias y la dilución de miel al 5% .....	42
4.1.3 Comparación efecto inhibitorio de bacterias y la dilución de miel al 8% .....	43
4.1.4 Comparación efecto inhibitorio de bacterias y la dilución de miel al 10% .....	44
4.1.5 Comparación efecto inhibitorio de bacterias y la dilución de miel al 15% .....	45
4.1.6 Comparación efecto inhibitorio de bacterias y la dilución miel al 20% .....	45
4.1.7 Relación porcentual de muerte y crecimiento bacteriano en relación a dilución de miel y antibiótico .....	46
4.2 Resultados MIC .....	42
4.3 Discusión .....	51
4.4 Limitantes .....	60
CAPÍTULO V. Conclusiones y recomendaciones .....	62
5.1 Conclusiones .....	62
5.2 Recomendaciones .....	64
REFERENCIAS .....	65
ANEXOS .....	72

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Codificación de muestras de miel.....	26
Tabla 2 Variables .....	29
Tabla 3 Pesaje de miel según dilución .....	30
Tabla 4 <i>Puntos de corte Penicilina</i> .....	31
Tabla 5 Codificaciones de muestras .....	36
Tabla 6 Concentración mínima inhibitoria de la concentración de miel en las diferentes muestras para <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	38
Tabla 7 <i>Concentración mínima inhibitoria de la concentración de miel en las diferentes muestras para Staphylococcus epidermidis</i> .....	39
Tabla 8 <i>Concentración mínima inhibitoria de la concentración de miel en las diferentes muestras para Staphylococcus aureus ATCC</i> .....	40
Tabla 9 <i>Concentración mínima inhibitoria de la concentración de miel en las diferentes muestras para Staphylococcus aureus resistente a meticilina</i> .....	41
Tabla 10 Análisis del efecto inhibitorio de la dilución de la miel al 3%.....	42
Tabla 11 <i>Análisis del efecto inhibitorio de la dilución de la miel al 5%</i> .....	42
Tabla 12 Análisis del efecto inhibitorio de la dilución de la miel al 8%.....	43
Tabla 13 Análisis del efecto inhibitorio de la dilución de la miel al 10% .....	44
Tabla 14 Análisis del efecto inhibitorio de la dilución de la miel al 15%.....	45
Tabla 15 Análisis del efecto inhibitorio de la dilución de la miel al 20% .....	45
Tabla 16 Porcentaje de crecimiento y muerte de <i>Streptococcus agalactiae</i> en las diferentes diluciones de miel y antibiótico .....	46
Tabla 17 Porcentaje de crecimiento y muerte de <i>Staphylococcus epidermidis</i> en las diferentes diluciones de miel y antibiótico .....	47
Tabla 18 <i>Porcentaje de crecimiento y muerte de Staphylococcus aureus ATCC en las diferentes diluciones de miel y antibiótico</i> .....	48
Tabla 19 <i>Porcentaje de crecimiento y muerte de MRSA en las diferentes diluciones de miel y antibiótico</i> .....	49

## **INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Composición de la miel de abejas .....	6
Figura 2 Estándares de composición de miel de abeja sin aguijón y con aguijón .....	10
Figura 3 Alveolo: Estructura Funcional del Tejido Mamario .....	15
Figura 4 Placa de microtitulación con diluciones de miel.....	34
Figura 5 Concentraciones de antibiótico en microplacas.....	36

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La miel de abeja ha sido utilizada en varios estudios microbiológicos y a nivel de campo para el análisis de sus componentes y propiedades naturales. Se han logrado evidenciar a través de estudios de investigación los beneficios de esta sustancia los cuales se han descrito como propiedades antibacterianas, antiinflamatorios, antioxidantes entre otras (Mandal & Mandal, 2011).

Con respecto a su propiedad antibacteriana se han desarrollado estudios para comprobar su efecto antibacteriano frente a infecciones en diferentes patologías, una de ellas la evaluación como antibacteriano utilizado en tratamiento para la afección de mastitis bovina. Se han realizado estudios de campo utilizando miel de abeja intramamaria en los bovinos que presentan esta infección bastante común en la ganadería de leche. Recientemente se utilizaron tres diferentes concentraciones de miel de abeja intramamaria en vacas que presentaban mastitis subclínica, en cuyos resultados se identificó que la miel de abeja reduce la cantidad de microorganismos presentes en muestras de leche de las vacas problema, con una efectividad mayor de las diluciones más concentradas de miel (Carpio, 2018). Otro estudio se realizó para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* en infecciones originadas por *Clostridium perfringens*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida tropicalis* y *Aspergillus brasiliensis* con tres diferentes tipos de miel de abeja. Se identificó que todas las mieles poseen un efecto en la inhibición del crecimiento bacteriano con respecto a los microorganismos en estudio (Vargas, 2016).

El presente estudio se desarrolló con mieles de abejas Meliponas. Estas abejas son consideradas abejas de tierra y no poseen aguijón a diferencia de las abejas comunes *Apis mellifera*. La cría de este tipo de abejas se la conoce como Meliponicultura la cual se encuentra en menor actividad que la apicultura, la cría de abejas comunes.

Se describe que la miel de melipónidos tiene una potencia inhibitoria del crecimiento bacteriano. De igual manera las abejas de esta especie y *Apis mellifera* poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa* (Anthimidou & Mossialos, 2013). En estudios se ha comprobado que la miel de abejas meliponas posee un mayor efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* (Baltrusaitė, Venskutonis, & Ceksteryte, 2007). Los patógenos anteriormente mencionados forman parte del grupo de microorganismos más comunes presentes en la mastitis bovina.

La mastitis es una patología la cual se la describe como una inflamación de la glándula mamaria independientemente de su causa. Esta condición puede ser causada por varios factores como cambios físicos, químicos, bacteriológicos y cambios patológicos del tejido glandular de la ubre. Con respecto a los cambios bacteriológicos que pueden ocasionar la mastitis se debe principalmente a la presencia de distintos microorganismos patógenos los cuales colonizan el tejido glandular y producen la inflamación (Ruiz, 2006).

Existen varios microorganismos descritos para esta patología, los más frecuentemente encontrados son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae* (Andresen, 2001). Con estos microorganismos se desarrolló la siguiente investigación, la cual se basa en la valoración de la capacidad antibacteriana de la miel de melipónidos en diferentes diluciones frente a estos microorganismos.

La patología mencionada anteriormente tiene una gran importancia en el campo en las producciones de ganadería lechera, esta condición es una de las principales causantes de grandes pérdidas económicas por varios factores que afectan al animal como descenso en la producción de leche, desecho de la leche, costo del tratamiento, entre otros.

El motivo principal para llevar a cabo esta investigación se debe a evaluar la posibilidad de utilizar la miel de abeja de Melipónidos en sustitución a los antibióticos comerciales que se utilizan en estas patologías. Con esta alternativa natural disminuirían los costos de los tratamientos en ganaderías lecheras, los residuos de medicamentos como los antimicrobianos no estarían presentes en la leche que va directamente al consumo humano y la reducción de la longevidad de los animales por estar expuestos a varios tratamientos con fármacos a lo largo de su vida.

Esta investigación tendrá varios beneficiarios como es en el área del campo a ganaderos, médicos veterinarios y zootecnistas dedicados a la producción y para futuras investigaciones relacionadas al tema.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo General**

Identificar la actividad antimicrobiana de miel de Melipónido frente a bacterias *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae* en relación a la sensibilidad de un antibiótico comercial, en el laboratorio de investigación Udla Queri.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Evaluar los efectos antimicrobianos que posee la miel de abeja de Melipónido en las diferentes concentraciones que se prepararon con una solución amortiguadora al 20%, 15%, 10%, 8%, 5% y 3%.

- Comparar los efectos antimicrobianos de la miel de abeja de Melipónido en relación con el antibiótico comercial que se utilizó para el estudio.
- Identificar el uso de la miel como un tratamiento alternativo al uso de antibióticos en infecciones causadas por los microorganismos *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae*.

## 1.2 Hipótesis

Existe diferencia en la actividad antimicrobiana de miel de Melipónido en relación a *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae* comparando con la sensibilidad hacia el antibiótico comercial.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO:**

### **2.1 Miel**

La miel de abeja está determinada por el código alimentario del CODEX como un líquido dulce natural procedente de las abejas del género *Apis mellifera*, cuyo origen es del néctar de las plantas, secreciones de segmentos vivos de las plantas o excreciones de insectos (CODEX, 1981). El polen recogido se transforma en miel cuando las abejas enriquecen el mismo con enzimas, ácidos y albúminas que son producidas por las mismas abejas y es almacenada en celdillas hexagonales de los panales donde sufren un proceso de maduración y deshidratación hasta obtener un porcentaje de humedad de 18% haciendo que el néctar espese y se transforme en miel (Venancio, 2011).

La apicultura es conocida principalmente por la cría de abejas *Apis mellifera*. Estos insectos son considerados de gran importancia para recuperar, estabilizar y conservar los ecosistemas. Esta producción en varios países constituye un gran potencial de ganancias económicas ya que ésta contribuye con varios beneficios además de la miel como el polen, cera, jalea real, propóleo y toxina de abeja los cuales se consiguen de producciones artesanales e industriales (Insuasty, Martínez, & Jurado, 2016).

#### **2.1.1 Composición bromatológica de la miel**

La composición principal de la miel son los carbohidratos de los cuales los más destacados son la fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa, también posee otras sustancias como enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, antioxidantes, vitaminas y minerales. La constitución de la miel dependerá de diferentes elementos relativos al clima, al suelo, tipo de planta y composición de los néctares de los cuales provienen (Asís, 2007).

Los carbohidratos son el principal constituyente de la miel de abeja, dentro de éstos se encuentran principalmente azúcares monosacáridos (fructosa y

glucosa) los cuales constituyen el 85% de los sólidos. Aproximadamente posee el 0,5% de proteína tales como enzimas y aminoácidos, los más habituales son la prolina, ácido glutámico, alanina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina. Los aminoácidos presentes indican el contenido de nitrógeno presente en la miel el cual no supera el 0,04%. La acidez que caracteriza a la miel se da gracias a los ácidos orgánicos presentes, el más prevalente es el ácido glucónico. Los mismos que son responsables del bajo pH de la miel que se encuentra entre 3,5 a 5,5 y de la buena estabilidad de la misma. Por otro lado, el compuesto mineral de esta sustancia varía mucho, siendo la cantidad de potasio diez veces mayor que la cantidad de sodio, calcio y magnesio (Insuasty, Martínez, & Jurado, 2016).

A continuación se muestra la media de componentes presentes en la miel de abeja *Apis Mellifera* (Figura1).

Componentes	Media	Valores extremos
Agua, g .....	18,60	17,50 - 20,60
Proteínas, g .....	0,38	0,30 - 0,50
Grasas, g .....	0 0	0 - 0
Hidratos de carbono, g .....	75,10	0 - 0
Minerales, g .....	0,22	0,20 - 0,24
Sodio, mg .....	7,40	4,80 - 10,00
Potasio, mg .....	47,00	43,00 - 50,00
Magnesio, mg .....	5,50	0 - 0
Calcio, mg .....	4,50	3,60 - 5,00
Manganeso, microg .....	30,00	0 - 0
Hierro, mg .....	1,30	0,90 - 2,00
Cobre, microg .....	90,00	0 - 0
Níquel, microg .....	5,50	3,00 - 8,00
Cromo, microg .....	29,00	0 - 0
Fósforo, mg .....	18,00	16,00 - 20,00
Boro, mg .....	0,33	0 - 0
Caroteno .....	0 0	0 - 0
Vitamina «K», microg .....	25,00	0 - 0
Vitamina «B <sub>1</sub> », microg .....	3,00	2,00 - 4,00
Vitamina «B <sub>2</sub> », microg .....	50,00	20,00 - 100,00
Niacina, mg .....	0,13	0,10 - 0,20
Vitamina «C», mg .....	2,40	1,00 - 4,00
Glucosa, g .....	33,90	26,30 - 39,80
Fructosa, g .....	38,80	35,90 - 42,10
Sacarosa, g .....	2,37	1,71 - 2,99

Figura 1. Composición de la miel de abejas *Apis mellifera*. Adaptada de (Tablas, 1987)

## **2.1.2 Características fisicoquímicas de la miel**

### **2.1.2.1 Propiedades físicas**

#### **– Color**

Varía según el tipo de flora de la cual las abejas son alimentadas (Vit, Gonzáles, Sorroza, & R. M, 2016). El color de la miel está vinculado a varios elementos que son la flora, composición del néctar, temperatura y tiempo de almacenamiento. Este es un parámetro de gran importancia ya que participa directamente con el área comercial para la determinación del precio de la misma (Gutiérrez, 2016).

#### **- Conductividad Eléctrica**

La conductividad eléctrica se encuentra directamente relacionado con la existencia de sales minerales, proteínas, ácidos orgánicos y azúcares. Se reconoce una cercana correlación de la conductividad eléctrica y el porcentaje de cenizas presentes (Sanz & Sanz, 1994).

#### **- Humedad**

Contenido de agua, posee una gran influencia en la viscosidad, peso y sabor. También cumple un rol significativo en el sabor, conservación y solubilidad de la miel (Gutiérrez, 2016). Según la norma del codex alimentarius ésta no debería superar el 21% de humedad (CODEX S. , 1987).

#### **- Sólidos insolubles**

Partículas que pueden ser material vegetal, polen, insectos. Con este parámetro se permite evaluar el grado de impureza de la miel. La capacidad máxima de los sólidos insolubles es 0,1 g/100 g (STAN, 1987).

### 2.1.2.2 Propiedades químicas

#### - pH

Se refiere a la condensación de iones hidrógeno del contenido, en la miel por la norma del CODEX se permite una acidez de 40 meq/1000g de miel (CODEX S. , 1987). El pH puede causar cierto tipo de características como resistencia, textura y estabilidad, la miel posee un pH que oscila entre 3,3 y 4,9 según la miel (Ulloa, Mondragón, Rodríguez, Reséndiz, & Rosas, 2007 y Zandamela, 2008).

#### - Acidez libre

El nivel de frescura de la miel va correlacionado con la fermentación por el crecimiento de microorganismos. Se recomienda un máximo de 40 meq/kg según la normativa INEN. (INEN, 1988). La acidez proporciona un escudo frente a ataques microbianos, al ser combinada con el peróxido de hidrógeno esto proporciona una mejora en su conservación (Zandamela, 2008).

Los ácidos de la miel se producen en las secreciones de glándulas salivales de abejas (Gutiérrez, 2016). Uno de los ácidos que se encuentra más abundante en la miel es ácido glucónico, el mismo que es elaborado a partir de la glucosa con la acción de la enzima glucosa oxidasa de las abejas (Zandamela, 2008).

#### - Cenizas

Relacionado con la conductividad eléctrica y determinado a través de métodos de calcinación, por los cuales se obtiene las cenizas después de exponer la miel a temperaturas altas, el máximo que se recomienda es de 0,6%. A partir de esto se obtienen los minerales que posee la miel y va a depender también de su procedencia botánica (Zandamela, 2008).

## - **Azúcares**

Los azúcares reductores existentes en la miel de abeja son glucosa y fructosa de los cuales según el CODEX se recomienda máximo un 65% (CODEX S. , 1987). La miel es un líquido con alto contenido en azúcares, esta logra su máximo equilibrio en el punto de cristalización, es cuando precipitan los cristales que provienen de la glucosa (Zandamela, 2008).

## - **Hidroximetilfurfural (HMF)**

Es un producto que indica el calentamiento y deterioro de la miel, es un aldehído el cual se obtiene por la descomposición de la fructosa y glucosa, al ser almacenado por un tiempo prolongado o sometido a altas temperaturas. Es por esto que se dice que está estrechamente vinculado con el calor, la existencia de este compuesto en la miel causa un oscurecimiento en el color de la misma por reacciones de reordenación de aminos y azúcares (Zandamela, 2008).

## - **Actividad Diastasa**

Enzima que permite catalizar la hidrólisis del almidón en glucosa, esta enzima está en las mieles y su actividad declina posterior a una exposición a altas temperaturas (Ulloa, Mondragón, Rodríguez, Reséndiz, & Rosas, 2007).

### **2.1.3 Miel de abeja sin aguijón**

La abeja sin aguijón pertenece al grupo "Meliponini", proveniente de las regiones tropicales y subtropicales, las mismas se caracterizan por ocupar cavidades huecas y troncos de árboles vacíos donde almacenan su miel en ánforas que deben ser trituradas con la finalidad de extraer la miel, a diferencia de las abejas con aguijón que la almacenan en panales y celdillas hexagonales (Díaz, 2015).

No existe una norma de calidad para la valoración de la miel proveniente de abejas meliponas, es por esto que se realizan varios estudios sobre su composición y propiedades para que se llegue a elaborar un manual sobre calidad de esta miel en específico. Las normas ya descritas para la calidad de la miel toman en cuenta siete indicadores: acidez, contenido de humedad, cenizas, azúcares reductores, sacarosa, hidroximetilfurfural y actividad de la diastasa. Varios estudios han destacado que las mieles de melipónidos poseen un mayor porcentaje de humedad, acidez, diferencias en la actividad de la diastasa, contenido de maltosa y actividad antioxidante en comparación con la miel de abeja de *Apis mellifera* (Vit, 2009).

Se ha establecido un cuadro sobre patrones de calidad comparando las mieles de abeja con aguijón y las abejas sin aguijón (Figura 2).

Honey composition	Standards			
	<i>Apis mellifera</i>	<i>Melipona</i>	<i>Scaptotrigona</i>	<i>Trigona</i>
Water content (g/100g)	max 20.0	max 30.0	max 30.0	max 30.0
Reducing sugars (g/100g)	min 65.0	min 50.0	min 50.0	min 50.0
Sucrose (g/100g)	max 5.0	max 6.0	max 2.0	max 6.0
Acidity (meq/100g)	max 40.0	max 70.0	max 85.0	max 75.0
Ash (g/100g)	max 0.5	max 0.5	max 0.5	max 0.5
HMF (mg/kg)	max 40.0	max 40.0	max 40.0	max 40.0
Diastase activity (DN)	min 8.0	min 3.0	min 3.0	min 7.0

Figura 2 Estándares de composición de miel de abeja sin aguijón y con aguijón. Adaptada de (Vit, Medina, & Enríquez, 2015).

#### 2.1.4 Propiedades terapéuticas

La miel además de ser considerada como alimento es utilizada también como un recurso medicinal para tratar ciertas afecciones de la salud (Ulloa, Mondragón, Rodríguez, Reséndiz, & Rosas, 2007).

La miel es un potente antibacteriano debido a diferentes factores uno de ellos se debe a uno de sus componentes que son las inhibinas, las cuales están constituidas por peróxido de hidrógeno, flavonoides y ácidos fenólicos, así mismo su capacidad de gran osmolaridad, bajo pH y sustancias volátiles. Otro factor que contribuye a la inhibición del crecimiento bacteriano es una mínima concentración de agua requerida para la reproducción de un organismo, es por esto que se inhibe el crecimiento bacteriano (Rodríguez, 2011). Por otro lado, el peróxido de hidrógeno es otro componente de la miel relacionado con la actividad antimicrobiana, el cual es activado tras la dilución de la miel para que cumpla con la inhibición de crecimiento bacteriano al oxidar a los microorganismos tras su activación (Peter, 2001).

Estudios con miel de diferentes especies del grupo Meliponini, han demostrado la capacidad antimicrobiana frente a diferentes patógenos que han sido estudiados siendo éstos: *Cándida albicans*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphyococcus aureus* entre otros y cierto tipo de levaduras. Se valoró la función antimicrobiana de la misma con diluciones desde 2.5 a 10% (Dardón & Enríquez, 2008).

## 2.2 Mastitis Bovina

La mastitis en bovinos es una de las principales patologías con gran repercusión financiera en la ganadería lechera, ya que afecta principalmente a la salud del animal, la producción y salud pública. Posee un alto índice de pérdidas económicas debido a la decreción de cantidad y calidad de leche, su alto costo de tratamiento, leche para descarte, adecuada limpieza y asepsia de los equipos de ordeño, control veterinario entre otras, convierten a esta patología en un gran desafío de la ganadería de producción lechera (DANE, 2014). Además, la mastitis viola el bienestar animal generando dolor, incomodidad y estrés en las hembras bovinas de producciones lecheras, esto afecta directamente en el rendimiento de la industria y calidad de leche afectando principalmente a su gusto y olor por las bacterias existentes (Aguilar & Álvarez, 2019).

La mastitis es considerada como una inflamación en la glándula mamaria la cual puede producir ciertos trastornos secundarios: fibrosis, edema inflamatorio, atrofia del tejido y hasta gangrena lo cual conlleva a una pérdida total o parcial de la ubre dependiendo el caso (Aguilar & Álvarez, 2019). Se define principalmente por el ingreso de células somáticas, en mayor cantidad neutrófilos polimorfonucleares en la glándula mamaria y un incremento de la proteasa en leche. Esta patología se clasifica por el grado de inflamación y lesiones provocadas en la ubre del animal, así como de las implicaciones sistémicas a las que se encuentre sometida la vaca. La misma se puede clasificar en dos diferentes grupos según características anteriormente mencionadas, la mastitis "Subclínica o Crónica" y "Clínica o Aguda" (Fernández, Trujillo, Jhon, Cerquera, & Granja, 2012).

Las consecuencias de la mastitis bovina se da por varios factores de riesgo como son: un inadecuado manejo y limpieza de las máquinas de ordeño, un sobre ordeño del animal provocando daño del pezón y la ubre, tamaño inadecuado de las pezoneras de las máquinas de ordeño, no realizar el sellado al finalizar la jornada del ordeño, malas condiciones sanitarias y de limpieza de equipo,

personal y material de la sala de ordeño; también épocas de lluvia donde es más propensa la propagación de gérmenes y edad de los animales (DANE, 2014). Son estos factores de riesgo cuando microorganismos invaden la glándula mamaria a través del pezón y los conductos galactóferos del mismo produciendo inflamación leve o severa; dichos microorganismos originan cambios del tejido glandular y en la leche (Andresen, Mastitis: Prevención y control, 2001).

### **2.2.1 Mastitis Clínica**

La mastitis clínica o aguda es caracterizada por su presentación súbita y transformaciones perceptibles en la ubre, presentando enrojecimiento e inflamación y aparición de grumos en la leche, también coágulos y consistencia de agua. También los animales pueden presentar signos de dolor, fiebre, depresión y anorexia; esta se puede diseminar rápidamente en el hato (DANE, 2014).

La presentación de la mastitis clínica está directamente relacionada con la salud y el bienestar animal dado que se asocia al sufrimiento de los animales al presentar dolor con cuadros de hipertermia, cuartos mamarios inflamados con dolor al tacto dando como resultado una salud deficiente en el animal y disminución en la producción. Las pérdidas económicas que se presentan en los casos de mastitis clínicas son altos, debido a la presentación visible de los signos y repercusiones ocasionadas directamente en la producción de leche, en estos casos es donde se debe recurrir a gastos económicos para el tratamiento del animal afectado con la patología, pérdida de la leche que no puede ser destinada a consumo humano y en casos más severos donde no se puede utilizar esta leche para la alimentación de los terneros (Aguilar & Álvarez, 2019).

### **2.2.2 Mastitis Subclínica**

La mastitis subclínica se presenta sin cambios visibles en la ubre o en la leche, puede existir una pequeña rebaja en la producción de leche la cual se altera debido al aumento de células somáticas, componentes inflamatorios y bacterias (Fernández, Trujillo, Jhon, Cerquera, & Granja, 2012).

En caso de que este tipo de mastitis sea indetectable a simple vista, las infecciones pueden presentar daños en pequeñas porciones de los cuartos mamarios afectados y una pérdida funcional paulatina de los alveolos involucrados, produciendo así un aumento de la presión intramamaria y un residuo de leche en los conductos lo cual va a favorecer a que la infección siga progresando y los microorganismos reproduciéndose (Mera, y otros, 2017). Por otro lado, la mastitis subclínica debe ser diagnosticada partir de pruebas de laboratorio donde se evalúe un recuento de células somáticas presentes en la leche, un cultivo bacteriológico, valoración de cambios físicos y químicos y técnicas PCR (Aguilar & Álvarez, 2019).

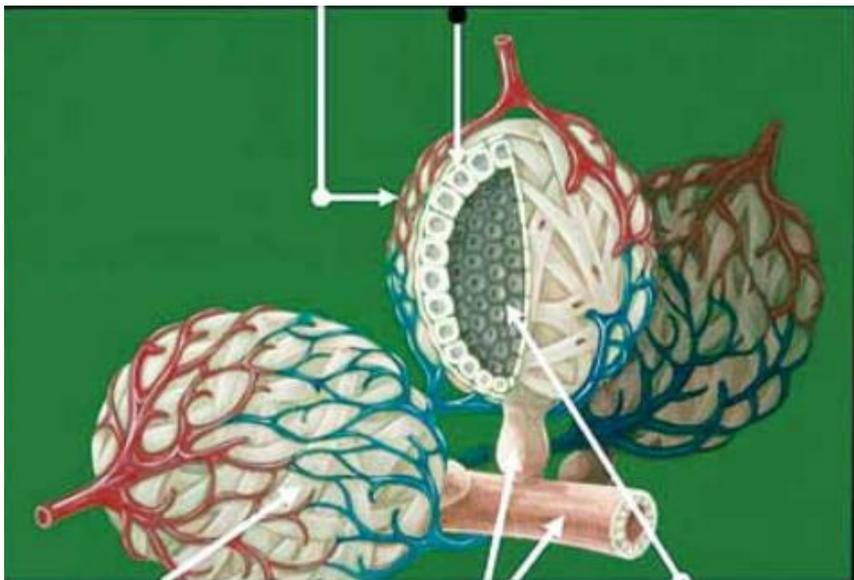
Este tipo de mastitis es bastante común en el ganado lechero con una alta tasa de infección entre los animales del mismo hato originando perjuicios económicos debido a la baja producción y aumento en el conteo de las células somáticas (Quevedo, 2018).

### **2.2.3 Fisiopatología de la glándula mamaria**

En este apartado se describirá el funcionamiento de la glándula mamaria en condiciones normales y cómo se comporta la misma cuando existen reacciones hacia un patógeno cuando ésta se encuentra en procesos inflamatorios.

### 2.2.3.1 Anatomía Funcional de la glándula mamaria

La ubre se encuentra dividida en dos secciones internas izquierda y derecha, divididas por el ligamento suspensorio medio el cual brinda sujeción, la misma posee una subdivisión donde separa los cuartos delanteros de los traseros por una membrana delgada. El tejido secretor de la ubre no se mezcla esto hace que cada cuarto sea una glándula independiente y desembocan en un solo pezón. Más internamente la estructura funcional de la glándula son los alveolos conformados por células epiteliales las cuales sintetizan la leche (Figura 3). Por otro lado, el pezón posee un canal por donde se extrae la leche, este se encuentra recubierto por piel la cual está completamente innervada e irrigada, la punta del mismo posee un esfínter de músculo liso por el cual se cierra después del ordeño y este orificio se llena de cera o queratina, lo que impide el ingreso de microorganismos al interior de la ubre (Elizondo, 2010).



*Figura 3 Alveolo: Estructura Funcional del Tejido Mamario. Adaptada de (Elizondo, 2010)*

Este órgano secretor de leche de origen ectodérmico está conformado por un par de elementos tisulares principalmente, el tejido glandular o parénquima y el estroma; el cuál se conforma por ramificaciones que forman alveolos o acinos

que forman el parénquima. La glándula mamaria es definida histológicamente como una glándula sudorípara modificada de clasificación lóbulo alveolar, se compone de un gran número de lóbulos, lobulillos y acinos, las células alveolares de los acinos presentan una membrana apical con microvellosidades la cual facilita la absorción por el contacto con la red capilar para la futura formación de la leche. El riego sanguíneo de la glándula debe ser fuerte para así asegurar un importante flujo sanguíneo, el cual se incrementa posterior al parto por la sangre que fue derivada al útero durante la gestación y posteriormente para el periodo de lactación (Aguilar & Álvarez, 2019).

El riego arterial de la glándula mamaria proviene de la arteria pudenda externa que cruza el conducto inguinal y se divide en un par de arterias mamarias, las arteriolas se ramifican y se forma una red capilar en torno a los alveolos (Aguilar & Álvarez, 2019).

#### **2.2.4 Principales patógenos causantes de mastitis bovina**

Existen varios microorganismos patógenos que pueden ser causantes de la mastitis bovina, aunque según estudios se han descrito las bacterias que aparecen con mayor frecuencia en esta patología como son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, enterococos y bacterias coliformes, los anteriormente mencionados principalmente se encuentran alrededor del ambiente del ganado. Por otro lado, también existen microorganismos con menor presentación en la patología como son *Staphylococcus* coagulasa negativo y *Corynebacterium bovis*, los últimos mencionados pueden llegar a provocar leves inflamaciones en la glándula mamaria y un pequeño incremento de células somáticas en la leche (Heringstard, Klemetsdal, & Ruane, 1999).

La causa infecciosa de la mastitis se puede dividir en contagiosa y ambiental. La mastitis contagiosa principalmente es originada principalmente por el uso compartido de toallas de secado de ubres o de las pezoneras que no se desinfectan entre los ordeños. Los microorganismos que producen mastitis

contagiosas son aquellos cuyo hábitat principal es el canal del pezón y la piel externa de mismo, donde se destacan principalmente las bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus Agalactiae*, *Corynebacterium bovis* y *Mycoplasma* spp (Osteras, Solverod, & Reksent, 2006). La mastitis ambiental es causada por microorganismos gram negativos que se encuentran presentes normalmente en el medio ambiente que rodea a los animales como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Pseudomona* spp entre otros y bacterias gram positivas como *Streptococcus dysgalactiae*. Las infecciones contagiosas por *S. Aureus* son una de las más importantes debido a que este no es patógeno obligatorio de la ubre, puede estar presente en heridas, mala higiene de manos del personal, camas y equipos de ordeño, es por esto que se vuelve un patógeno más difícil de tratar por mecanismo de la misma bacteria que reducen su respuesta hacia los antimicrobianos (Calderón & Rodríguez, 2008).

### **2.2.5 Diagnóstico**

La cuantificación de células somáticas es un método a través del cual se hace un conteo de las células que están presentes en la leche, el aumento de las mismas es un indicador de la presencia de mastitis en las vacas lecheras. Existen varias pruebas para realizar esta medición como Prueba de Mastitis California, Prueba de Wisconsin, Conteo Microscópico de células somáticas, Cultivos Bacteriológicos (Quevedo, 2018).

Las pruebas de Californian Mastitis Test (CMT), Wisconsin y White Side (WST) son técnicas las cuales están vinculadas a la transformación de la membrana de las células que se encuentren presentes en la leche, el ADN de las células reacciona con los diferentes reactivos de cada prueba y se forma una especie de gel en la leche. En la prueba de WST se efectúa una reacción entre hidróxido de sodio y la leche donde se produce un espesamiento de la misma (Aguilar & Álvarez, 2019).

Cultivos bacteriológicos también son utilizados para la detección de esta patología, utilizando medios de cultivo de agar sangre donde se inocula leche de la vaca sospechosa y se deja incubar de 18 a 24 horas, donde se determinará la presencia de diferentes cepas de bacterias, este método de diagnóstico solo detecta el género de la bacteria presente de la muestra y se debe recurrir posteriormente a un laboratorio para realizar test de detección de cada cepa bacteriana (Concha, 2014).

## **2.3 Microorganismos Bacterianos**

Las bacterias son microorganismos unicelulares las cuales se reproducen por fisión binaria, los mismos contienen su propio material genético y metabolismo. Son clasificadas como células procariotas. La conformación de las bacterias tiene varios componentes que se deben tomar en cuenta en caso de las bacterias gram negativas como es la pared celular, compuesta por membrana externa la cual es una barrera permeable, las porinas son canales de la membrana las cuales permiten el transporte de nutrientes y sustancias dentro de la célula. Lipopolisacáridos, que se encuentran en la superficie de la célula, son los responsables de la formación de endotoxinas de la propia bacteria. Por otro lado la capa de Peptidoglicano es un polímero de Ácido N-acetil murámico y N-acetil Glucosamida que se encuentran entrelazados entre sí. Se la conoce como la envoltura de mureína o pared celular la cual es encargada de la rigidez de la célula localizadas dentro del espacio periplásmico, aquí se encuentran las proteínas de enlace para sustratos específicos y enzimas.

Por último se encuentra presente la membrana citoplásmica, la cual rodea el citoplasma de la célula, que contiene fosfolípidos y proteínas, muchas de estas son eximas encargadas del metabolismo celular, dentro de esta también se encuentran diferentes organelos de la célula como ribosomas, plásmido (Coyle, 2005)

Las bacterias gram-positivas tienen una pared celular la cual está integrada por una capa gruesa de peptidoglicano en comparación con las bacterias gram negativas en las cuales la capa de peptidoglicano es más delgada con una capa externa y presenta lipopolisacáridos, a diferencia de las bacterias gram positivas en donde se encuentran los ácidos lipoteicoicos, estos cumplen con una función específica, la cual es estabilizar la pared celular y actúan también como antígenos de superficie (Pirez, 2002).

La capa de peptidoglicano de la pared celular es de gran importancia ya que tiene un papel importante en la supervivencia de la bacteria, algunas bacterias gram positivas son capaces de formar esporas en condiciones de estrés aun cuando se encuentren con limitado recurso de carbón y oxígeno. Estas esporas son capaces de permitir a las bacterias sobrevivir en condiciones extremas (Frank, 2009).

### **2.3.1 *Staphylococcus Aureus***

Es considerada una bacteria gram positiva que pertenece a la familia *Micrococcaceae*, los cuales se observan en forma de racimos con aspecto esférico y diámetro alrededor de una micra, se consideran microorganismos catalasa positivos. Principalmente es una bacteria que se encuentra en la nasofaringe y zonas húmedas como en pliegues de la piel. Este microorganismo posee varios factores de virulencia, aunque a pesar de esto puede habitar en el huésped siendo parte de su flora normal sin ocasionar daño alguno. Al ser considerada una bacteria gram positiva, la misma está conformada por una pared gruesa de peptidoglicano, cuyo principal objetivo es conservar la firmeza de la pared de la bacteria y también su resistencia osmótica (Seija, 2004).

En casos de patogenia, la membrana celular de esta bacteria contribuiría con el desencadenamiento de la inflamación a través de la activación del sistema del

complemento, atrae leucocitos polimorfonucleares (PMN) y estimulante de la producción de anticuerpos. Cierta tipo de cepas de *S. Aureus* poseen receptores de colágeno y fibronectina los cuales proporcionan a la célula una mayor capacidad de adhesión al tejido a colonizar. Por otro lado, en la pared celular de estos microorganismos se hallan también una proteína característica a la cual se la denomina como proteína A, ésta puede fusionarse a la porción Fc de las inmunoglobulinas G, lo cual lo convierte en un factor de virulencia porque interfiere con la ingestión de los organismos a cargo de los PMN (Seija, 2004).

### **2.3.2 *Staphylococcus Aureus* Resistente a Meticilina**

*Staphylococcus aureus* resistente a metilina es una bacteria gram positiva de la familia *Micrococcaceae*, con la diferencia a *Staphylococcus aureus* que este microorganismo ha adquirido una mutación en un gen que lo convierte resistente a la metilina y a los demás antimicrobianos de la familia de los betalactámicos. Los antibióticos betalactámicos tienen como principal función intervenir en la síntesis de la pared celular inactivando las proteínas de unión a penicilina (PBP), estos antimicrobianos debilitan la pared celular y las bacterias se vuelven más frágiles y fáciles de destruir. Esta bacteria ha sido capaz de adquirir una modificación en el gen llamado *mecA* el cual codifica a la proteína PBP2 con unión a la penicilina, esta proteína confiere resistencia completa a los betalactámicos. Esta proteína anteriormente mencionada posee una afinidad muy baja a los antibióticos betalactámicos y se relaciona directamente con el ensamblaje de la pared celular cuando las proteínas PBP normales son inactivadas por los antimicrobianos betalactámicos (OIE, 2011).

Este mecanismo señalado, concede al microorganismo resistencia absoluta contra penicilinas semi sintéticas como Meticilina y Oxacilina, también Cefalosporinas de primera y segunda generación, todo el grupo que abarca a los antimicrobianos betalactámicos, Cefalosporinas de tercera y cuarta generación,

incluyen también los Carbapenems; esta resistencia puede extenderse también a las familias de antibióticos de Quinolonas y Lincosamidas. Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* han disminuido su sensibilidad a meticilina por un mayor grado de producción de beta lactamasas o estas mismas en contra meticilina específicamente (Echevarria & Iglesias, 2003).

### **2.3.3 *Staphylococcus Epidermidis***

Esta bacteria forma parte de la flora natural de la piel, a diferencia de *S. Aureus* éste es un microorganismo caracterizado por ser coagulasa- negativo. Este microorganismo es capaz de formar una biopelícula, la cual inicia con la adherencia del agente microbiano a los materiales y a continuación la formación de la biopelícula, donde se encuentran aglomeraciones de bacterias en una matriz extracelular. Esta biopelícula es una barrera la cual protege a los microorganismos de los elementos de defensa del propio huésped y protección de los antibióticos. En la formación de las biopelículas anteriormente mencionadas, se encuentran íntimamente relacionadas proteínas y exopolímeros, el más conocido es el exopolímero PIA el cual contribuye a la formación de la biopelícula e inhibe la fagocitosis. Por otro lado, en recientes estudios se ha comprobado también la presencia de Modulinas solubles en Fenol (PSMs) además de contribuir con la formación de la biopelícula, poseen actividad lítica frente a leucocitos y eritrocitos. Los ácidos teicoicos también forman parte de este microorganismo, los cuales contribuyen en la adhesión y colonización de la bacteria (Baos, 2017)

Los microorganismos del género *Staphylococcus* poseen varias características que los distinguen entre especies aunque todas poseen cierto tipo de determinantes de patogenicidad y diferentes tipos de patogenia. En cuanto a los determinantes de patogenicidad constan los elementos de la pared celular, enzimas y toxinas. En las bacterias del género *Staphylococcus* mencionadas anteriormente, se caracteriza a *S. Aureus* como catalasa- positivo y a *S. Epidermidis* catalasa- negativo, esta enzima es la encargada de la inactivación

de los sistemas de ingestión de los leucocitos polimorfonucleares. Existen otras enzimas como coagulasa, la cual cubre la célula de fibrina convirtiéndola más resistente a la opsonización y fagocitosis. Las estafiloquinasas, son las encargadas de la degradación de la fibrina. Hialuronidasa, hidroliza la matriz intracelular de los tejidos. Lipasa, permite a la bacteria repartirse por los tejidos cutáneos y subcutáneos (Seija, 2004).

Las bacterias del género *Staphylococcus* también producen diferentes tipos de toxinas, como las hemolíticas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , leucocidina, exfoliatinas, toxina de shock tóxico (TSST-1) y enterotoxinas. De las anteriormente mencionadas las hemolisinas son toxinas citolíticas que actúan en una gran diversidad de células y las enterotoxinas, exfoliatinas y TSST- 1 actúan como un superantígeno, esto quiere decir que pueden activar la mediación de Linfocitos T sin la presencia de las células presentadoras de antígeno, esto conlleva a la liberación de citoquinas (Seija, 2004).

A diferencia del *S. Aureus* la bacteria *S. Epidermidis* no posee la capacidad de la formación de toxinas, se describe la formación de TSST-1 y enterotoxinas en conjunto con la presencia de PSMs anteriormente mencionadas, con actividad citolítica en bajas cantidades en comparación con las toxinas de *S. Aureus* (Baos, 2017).

#### **2.3.4 *Streptococcus Agalactiae***

Microorganismo también conocido como estreptococo  $\beta$ -hemolítico, es un coco gram positivo caracterizado como catalasa y oxidasa negativo, bacteria anaerobia facultativa. Este se encuentra en el grupo B por la composición de sus antígenos de la membrana celular (De la Rosa & de Cueto, 2013).

Este microorganismo al ocasionar mastitis bovina produce una inflamación que bloquea los conductos lo cual provoca una reducción en la producción de la leche

y un incremento en la presencia de células somáticas. Esta bacteria en esta patología produce bajos niveles de enzimas y toxinas haciendo que el microorganismo posea una alta sensibilidad hacia los antibióticos, por esta razón su infección puede ser fácilmente controlada. Productos intramamarios con amoxicilina, penicilina y eritromicina pueden ser eficaces hasta un 95% (Aguilar & Álvarez, 2019).

#### **2.4 Pruebas de Susceptibilidad antimicrobiana**

Existen varios métodos a través de los cuales se puede valorar la actividad antimicrobiana de cierto tipo de fármacos o sustitutos de los mismos, para estas valoraciones se describen diferentes técnicas de laboratorio las cuales cumplen con ciertos protocolos a seguir para la obtención de un resultado confiable. A continuación se describirán ciertos métodos de evaluación antimicrobiana existentes para los microorganismos.

Los antimicrobianos poseen diferentes características y métodos de acción para inhibir el crecimiento de los patógenos existentes en infecciones. Estos tienen una principal categorización entre bactericidas los cuales desencadenan mecanismos que causan la muerte celular de las bacterias a diferencia de los bacteriostáticos que solo inhabilitan el crecimiento y la multiplicación de bacterias. Los antimicrobianos poseen diversas capacidades para inhibir o eliminar a los microorganismos causantes de las infecciones, es por esto que se clasifican según su método de acción. Existen agentes que son capaces de intervenir en la elaboración de la pared celular, inhibición de la síntesis de proteínas, intervención en la síntesis de los ácidos nucleicos o inhibición de las rutas metabólicas (Cavaliere, 2005).

### **2.4.1 Prueba de difusión por disco**

Según el género del microorganismo que se va a utilizar para la inoculación del mismo se debe seleccionar el tipo de agar a emplear. En primer lugar se debe realizar la preparación del medio de cultivo, verter el mismo en las placas y dejar secar en estufa o dependiendo de los protocolos del producto (EUCAST, 2012).

Para la prueba de difusión por disco se debe seleccionar las colonias que se van a utilizar, se recomienda el uso de las colonias aisladas de la placa, preparación y estandarización de la suspensión del inóculo, se realiza por suspensión directa de los inóculos o a través de la fase logarítmica de crecimiento. La suspensión directa de los inóculos consiste en suspender las colonias en caldo y ajustar la turbidez del inóculo en relación con el estándar 0,5 de McFarland. Por otro lado, el método de fase logarítmica se basa en la incubación del microorganismo para posteriormente ajustar la turbidez de la misma. Posteriormente se realiza la inoculación de la placa, con el apoyo de un hisopo o asa se toma la muestra de la bacteria y se inoculara en toda la placa asegurándose que quede cubierta por completo con el microorganismo, después se procede a la colocación de los discos de antimicrobianos, debe asegurarse que cada disco se encuentre en completo contacto con toda la superficie del agar y posteriormente se incuba la placa. Luego de la realización de todos los pasos se procede a medir las zonas de inhibición a través de luz reflejada o luz transmitida (Cavaliere, 2005).

### **2.4.2 Pruebas CIM, Concentración Mínima Inhibitoria**

Esta prueba antimicrobiana tiene como principal fundamento identificar cual es la mínima concentración de fármaco que se necesita para inhibir la multiplicación y producción del crecimiento de una cepa bacteriana. Para esta prueba se pueden utilizar paneles de microdilución y diluciones en agar (Cavaliere, 2005).

Además, la prueba de concentración mínima inhibitoria muestra también la cantidad mínima de cualquier sustancia que se utiliza para la inhibición del crecimiento bacteriano aparte de fármacos antimicrobianos, los resultados obtenidos del test muestran si la bacteria es sensible, intermedio o resistente hacia el fármaco o sustancia utilizada. Si el resultado es sensible significa que el crecimiento del organismo es inhibido por la concentración de la sustancia a dosis normales; intermedio significa que el crecimiento es inhibido por la dosis máxima recomendada y resistente el organismo no presenta inhibición en su crecimiento en cualquiera de las cantidades de la sustancia. Las interpretaciones anteriormente mencionadas son establecidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (IDEXX, 2019).

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son de gran importancia en el uso de la medicina ya que éstas permiten la correcta administración de fármacos según el curso de la enfermedad y el tipo de microorganismo presente, se recomienda siempre recolectar muestras y analizarlas en el laboratorio para saber cuál es el organismo al que se debe la infección y si éste posee cierto tipo de resistencia hacia algún fármaco, con estas pruebas se pueden seleccionar los fármacos correctos para el tratamiento de cada microorganismo presente (Herrera, 1999).

## CAPÍTULO III. Materiales y Métodos

### 3.1 Delimitación Geográfica

El ensayo experimental se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Universidad de las Américas Quito, se encuentra ubicado en la sede Queri, ubicada en la calle José Queri entre Av. De los Granados y Av. Eloy Alfaro, Quito-Ecuador.

### 3.2 Población y Muestra

Al ser un estudio experimental que se realiza en un laboratorio con miel de abeja, la población utilizada representa la miel de abeja de Melipónidos del Ecuador.

Se analizaron 10 muestras de miel de Melipónido recolectadas en tres regiones del Ecuador (Costa - Sierra - Oriente), las cuales fueron donadas por meliponicultores artesanales que se encuentran registrados en el Ministerio de Agricultura y Ganadería en frascos estériles y se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis. Las muestras de miel son provenientes de 5 provincias y fueron codificadas según su provincia (Tabla 1). Las muestras de miel se van a analizar en diferentes concentraciones de 20%, 15%, 10%, 8%, 5% y 3% cada muestra respectivamente.

Tabla 1

*Codificación de muestras de miel*

<b>Provincia</b>	<b>Código</b>	<b>N°</b>
El Oro	OR	2
Los Ríos	LR	3

Pastaza	PS	1
Loja	LO	3
Tungurahua- Río Negro	RN	1
<b>TOTAL</b>		<b>10</b>

---

### **3.3 Materiales**

#### **3.3.1 Materiales de Oficina**

- Computadora
- Resultados de MIC por espectrofotometría

#### **3.3.2 Materiales de Laboratorio**

- Gradilla
- Pipeta
- Micropipeta
- Espátula
- Cucharilla
- Pipeta
- Mechero de alcohol
- Vaso precipitado
- Papel aluminio
- Tubos de ensayo
- Tubos Falcon
- Tubos Eppendorf
- Frasco graduado
- Placas de microtitulación
- Puntas desechables
- Guantes de Nitrilo
- Gafas de protección

### 3.3.3 Equipos de Laboratorio

- Balanza
- Agitador Vortex
- Refrigerador
- Autoclave
- Incubadora con agitación (311DS Environmental Shaking Incubator, Labnet International, USA)
- Estufa
- Lector de microplaca (*BioTek Synergy™ HT, Agilent Technologies, USA*)
- Espectrofotómetro portátil (*Spectroquant® Colorimeter Move 100, Merck, Germany*)
- Computador
- Cabina de Bioseguridad

### 3.3.4 Insumos de Laboratorio

- Medio de enriquecimiento líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB, BD™, USA)
- Buffer Fosfato de potasio básico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 50Mm. pH 6.5
- Penicilina G Sódica (150 mg) USP
- Agua MiliQ
- Alcohol 70% y 95%
- Etanol 70% y 95%
- Cloro 1% y 5%
- Jabón
- Miel de abeja Melipona

### 3.3.5 Bacterias utilizadas

- *Staphylococcus aureus* (Código ATCC: 25923)
- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Código: 333)

- *Staphylococcus epidermidis* cepa silvestre
- *Streptococcus agalactiae* cepa silvestre
- Caldo de conservación Tryptic Soy Broth (TSB)

### 3.4 Variables

En el estudio experimental que se llevó a cabo se tomaron en cuenta las siguientes variables las cuales se describen en la Tabla N°2.

Tabla 2

*Variables del estudio*

<b>Variables</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Indicador</b>	<b>Unidad de medida</b>	<b>Ítem</b>	<b>Instrumento</b>
Diluciones de miel	Cuantitativa Dependiente	Cantidad de miel con respecto a la cantidad de Buffer	% de miel en la dilución.	%	Cantidad en mililitros	Medición directa
Absorbancia	Cuantitativa Independiente	Cantidad de luz que pasa a través del pocillo	se mide en la intensidad de luz que pasa a través de la sustancia	Absorbancia	Cantidad de luz	Medición directa
Dilución antibiótico	Cuantitativa Independiente	Dilución de antibiótico en diferentes concentraciones	Concentración del fármaco en gramos	g/ml	Concentración en % o g/ml	Medición directa
MIC	Cuantitativa Independiente	La concentración más baja de una sustancia capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo	Dilución de la sustancia donde se presenta inhibición en el crecimiento del microorganismo	% de miel	% dilución de miel	Medición directa

Especie Bacteriana	Cualitativa Independiente	Cepas que comparten propiedades estables que difieren de forma significativa a otras cepas	Características morfológicas	% similitud de las propiedades de cada cepa	% similitud de características morfológicas	Medición directa
--------------------	---------------------------	--	------------------------------	---	---	------------------

### 3.5 Metodología

A continuación, se describirá paso a paso la metodología y los protocolos que se realizaron para las diluciones de la miel de abeja, antibiótico y la prueba de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

#### 3.5.1 Dilución de miel

Para las 10 muestras se rotularon microtubos de 1.5 ml (tubos Eppendorf) con el código de cada miel y su dilución, obteniendo en total 60 microtubos rotulados; 6 de cada muestra. Se utilizaron mieles puras, las cuales se pesaron en las diferentes concentraciones en microtubos de 1.5 ml en una balanza. Las mieles fueron pesadas según la dilución de cada muestra (Tabla 3).

Tabla 3

*Pesaje de miel según dilución y volumen de buffer*

Dilución	Gramos	Volumen (ul)	Volumen Buffer (ul)
20%	0.200	200	800
15%	0.150	150	850
10%	0.100	100	900
8%	0.80	80	920
5%	0.50	50	950
3%	0.30	30	970

Después del pesaje de las muestras de miel se resuspendieron en un buffer de potasio básico KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50Mm. pH 6.5). En una cabina de bioseguridad con micropipetas se resuspende las muestras de miel con el buffer según la dilución de las mismas para completar el mililitro del microtubo, ver tabla 3. Posteriormente, las mieles resuspendidas se mezclan en el agitador Vortex para una correcta dilución de la misma.

### 3.5.2 Dilución antibiótico

Para la dilución del antimicrobiano se revisaron los puntos de corte de la Penicilina según el manual CLSI para las cuatro bacterias en estudio (Tabla 5). Los puntos de corte del antibiótico son la concentración mínima del compuesto que inhibe el crecimiento bacteriano, mediante las cuales se puede determinar a la bacteria como sensible o resistente (Cantón, 2013).

Tabla 4

#### *Puntos de corte Penicilina*

Microorganismo	Punto de corte	
	Sensible	Resistente
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤ 0.12 µg	≥ 0.25 µg
MRSA	≤ 0.12 µg	≥ 0.25 µg
<i>S. Epidermidis</i>	≤ 0.12 µg	≥ 0.25 µg
<i>S. Agalactiae</i>	≤ 0.12 µg	≥ 0.25 µg

En 2 microtubos de 1.5 ml se rotularon las dos diferentes concentraciones del antibiótico y se pesó en una balanza 0.12 µg y 0.25 µg respectivamente de

Penicilina G Sódica (150mg), luego en una cabina de bioseguridad se diluyó el compuesto en 1 ml de agua MiliQ y se realizó agitación con el agitador Vortex.

A continuación en un tubo Falcon se colocó con una pipeta 10 ml de Agua MiliQ donde se rotularon con las concentraciones respectivas del antimicrobiano 0.012 ug/ml y 0.025 ug/ml posteriormente se dispuso el antibiótico diluido en los tubos Falcon. Se almacenaron las muestras a 4°C.

### 3.5.3. Cultivo de microorganismos

Se inocularon cuatro microorganismos *Staphylococcus aureus* (código: 25923), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (código 333), *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae* cepas silvestres. En primer lugar se descongelaron los microorganismos que se encontraban en medio de cultivo Brain Heart Infusion (BHI) en la cabina de seguridad.

Se preparó una solución inactivadora compuesta por alcohol 95%, cloro 5%, jabón líquido y agua en partes iguales, colocando en un vaso de precipitación para desechar las puntas las cuales se usaron para la extracción del microorganismo. Con una micropipeta se recolectaron 200 µl del microorganismo ya descongelado y se inoculó en un tubo de ensayo con medio líquido Tryptic Soy Broth (TSB, BD™, USA), cada microorganismo en diferentes tubos de ensayo y se rotularon con el nombre de la bacteria. A continuación, se incubaron a 37°C, durante 18-23 horas en una incubadora con agitación (*311DS Environmental Shaking Incubator, Labnet International, USA*).

Posteriormente se inoculó a un nuevo tubo con medio líquido de TSB y con una alícuota del cultivo previamente sembrado de cada microorganismo, manualmente en el tubo con medio líquido de TSB se colocaron 200ul del cultivo sembrado hasta obtener con el espectrofotómetro a turbidez deseada con el programa de turbidez de 0.5 en la escala de McFarland, el cual es equivalente a

$1.5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia (UFC), de acuerdo con valores del programa de turbidez equivalentes a 39, 40 y 41 en la escala de FAU (Spectroquant® Colorimeter Move 100, Merck, Germany) (BD, 2005) (MDM, 2017). Al no conseguir la turbidez del cultivo deseado se agregaron 100ul más de cultivo sembrado y si la turbidez sobrepasaba los valores se añadieron 100ul de medio líquido de TSB manualmente hasta que se obtuvo la turbidez requerida, finalmente el cultivo se inoculó en las placas de titulación.

#### **3.5.4 Concentración mínima inhibitoria (CIM) de miel**

El método de concentración mínima inhibitoria de la miel pura se evaluó de acuerdo a los estándares internacionales (Patel, y otros, 2015), para ello se utilizaron 10 muestras de miel en diferentes concentraciones mencionadas anteriormente 20%, 15%, 10%, 8%, 5% y 3% y cuatro diferentes microorganismos.

El siguiente procedimiento se realizó en una cabina de bioseguridad con el cultivo bacteriano anteriormente preparado con turbidez de 0.5 en escala de McFarland de cada microorganismo. Con una micropipeta y puntas desechables se distribuyeron 10  $\mu$ l de cada cultivo bacteriano en las placas de micro titulación de 96 pocillos y se añadieron 100  $\mu$ l de cada concentración de las mieles por duplicado en cada pocillo (Figura 4). Seguidamente, se midió la longitud de onda en el lector de microplacas (BioTek Synergy™ HT, Agilent Technologies, USA) con el programa Gen5 (Microplate Reader and Imager Software, Agilent Technologies, USA) de cada placa con diferente microorganismo a 340 nm como lo recomienda el manual del equipo. A continuación se incubaron las placas a 37 °C por 18-20 horas en la incubadora con agitación (311DS Environmental Shaking Incubator, Labnet International, USA). Al siguiente día se midió la absorbancia de las ocho placas a 340 nm, y después de la segunda lectura se desecharon las placas.

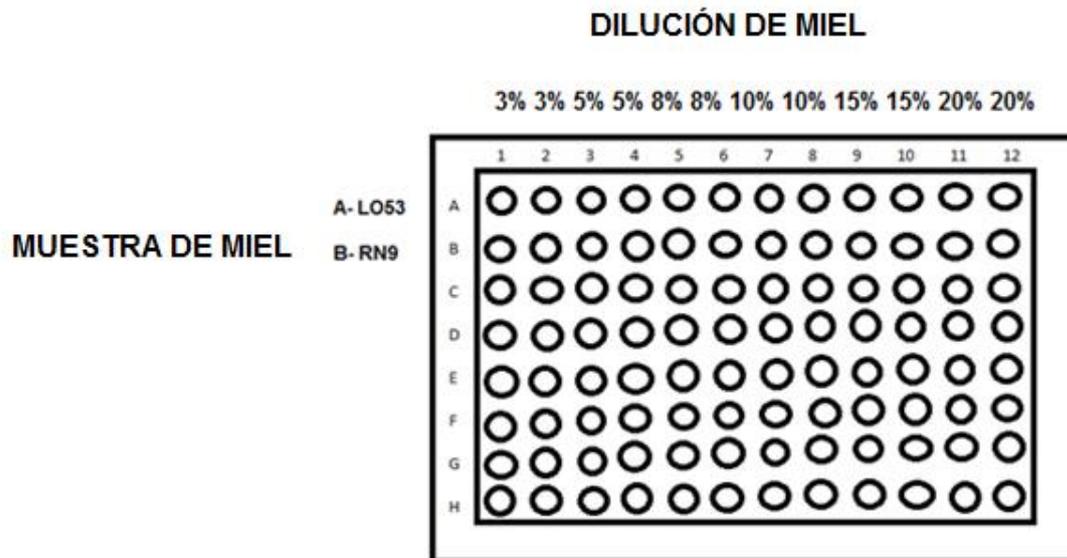
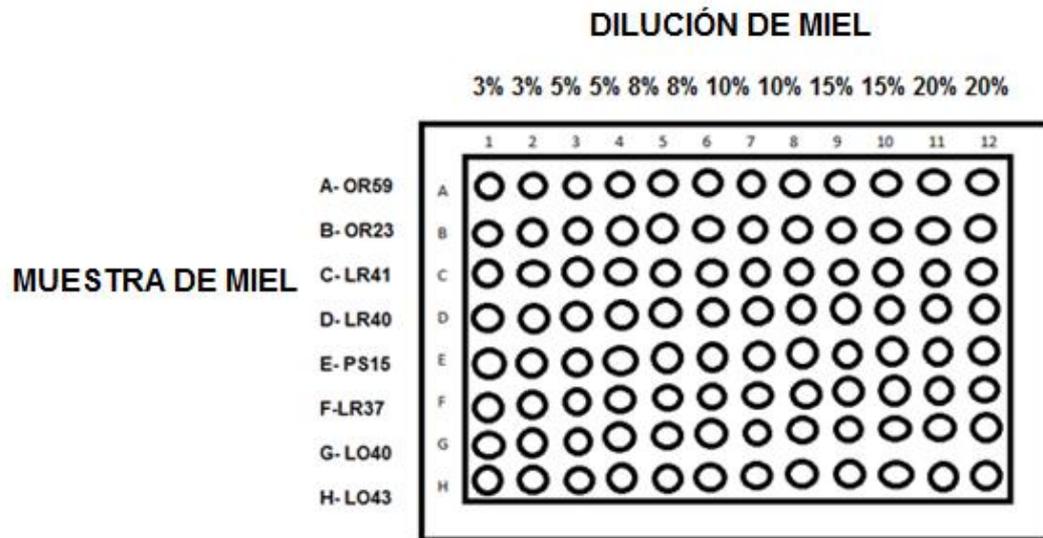
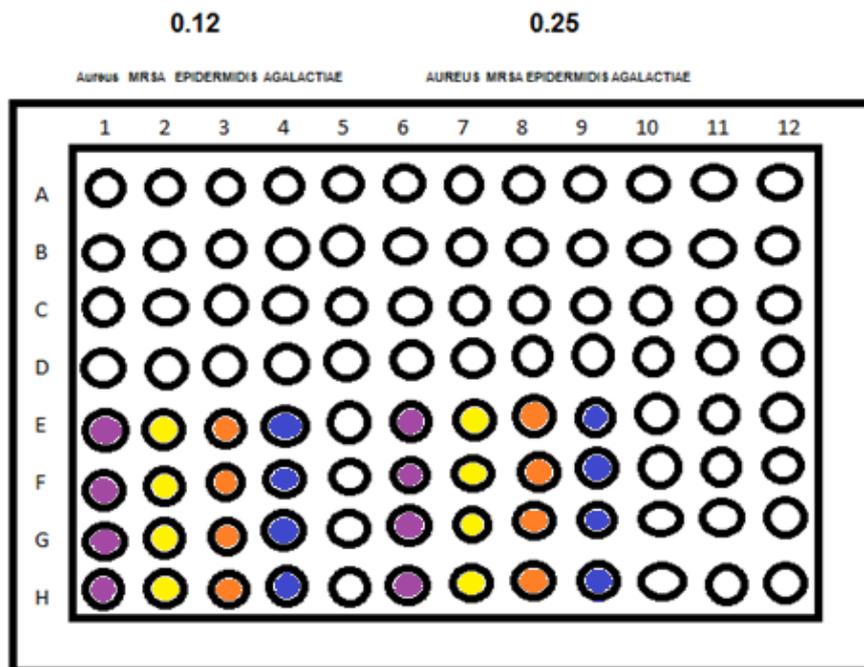


Figura 4 Placa de microtitulación con diluciones de miel.

### **3.5.5 Concentración mínima inhibitoria (CIM) de antibiótico**

Para realizar la concentración mínima inhibitoria del antibiótico, se evaluaron los puntos de corte del antibiótico para cada uno de los microorganismos en estudio de acuerdo a los estándares internacionales del manual CLSI (Weinstein, y otros, 2020), para ello se utilizaron 2 muestras del antibiótico elegido en diferentes concentraciones según los puntos de corte de las cuatro bacterias para sensible y resistente las cuales fueron 0,012 µg/ml y 0.025 µg/ml.

A continuación se realizó en una cabina de bioseguridad con el cultivo bacteriano anteriormente preparado con turbidez de 0.5 en escala de McFarland de cada microorganismo. Utilizando una micropipeta y puntas desechables se distribuyeron 10 µl de cada cultivo bacteriano en las placas de microtitulación de 96 pocillos y se añadieron 100 µl de cada concentración del antibiótico en cada pocillo (Figura 5), se realizaron cuatro repeticiones por bacteria y concentración de antibiótico. Seguidamente, se midió la longitud de onda en el lector de microplacas (BioTek Synergy™ HT, Agilent Technologies, USA) con el programa Gen5 (Microplate Reader and Imager Software, Agilent Technologies, USA) de cada placa con diferente microorganismo a 340 nm como lo recomienda el manual del equipo. Posteriormente se incubaron las placas a 37 °C por 18-20 horas en la incubadora con agitación (311DS Environmental Shaking Incubator, Labnet International, USA). Al siguiente día se midió la absorbancia de las placas a 340 nm, y después de la segunda lectura se desecharon las placas.



*Figura 5* Concentraciones de antibiótico en microplacas.

### 3.5.6 Codificaciones

La codificación de las muestras de miel se la realizó de acuerdo a su provincia y número de colmena, por ejemplo OR59 es de la provincial de El Oro y 59 es el número de colmena por la cual se encuentra codificada la muestra de miel, y así fueron codificadas todas las muestras de miel que se utilizaron para el estudio.

Para la fase estadística del Proyecto se codificaron con números las muestras con los diferentes microorganismos y los resultados que se alcanzaron según la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria para facilitar la introducción de los datos en el programa estadístico. Para esto se realizaron códigos expuestos en la tabla 6.

Tabla 5

*Codificaciones de muestras*

CÓDIGOS	
<b>RESULTADO</b>	1 CRECIMIENTO 0 MUERTE
<b>MICROORGANISMO</b>	1 <i>S. Agalactiae</i> 2 <i>S. Epidermidis</i> <i>S. Aureus</i> 3 ATCC 4 MRSA

### 3.5.7 Cálculo MIC

La obtención del cálculo de MIC se realizó a través de las mediciones del espectrofotómetro y las lecturas obtenidas. La primera lectura de las placas se realizó por duplicado después de la inoculación de la muestra de miel o antibiótico y se realizó la segunda lectura un día después de que la placa haya estado en incubación con la muestra.

Con las lecturas ya realizadas se calculó un promedio de la lectura del día 1 y día 2, posteriormente se restó el promedio del día 1 al día 2 y se obtuvieron los resultados. En cada casilla de cada muestra de miel se obtuvo un número 1 y 0 que indicaba crecimiento y muerte respectivamente, dependiendo de los números obtenidos 1 o 0 se obtuvo la concentración mínima inhibitoria la cual corresponde a la dilución donde hubo inhibición del crecimiento bacteriano.

### 3.5.8 Análisis Estadístico

Se realizaron análisis estadísticos descriptivos a través de tablas de contingencia las cuales se utilizan para analizar la asociación que existe entre dos o más variables, como las muestras de miel, bacterias y antibiótico, realizadas a través de programa estadístico (IMB SPSS).

## CAPÍTULO IV. Resultados y Discusión

Los resultados que se muestran a continuación pertenecen al análisis de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de cuatro bacterias *Staphylococcus Aureus* ATCC (código: 25923), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (código: 333), *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae* cepas silvestres. Las muestras cultivadas previamente fueron sometidas a tratamiento con miel de abeja de melipónidos en diferentes diluciones de la misma 20%, 15%, 10%, 8%, 5% y 3% y también se sometió a las mismas bacterias al tratamiento con el antibiótico comercial de elección que fue la penicilina en dosis sensible y resistente respectivamente para cada bacteria según el manual CLSI.

### 4.1 Resultados MIC

La concentración mínima inhibitoria de las muestras de miel de abeja que se observan en las tablas se describe que a partir de que de la muestra de miel se obtenga un 0 quiere decir que desde esa dilución de miel de abeja se presenta la muerte del microorganismo, convirtiendo a esa dilución a la concentración mínima inhibitoria capaz de conseguir muerte del microorganismo en estudio.

#### 4.1.1 MIC *Streptococcus agalactiae*

Tabla 6

*Concentración mínima inhibitoria de la concentración de miel en las diferentes muestras para Streptococcus agalactiae*

Miel	3%	3%	5%	5%	8%	8%	10%	10%	15%	15%	20%	20%	MIC (DILUCIÓN)
OR59	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5%
OR23	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	15%

LR41	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8%
LR40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3%
PS15	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	10%
LR37	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	10%
LO40	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	>20
LO43	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5%
LO53	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	>20
RN9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	>20

En el caso de *Streptococcus agalactiae* no se observó concentración mínima inhibitoria ya que tres de las muestras de miel LO40, LO53 y RN9 se mostraron resistentes al microorganismo, la muestra donde mayor sensibilidad tuvo la bacteria fue LR40 con la dilución al 3% de miel de abeja.

#### 4.1.2 MIC *Staphylococcus epidermidis*

Tabla 7

Concentración mínima inhibitoria de la concentración de miel en las diferentes muestras para *Staphylococcus epidermidis*

Miel	3%	3%	5%	5%	8%	8%	10%	10%	15%	15%	20%	20%	MIC (DILUCIÓN)
OR59	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5%
OR23	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	15%
LR41	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5%
LR40	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	15%
PS15	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8%
LR37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3%
LO40	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8%
LO43	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5%
LO53	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8%
RN9	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5%

La dilución de miel donde se obtuvo una mejor sensibilidad bacteriana fue en la dilución de 3% con la muestra de miel LR37 para *Staphylococcus epidermidis*,

por el contrario la bacteria mostró mayor resistencia frente a la muestra de miel OR23 y LR40 donde se obtuvo el MIC con una dilución mayor al 10%.

#### 4.1.3 MIC *Staphylococcus aureus* ATCC

Tabla 8

Concentración mínima inhibitoria de la concentración de miel en las diferentes muestras para *Staphylococcus aureus* ATCC

Miel	3%	3%	5%	5%	8%	8%	10%	10%	15%	15%	20%	20%	MIC (DILUCIÓN)
OR59	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8%
OR23	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	15%
LR41	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	10%
LR40	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5%
PS15	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	15%
LR37	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5%
LO40	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8%
LO43	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8%
LO53	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5%
RN9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	20%

En el caso de *Staphylococcus aureus* se obtuvo mayor sensibilidad frente a las muestras de miel LR40, LR37 y LO53 ya que presentaron su MIC a una dilución del 5% inhibiendo el crecimiento bacteriano por el contrario la bacteria presentó mayor resistencia a la miel de abeja con la muestra RN9 donde se obtuvo una concentración mínima inhibitoria con la dilución de miel más alta 20%.

#### 4.1.4 MIC *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Tabla 9

Concentración mínima inhibitoria de la concentración de miel en las diferentes muestras para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Miel	3%	3%	5%	5%	8%	8%	10%	10%	15%	15%	20%	20%	MIC (DILUCIÓN)
OR59	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5%
OR23	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	20%
LR41	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8%
LR40	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	15%
PS15	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	10%
LR37	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5%
LO40	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	15%
LO43	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	15%
LO53	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	>20%
RN9	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8%

La bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina presentó sensibilidad desde la dilución de miel al 5% con las muestras OR59 y LR37 y la muestra de miel frente a la cual el microorganismo mostró mayor resistencia ya que no hubo inhibición bacteriana fue LO53.

Las variaciones en sensibilidad y resistencia que muestran los microorganismos frente a las distintas muestras de miel pueden deberse a la composición de cada miel, así mismo como a sus propiedades dependiendo de la provincia y zona geográfica en la cual fue recolectada y otros factores como especie de abeja, dieta, entre otros; estos datos son pertenecientes a otra investigación.

## 4.2 Resultados bivariados

### 4.2.1 Efecto inhibitorio de la dilución de miel al 3%

Tabla 10

Análisis del efecto inhibitorio de la dilución de la miel al 3%

	Crecimiento	%	Muerte	%
<i>S. agalactiae</i>	9	90	1	10
<i>S. epidermidis</i>	9	90	1	10
<i>S aureus</i> ATCC	10	100	0	0
MRSA	10	100	0	0
TOTAL	38		2	

Las muestras de bacterias sometidas a tratamiento con la miel de abeja en una dilución al 3% mostraron resultados donde no existe efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano para *Staphylococcus aureus* ATCC y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ya que se encontró crecimiento en un 100% respectivamente, pero por otro lado hubo muerte en una de las muestras de miel 10% para *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus epidermidis*.

### 4.2.2 Efecto inhibitorio de la dilución de miel al 5%

Tabla 11

Análisis del efecto inhibitorio de la dilución de la miel al 5%

	Crecimiento	%	Muerte	%
--	-------------	---	--------	---

<i>S. agalactiae</i>	7	70	3	30
<i>S. epidermidis</i>	5	50	5	50
<i>S aureus</i> ATCC	7	70	3	30
MRSA	9	90	1	10
TOTAL	28		12	

Las muestras bacterianas tratadas con la miel de abeja en dilución al 5% arrojaron resultados donde se observa una mayor sensibilidad de la bacteria *Staphylococcus epidermidis* en un 50% de las muestras de miel, y también se encontró sensibilidad a la miel de abeja en las muestras de MRSA en un 10%. Mientras que *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* presentaron mayor resistencia frente a la miel en un 70% de las muestras.

#### 4.2.3 Efecto inhibitorio de la dilución de miel al 8%

Tabla 12

*Análisis del efecto inhibitorio de la dilución de la miel al 8%*

	Crecimiento	%	Muerte	%
<i>S. agalactiae</i>	6	60	4	40
<i>S. epidermidis</i>	1	10	9	90
<i>S aureus</i> ATCC	4	40	6	60
MRSA	6	60	4	40
TOTAL	17		23	

Las muestras de miel de abeja mostraron un potente efecto antibacteriano donde *Staphylococcus epidermidis* presentó sensibilidad en un 90% de las muestras y hubo mayor resistencia por parte de MRSA y *Streptococcus agalactiae* presentando muerte son en un 40% de las muestras de miel de abeja.

#### 4.2.4 Efecto inhibitorio de la dilución de miel al 10%

Tabla 13

*Análisis del efecto inhibitorio de la dilución de la miel al 10%*

	Crecimiento	%	Muerte	%
<i>S. agalactiae</i>	4	40	6	60
<i>S. epidermidis</i>	1	10	9	90
<i>S aureus</i> ATCC	3	30	7	70
MRSA	5	50	5	50
<b>TOTAL</b>	<b>13</b>		<b>27</b>	

Valorando los resultados obtenidos de las muestras tratadas con la dilución de miel de melipónido al 10% se encontró en el caso de *Staphylococcus epidermidis* mayor sensibilidad en un 90% las muestras de miel, y un menor efecto inhibitorio de la miel en el caso de MRSA con un 50% de muerte en las muestras.

#### 4.2.5 Efecto inhibitorio de la dilución de miel al 15%

Tabla 14

*Análisis del efecto inhibitorio de la dilución de la miel al 15%*

	Crecimiento	%	Muerte	%
<i>S. agalactiae</i>	3	30	7	70
<i>S. epidermidis</i>	0	0	10	100
<i>S aureus</i> ATCC	1	10	9	90
MRSA	1	10	9	90
<b>TOTAL</b>	<b>5</b>		<b>35</b>	

Los resultados obtenidos de la valoración de las bacterias y la miel de abeja en dilución al 15% arrojaron los siguientes datos. La muestra bacteriana donde se obtuvo una completa sensibilidad a la miel de abeja en un 100% de las muestras fue con *Staphylococcus epidermidis* y donde hubo mayor resistencia del microorganismo presentando muerte en 70% de las muestras fue con el caso de *Staphylococcus epidermidis*.

#### 4.2.6 Efecto inhibitorio de la dilución de miel al 20%

Tabla 15

*Análisis del efecto inhibitorio de la dilución de la miel al 20%*

	Crecimiento	%	Muerte	%
<i>S. agalactiae</i>	3	30	7	70
<i>S. epidermidis</i>	0	0	10	100
<i>S aureus</i> ATCC	0	0	10	100

MRSA	1	1	9	90
<i>TOTAL</i>	4		36	

La concentración de miel al 20% fue donde se obtuvo mayor sensibilidad en un 100% en las muestras de *S. epidermidis* y *S. aureus* ATCC, por otro lado el menor efecto inhibitorio de la miel de abeja se presentó con un crecimiento del 70% de las muestras del microorganismo *S. agalactiae*.

Se obtuvieron diferentes resultados donde se puede observar que cada muestra de miel de abeja posee una diferente actividad inhibitoria frente al crecimiento de cada uno de los microorganismos evaluados en la investigación, ciertas muestras de miel poseen mayor o menor efecto cuando se utilizan como tratamiento para las diferentes especies y cepas bacterianas del estudio, así como cada microorganismo presenta mayor o menor sensibilidad cuando son tratadas con la miel de abeja.

#### 4.2.7 Relación entre muerte y crecimiento bacteriano con la dilución de miel utilizada y dilución de antibiótico

Tabla 16

*Porcentaje de crecimiento y muerte de Streptococcus agalactiae en las diferentes diluciones de miel y antibiótico*

		<i>S. agalactiae</i>	
		Recuento	Porcentaje
3%	Crecimiento	9	90%
	Muerte	1	10%
5%	Crecimiento	7	70%
	Muerte	3	30%
8%	Crecimiento	6	60%

	Muerte	4	40%
10%	Crecimiento	4	40%
	Muerte	6	60%
15%	Crecimiento	3	30%
	Muerte	7	70%
20%	Crecimiento	3	30%
	Muerte	7	70%
Penicilina	Crecimiento	10	100%
0.12	Muerte	0	0%
Penicilina	Crecimiento	10	100%
0.25	Muerte	0	0%
TOTAL		80	

En el cuadro anterior se observa que el antibiótico comercial elegido para el ensayo no tuvo efecto inhibitorio frente a la bacteria *Streptococcus agalactiae*, mostró resistencia en las dosis recomendadas para bacterias sensibles y resistentes según el manual CLSI. Por otro lado la mayor acción inhibitoria se presentó en un 70% con las diluciones de miel al 15% y 20%.

Tabla 17

*Porcentaje de crecimiento y muerte de Staphylococcus epidermidis en las diferentes diluciones de miel y antibiótico*

<i>S. epidermidis</i>			
		Recuento	Porcentaje
3%	Crecimiento	9	90%
	Muerte	1	10%
5%	Crecimiento	5	50%
	Muerte	5	50%
8%	Crecimiento	1	10%
	Muerte	9	90%
10%	Crecimiento	1	10%
	Muerte	9	90%
15%	Crecimiento	0	0%
	Muerte	10	100%
20%	Crecimiento	0	0%
	Muerte	10	100%
Penicilina	Crecimiento	10	100%
0.12	Muerte	0	0%

Penicilina	Crecimiento	10	100%
0.25	Muerte	0	0%
TOTAL		80	

Las muestras de miel en dilución al 15% y 20% mostraron una completa efectividad de inhibición del crecimiento bacteriano al 100% en la muestra bacteriana contra *Staphylococcus epidermidis*, y se obtuvo la menor inhibición al 10% con la muestra de miel en dilución al 3%. Por otro lado, se observa que el antibiótico escogido, con la penicilina la bacteria mostró resistencia hacia el antibiótico en las dos diluciones utilizadas.

Tabla 18

*Porcentaje de crecimiento y muerte de Staphylococcus aureus ATCC en las diferentes diluciones de miel y antibiótico*

		S aureus ATCC	
		Recuento	Porcentaje
3%	Crecimiento	10	100%
	Muerte	0	0%
5%	Crecimiento	7	70%
	Muerte	3	30%
8%	Crecimiento	4	40%
	Muerte	6	60%
10%	Crecimiento	3	30%
	Muerte	7	70%
15%	Crecimiento	1	10%
	Muerte	9	90%
20%	Crecimiento	0	0%
	Muerte	10	100%
Penicilina	Crecimiento	10	100%
	0.12 Muerte	0	0%
Penicilina	Crecimiento	10	100%
	0.25 Muerte	0	0%
TOTAL		80	

La tabla anterior muestra inhibición bacteriana en un 100% con la dilución de miel al 20% frente a *Staphylococcus aureus* ATCC y la dilución con menor

efectos inhibitorios en el crecimiento bacteriano fue al 3% con un porcentaje de 0% de muerte del microorganismo. La penicilina no presentó efectos antibacterianos, la bacteria mostró resistencia completa hacia el antibiótico en las dosis sensible y resistente.

Tabla 19

*Porcentaje de crecimiento y muerte de MRSA en las diferentes diluciones de miel y antibiótico*

		MRSA	
		Recuento	Porcentaje
3%	Crecimiento	10	100%
	Muerte	0	0%
5%	Crecimiento	9	90%
	Muerte	1	10%
8%	Crecimiento	6	60%
	Muerte	4	40%
10%	Crecimiento	5	50%
	Muerte	5	50%
15%	Crecimiento	1	10%
	Muerte	9	90%
20%	Crecimiento	1	10%
	Muerte	9	90%
Penicilina	Crecimiento	10	100%
0.12	Muerte	0	0%
Penicilina	Crecimiento	10	100%
0.25	Muerte	0	0%
TOTAL		80	

Las muestras de miel de abeja de melipónido no llegaron a su máxima inhibición de crecimiento bacteriano para el cultivo de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, sin embargo se alcanzó la muerte de los microorganismos en un 90% en el caso de las diluciones de miel al 15% y 20%. Con respecto al antibiótico comercial utilizado se encontró que al igual que las demás bacterias en estudio MRSA posee resistencia frente a la penicilina, no se encontraron efectos inhibitorios de esta sustancia frente al microorganismo.

Relacionando los valores en porcentaje con respecto a la muerte y al crecimiento de los microorganismos con las diluciones de miel de abeja y antibiótico respectivos se encontraron ciertas diferencias entre las bacterias y su respuesta frente al tratamiento de las diferentes diluciones de miel de abeja, y del antibiótico escogido, la penicilina. Se encontró dentro de todas las muestras de las cuatro bacterias en estudio que el antibiótico elegido no posee efectos inhibitorios en el crecimiento bacteriano, sino que las muestras bacterianas son resistentes a dicha sustancia. Valorando los efectos antibacterianos de la miel de abeja se obtuvieron resultados donde ciertas diluciones poseen mayores efectos inhibitorios que otras diluciones y también dependiendo de la bacteria en estudio, la bacteria con mayor sensibilidad a la miel de abeja fue *Staphylococcus epidermidis* y la que presentó mayor resistencia fue *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. Para concluir todas las diluciones de la miel de abeja poseen efectos inhibitorios sobre el crecimiento, cada una en diferentes porcentajes.

### 4.3 Discusión

Los resultados obtenidos en la investigación mostraron poca inhibición bacteriana con la dilución de miel de abeja al 3%, solamente se encontró inhibición en el 10% de las muestras de miel. En un estudio se presentaron resultados de una dilución de miel al 5,6% donde la actividad microbiana disminuye en comparación con la dilución de 90% (Gamboa & Figueroa, 2009). Por otro lado, utilizando una concentración de miel de abeja *Apis mellifera* en una dilución al 30%, encontró desarrollo abundante de las colonias bacterianas (Becerra, Cabrera, & Solano, 2016). A través de la prueba de concentración mínima inhibitoria se obtuvo la concentración mínima de miel de abeja para inhibir el crecimiento bacteriano el cual en una dilución al 2,88% y 2,89% inhibía el crecimiento de distintos tipos de miel (Cooper & Molan, 1999). Dependiendo de los microorganismos utilizados las mieles correspondientes a diluciones menores no presentan un gran efecto inhibitorio del crecimiento de las bacterias.

Los resultados obtenidos con el tratamiento de miel en dilución al 5% mostraron que la miel posee efecto inhibitorio en las muestras bacterianas no mayor al 50% de muestras. En un estudio con muestras de miel de *Apis mellifera* de cuatro diferentes zonas en Zulia, se mostraron resultados bacteriostáticos de la dilución de muestra al 5% con cierto tipo de bacterias como *Escherichia coli* (Cabrera, Ojeda, Céspedes, & Colina, 2003). De igual manera otro estudio reveló que la dilución al 5% de la miel de abeja muestra resultados de inhibición en el crecimiento bacteriano en menor cantidad que diluciones más altas (Cooper & Molan, 1999). En comparación con los estudios realizados anteriormente y la presente investigación se muestra que la dilución al 5% de miel de abeja posee efectos inhibitorios en el crecimiento, bacteriostáticos más que bactericidas, ya que con esta dilución de miel no es posible obtener resultados de muerte de los microorganismos al 100%.

La dilución de miel de abeja al 8% en estudio mostró mayores efectos inhibitorios en la bacteria *Staphylococcus epidermidis* más que en los demás microorganismos, se obtuvo muerte en un 90% de las muestras. Un estudio realizado en Costa Rica sobre actividad antimicrobiana de mieles de abeja para la inhibición de crecimiento bacteriano arrojó resultados con distintas diluciones de miel, una de ellas al 6,25% la cual no tuvo éxito en la inhibición de crecimiento en seis tipos de bacterias diferentes aunque utilizando la concentración máxima al 100% de la miel, ésta obtuvo resultados con un mayor porcentaje de inhibición de las bacterias (Estrada, Gamboa, Chavez, & Arias, 2005). Se demostró también en otro estudio que a través del MIC la miel de abeja posee capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano a una dilución del 6,25% (Anthimidou & Mossialos, 2013). Comparando nuestros resultados con los demás estudios se encuentran diferencias, ya que una dilución de miel menor al 8% no es capaz de obtener el efecto inhibitorio de las bacterias, esto se puede deber al tipo de bacteria utilizada para la investigación o por las diferencias que existen entre los tipos de mieles de abeja que son provenientes de distintas zonas o distintos tipos de abeja.

En la investigación el tratamiento con miel en dilución al 10% mostró resultados positivos en comparación con la dilución de miel de abeja al 8%, hubo mayores efectos inhibitorios en las muestras bacterianas. Un estudio en el que se utilizó miel de Manuka y siete muestras de microorganismos mostraron resultados de los cuales se obtienen las diluciones de miel indicadas para una inhibición media de crecimiento, la cual varía entre 0% y 9% y para una completa inhibición de las mismas se requiere una concentración entre 4% y 9% lo que difiere en los resultados de esta investigación, ya que en la dilución al 10% de nuestras muestras de miel de abeja se obtiene muerte de las muestras bacterianas no completamente sino en un 67% (Willix, Molan, & Harfoot, 1992). En un estudio realizado con miel de abeja *Apis mellifera* y miel de abeja sin aguijón, se encontró que las muestras de miel de abeja con aguijón a una dilución del 12,5% presentaba menor muerte que las abejas sin aguijón a través de pruebas en platos con agar sembrados con las bacterias y en las pruebas MIC se encontraron los mismos resultados donde la dilución para la inhibición del

crecimiento bacteriano fue de 6,25% en los dos tipos de miel (Ewnetu & Lemma, 2013). La miel de abeja sin agujijón en una dilución al 12,5% tiene mayores efectos inhibitorios que la miel de abeja con agujijón, nuestros resultados poseen también efectos inhibitorios y se puede observar esto en la muestras en dilución al 10% en diferencia al estudio realizado con miel en dilución al 10%, esto quiere decir que las muestras de miel utilizadas en esta investigación poseen mejor efecto antibacteriano dependiendo de factores como la zona de cosecha de la miel así como también del tipo de abeja de la cual es proveniente la miel.

Otra investigación realizada con nueve muestras de miel de abeja de India mostraron resultados a través de pruebas de concentración mínima inhibitoria donde se evaluó que las muestras de miel unifloral tuvieron mayor éxito al inhibir el crecimiento bacteriano en diluciones de hasta el 15%, las demás muestras de miel mostraron inhibición pero en menor cantidad (Deshpande & Kulkarni, 2010). Un estudio para evaluar la actividad antimicrobiana de la miel de abeja frente a microorganismos causantes de mastitis reveló que la concentración mínima inhibitoria para el crecimiento de las bacterias fue con la dilución de miel al 14%, esto ocurrió con el 40% de las cepas sensibles hacia la miel de abeja (Rodríguez Í. , 2012). Un estudio donde se utilizaron varios tipos de miel para observar su capacidad antimicrobiana dieron como resultado que la miel de Manuka a una dilución del 12,5% presentaba inhibición en el crecimiento bacteriano y la miel de Tualang presentaba la concentración mínima para inhibición a una dilución entre el 8,75% al 25% de dilución de la misma (Mandal & Mandal, 2011). Los resultados de las diferentes investigaciones se relacionan a este ensayo ya que las muestras de miel de abeja en dilución a 15% tuvieron excelentes resultados frente a un efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias utilizadas relacionadas con la presentación de mastitis, poniendo como principal ejemplo a *Staphylococcus epidermidis* la cual inhibió por completo su crecimiento con esta muestra de miel. Se puede decir que mientras la dilución de la miel de abeja sea mayor existe mayor efecto inhibitorio de los microorganismos que estén expuestos al tratamiento con miel.

Existe un estudio realizado con muestras de miel de abeja sin aguijón que arrojó resultados sobre la actividad antimicrobiana de la misma, donde se encontró que los efectos inhibitorios de la miel eran efectivos a través del uso de la miel pura y su dilución al 25% (Zamora & Arias, 2011). En otro estudio una dilución de miel de abeja al 20% mostró resultados de crecimiento escaso de los microorganismos en comparación con la muestra de miel pura al 100% la cual inhibió el crecimiento total de las bacterias (Efem, Udoh, & Iwara, 1992). Se realizó un estudio experimental en el cual se utilizó miel de abeja intramamaria para el tratamiento de mastitis subclínica en diferentes concentraciones, la miel utilizada en dilución al 30%, el primer muestreo realizado a las 24 horas después de la aplicación del tratamiento mostró que el 100% de los cuartos mamarios en tratamiento disminuyeron su carga bacteriana en un 56% de la carga inicial y a los 7 días post tratamiento presentaron 73% de disminución de la carga bacteriana inicial en el 90% de los cuartos en tratamiento, el otro 10% aumentaron su carga bacteriana (Ordoñez, 2015). Los resultados de la investigación presente con las muestras de miel en dilución al 20% poseen resultados bastantes similares ya que la miel de abeja sin aguijón en dilución al 20% tiene efectos inhibitorios positivos frente al crecimiento de las bacterias, así mismo como muestras bacterianas con miel de abeja con aguijón poseen efectos inhibitorios, en comparación con diluciones más altas de la miel la de 20% adquiere menores efectos antibacterianos debido a la baja concentración de la miel ya que concentraciones más altas pueden obtener mayores porcentajes de muerte en las muestras bacterianas.

Un estudio realizado en Canadá en el Western College of Veterinary Medicine con patógenos como *S. aureus* y *S. pseudointermedius* aislados de animales, presentaron resistencia a la penicilina en un 31% y 8% respectivamente cada microorganismo (Rubin, Ball, & Chirino-Trejo, 2011). Otro estudio en un hospital de Nueva York reveló un aumento de la susceptibilidad que presentaba *Staphylococcus aureus* conforme pasaban los años desde el 2003 al 2012 mostrando inicialmente un porcentaje de susceptibilidad del 6% - 7% hasta llegar a un 15% en el último año (Crane, 2014). Otro estudio realizado en McGill University Health Center en Canadá con muestras de *Staphylococcus aureus*

resistente a meticilina (MSSA), mostró resultados donde se observó que el 28% de las muestras eran susceptibles a la penicilina mientras que las muestras que mostraron resistencia al antibiótico también presentaban resistencia a otros antimicrobianos principalmente la eritromicina utilizada en el estudio (Cheng, Cheng, & Lee, 2016). En un estudio se utilizaron cepas de *estafilococos* resistentes a meticilina como marcador de resistencia hacia los antibióticos y se observó si las mismas presentaban resistencia a penicilina y vancomicina, donde se encontró que las cepas de *S. aureus* y *Estafilococco* coagulasa negativo presentaron resistencia en un 100% los dos microorganismos (Nodarse, 2001). La resistencia bacteriana ha ido aumentando con el extremado uso de antibióticos para las patologías, en esta investigación se observó que los cuatro microorganismos en estudio presentaron resistencia al antibiótico utilizado, la penicilina el 100% de las muestras bacterianas mostraron resistencia en las dosis sensible y resistente según el manual CLSI.

Un estudio llevado a cabo en el cantón Mejía en la Hacienda Lechera Casiganda con muestras de miel de abeja en tres concentraciones 100%, 50% y 30% para el tratamiento de vacas con mastitis se describieron resultados donde el género de *Streptococos* spp. en el primer muestreo a las 24 horas post tratamiento obtuvo crecimiento en las diluciones de miel al 100% y 50% y en el segundo muestreo a las 72 horas después del tratamiento con la muestra de miel pura no se obtuvo crecimiento de la bacteria por otro lado en la dilución al 50% todavía presentaba multiplicación bacteriana (Carpio, 2018). Se utilizaron muestras de mieles monoflorales de Quillay para evaluar la actividad antimicrobiana de la misma, donde se observó que para el *Streptococo* grupo B hemolítico, hubo inhibición del crecimiento de la bacteria en las dos muestras de miel y con una menor concentración de la miel a diferencia de *Pseudomona aeruginosa* también en estudio (Montenegro, Salas, Peña, & Pizarro, 2009). Un estudio realizado con muestras de miel de abeja de Manuka, Honeydew y miel artificial en diluciones al 100% para evaluar su capacidad contra bacterias patógenas que crecen en biofilms de heridas, se encontró una gran capacidad de las mieles naturales para disminuir la viabilidad de la multiplicación de las células de *Streptococcus agalactiae* en un tratamiento con la miel de 48 horas (Sojka, Valachova,

Bucekova, & Majtan, 2016). Otro estudio realizado en Suecia mostró resultados de la bacteria *Streptococcus agalactiae* frente a la tratamiento de penicilina donde no mostró resistencia a la misma pero si hubo porcentaje de resistencia frente a tetraciclina y eritromicina (Bengtsson, y otros, 2009). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las muestras de miel utilizadas poseen efecto inhibitorio en más del 50% de las muestras con el uso de miel en la dilución al 10%, nuestros resultados difieren de los demás ya que se muestra que el tipo de miel utilizada en este estudio es más potente contra los microorganismos de este género debido al tipo de miel, abeja o la zona de donde provenga la misma, por otro lado la bacteria *Streptococcus agalactiae* en este estudio presenta resistencia hacia la penicilina.

En un estudio realizado con cuatro muestras de miel, una de ellas de abeja sin aguijón y las demás de abeja *Apis mellifera* de Nueva Zelanda, Cuba y Kenya se encontró la reducción del biofilm de *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, principalmente en las concentraciones mayores al 8% y además se observó notablemente que el género *M. beecheii* de las abejas sin aguijón era la miel más efectiva para la prevención del crecimiento del biofilm de *Staphylococcus epidermidis* y poseía inhibición de la multiplicación bacteriana desde la dilución de miel al 2% en *S. epidermidis* (Morrone, y otros, 2018). Un estudio para valorar la actividad antimicrobiana de la miel de abeja y pan de abeja fue desarrollado con *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus* y diluciones de miel al 50%, 25% y 10% donde se observó que de las 38 muestras de miel utilizadas 11 de ellas no presentaron inhibición del microorganismo *Staphylococcus epidermidis* y 5 de ellas perdieron por completo su actividad antibacteriana después de la dilución de miel del 25% (Baltrusaitė, Venskutonis, & Ceksteryte, 2007). Otro estudio donde se utilizaron muestras de miel de abeja en diferentes concentraciones mostró los porcentajes de inhibición de crecimiento del microorganismo *Staphylococcus epidermidis*, en el cual se observó que la muestra de miel pura obtuvo un 68% de muerte, la dilución de 75% un 24% de mortalidad, la dilución del 50% un 16% de inhibición de la bacteria y por último la dilución del 25% y menor no obtuvo éxito al inhibir el crecimiento de la bacteria (Estrada, Gamboa, Chavez, & Arias, 2005). Los

resultados del presente estudio muestran por completo la efectividad inhibitoria de la miel de abeja sin aguijón en la dilución de 15% y 20% donde se muestra 100% de muerte de las muestras bacterianas, lo cual difiere de otros estudios ya que existe inhibición del microorganismos *Staphylococcus epidermidis* pero en diluciones más altas y una dilución al 25% no es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, por otro lado en un estudio la miel de abeja sin aguijón mostró resultados positivos en la inhibición del crecimiento de biofilm de esta bacteria y mostró efectos inhibitorios a partir de la dilución de 2%, la miel utilizada fue del género de *M. beecheii* lo cual puede explicar que dependiendo de la especie de abeja sin aguijón se obtienen mejores resultados inhibitorios con su miel.

Un estudio con 29 muestras de miel de abeja producidas en Suiza fue realizado para caracterizar el potencial antibacterial de la misma a través de resultados de concentración mínima inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*, donde se revelo sensibilidad a la miel de abeja con una concentración mínima inhibitoria de 4%, 13 de las 29 muestras dieron resultados efectivos mostrando valores MIC debajo del 10% (Godocikova, Bugarova, Kast, Majtan, & Majtan, 2020). En un estudio para la evaluación de dos métodos de sensibilidad para la inhibición del crecimiento de microorganismos con el uso de miel de abeja al 100% de *Apis mellifera*, mostró que el método de difusión del pozo de agar es más efectivo que el método KirbyBauer ya que se mostraron halos de inhibición de 25mm de la bacteria *Staphylococcus aureus* frente al tratamiento con miel de abeja y por otro lado el método KirbyBauer mostro halos de inhibición de 21mm (Montero, Vayas, Avilés, Pazmiño, & Erazo, 2018). En un estudio en el cual se valoró la actividad antimicrobiana de cuatro distintas mieles de abeja se encontró a través de resultados de concentración mínima inhibitoria que la concentración mínima para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se encontraba alrededor de una dilución del 25% de la miel de abeja (Mandal & Mandal, 2011). En el presente trabajo se valoró que as muestras de *Staphylococcus aureus* tratadas con la dilución de miel al 10% presentaron muerte solo en un 70% en comparación con la dilución de la miel a 20% hubo completo efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano en el 100% de las muestras, por otro lado nuestros resultados difieren del último estudio ya que las mieles que se utilizaron tuvieron efectos inhibitorios

sobre la dilución de miel de abeja al 25%. Cada miel de abeja proviene de diferentes zonas geográficas y especies de abeja, es por esto que se pueden obtener resultados distintos, además de que la dilución de cada miel puede variar en componentes.

Un estudio efectuado con muestras de miel de abeja de Arabia Saudí contra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina mostró gran poder antibacteriano en la cepa por el método de difusión en agar, la muestra con mayor halo de inhibición fue de 18 mm con la dilución de miel al 50% (Barkaat, Mahmoud, Ullah, Mohamad, & Shafiq, 2019). Un estudio para la valoración de la sensibilidad de bacterias gram positivas como MRSA a la miel de abeja donde se utilizaron muestras de miel artificial y miel de Manuka, como resultados para la miel artificial no se obtuvieron actividades inhibitorias de crecimiento de la bacteria hasta con la dilución más alta al 30%, por otro lado el MIC de la miel de Manuka fue la mayoría en la dilución al 3% de la miel (Cooper, Molan, & Harding, 2002). En un estudio realizado para valorar la actividad antimicrobiana de miel de *Apis mellifera* contra la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina se utilizaron dos diluciones de miel de abeja al 100% y 50%, se valoró la actividad de ésta a través de medición de halos de inhibición, se observaron resultados donde el promedio de halo de inhibición en la dilución al 50% fue de 6.2 mm y en la muestra pura al 100% fue de 10.55 mm, la última dilución tuvo inhibición de crecimiento con mayor significancia (Noé, 2015). En un estudio con mieles de Etiopía donde se evaluaron mieles de abejas con y sin aguijón para la inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, se encontró que hubo gran inhibición con las muestras diluidas al 50% con un valor de MIC al 6.25% siendo la miel de abeja sin aguijón con mayor inhibición del crecimiento bacteriano, como control también se realizaron pruebas de difusión en disco con antibióticos y se vieron como resultados resistencia del microorganismo hacia tetraciclina y meticilina, por otro lado se observó un halo de inhibición de 10 mm hacia la amoxicilina (Ewnetu & Lemma, 2013). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la miel utilizada posee efectos inhibitorios a partir de la dilución de 5%, donde en otros estudios se ha utilizado la miel de abeja en diluciones más altas para la obtención de un efecto inhibitorio en el crecimiento

bacteriano. Esto quiere decir que el tipo de miel utilizada en este ensayo posee una mejor calidad con respecto a sus componentes capaces de actuar como antibacterianos en relación a otras mieles utilizadas para la misma bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Por último se encontró que esta bacteria ha desarrollado resistencia hacia antibióticos como tetraciclina y meticilina, en el presente estudio se observó que la bacteria posee también resistencia al antibiótico del estudio, la penicilina.

#### 4.4 Limitantes

- Familiarización con normas y procedimientos del Laboratorio de Investigación, acatamiento de las normas según cada investigación y la confidencialidad de los procedimientos utilizados así como de los resultados obtenidos en cada ensayo, también realizar un reconocimientos de todos los insumos que se utilizan en cada uno de los procedimientos dependiendo del tipo de ensayo que se quiera realizar y las normativas para realizar los pedidos de insumos o equipos que se requieran utilizar según el calendario previamente organizado por los coordinadores del laboratorio.
- Capacitación sobre el funcionamiento y protocolos de uso de cada equipo a utilizar en la investigación, realizar una inducción con el personal capacitado del laboratorio para obtener mayor información sobre el uso de cada equipo en los diferentes ensayos y sobre el uso de los insumos o sustancias que se deben utilizar con cada uno así mismo sobre el correcto desecho de sustancias peligrosas con desechos biológicos o tóxicos para las personas.
- Uso y mantenimiento de la bioseguridad en las distintas áreas del laboratorio por escasa vestimenta de cada área. Dentro del laboratorio en cada área se debe utilizar vestimenta específica de acuerdo a los trabajos que se vayan a realizar, es por esto que es de suma importancia el mantenimiento de la bioseguridad en todos los espacios y dependiendo del trabajo a realizar utilizar todos los implementos adecuados para evitar contaminaciones cruzadas entre áreas y agentes que pueden ser trasladados por los investigadores.
- Las muestras de miel de abeja de las diferentes provincias no pudieron ser analizadas en este estudio, ya que forman parte de otra investigación y otro tipo de información el cual se basa en la identificación de cada miel

y del tipo de especie de abeja de la cual se obtuvo esa muestra específica de miel.

## CAPÍTULO V. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

- Se utilizaron los microorganismos *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* para el estudio ya que son microorganismos que se encuentran directamente relacionados y presentes en la manifestación de mastitis bovina, por otro lado se seleccionó una cepa patógena *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina para la comparación con el uso del antibiótico en estudio.
- Las diluciones de miel de abeja preparadas tuvieron distintos efectos antibacterianos frente a los microorganismos donde se observó que para *Streptococcus agalactiae* la dilución con mayor efecto antibacteriano fue la de 20% y la dilución con menor efecto fue la de 3%. Para *Staphylococcus epidermidis* la dilución más potente fue desde 15% donde y la dilución de miel menos potente fue de 3%. En el caso de *Staphylococcus aureus* ATCC la dilución con mayor inhibición del crecimiento fue de 15% y 20% y la dilución con menor efecto fue de 3%. Por último, con la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina la dilución con mayor efecto fue de 20% y la dilución menos efectiva frente a la inhibición fue la de 3%. Concluyendo, la bacteria con mayor sensibilidad a la miel de abeja fue *Staphylococcus epidermidis* y la más resistente fue *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.
- Al valorar la actividad antimicrobiana de la miel de abeja de melipónidos en comparación a la penicilina se encontró que la dilución que tuvo mayor efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano fue la de 20% en las cuatro bacterias en estudio encontrando que la más sensible fue *S. epidermidis* y la más resistente MRSA en relación a las dosis sensible y resistente del antibiótico donde se obtuvo resistencia por parte de todos los microorganismos del estudio.

- La miel de abejas sin aguijón (melipónido) posee mayores efectos antimicrobianos en relación con el antibiótico en estudio, la penicilina. La sensibilidad de los microorganismos utilizados frente al antibiótico fue nula en comparación con la respuesta de inhibición de las bacterias con el tratamiento de la miel de abeja en diferentes diluciones. Es por esto que los resultados de esta investigación demuestran la posibilidad del uso de miel de abeja como alternativa al uso de la penicilina para el tratamiento de estos microorganismos relacionados a la mastitis bovina además que las diluciones tan bajas de la miel de abeja son factibles para su realización y tratamiento de las bacterias.

## 5.2 Recomendaciones

- Realizar el estudio con microorganismos resistentes a ciertos antibióticos para probar si estos son sensibles a la miel de abeja de melipónido.
- Realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana a través del método de difusión en discos y medir los halos de inhibición.
- Identificar el grado de inhibición de crecimiento bacteriano con diluciones más altas y miel sin diluir.
- Utilizar distintos antibióticos cuyos microorganismos no posean resistencia.
- Realizar el estudio de tratamiento a mastitis bovina con las diluciones de miel que se estudiaron a nivel de campo con los animales problema.
- Realizar exámenes clínicos y de laboratorio antes y después a los animales a los cuales se les vaya a realizar el tratamiento con la miel de abeja para comprobar la eficiencia de la misma a nivel fisiológico del animal enfermo.
- Evaluación del efecto antibacteriano de la aplicación de la miel intramamaria con las diluciones estudiadas en la presentación de mastitis bovina.

## REFERENCIAS

- Aguilar, F., & Álvarez, C. (2019). *Mastitis Bovina*. Machala: UTMACH.
- Andresen, H. (2001). *Mastitis: Prevención y control*. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v12n2/a10v12n2.pdf>
- Andresen, H. (2001). *MASTITIS: PREVENCIÓN Y CONTROL*. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v12n2/a10v12n2.pdf>
- Anthimidou, E., & Mossialos, D. (2013). Antibacteria Activity of Greek and Cypriot Honeys Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Comparison to Manuka Honey. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*, 45.
- Asís, M. (2007). APITERAPIA 101 PARA TODOS: COMO USAR LOS SIETE PRODUCTOS DE LA COLMENA PARA CURAR A UNA COMUNIDAD. En M. Asís. Miami, Florida.
- Baltrusayte, V., Venskutonis, P., & Ceksteryte, V. (2007). Antibacterial Activity of Honey and Beebread of Different Origin Against *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Food Technology and Biotechnology*.
- Baos, E. (2017). *Caracterización y seguimiento* .
- Barkaat, M., Mahmoud, Y., Ullah, Z., Mohamad, A., & Shafiq, A. (2019). In vitro evaluation of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* susceptibility to Saudi honeys. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.
- BD. (2005). *Patrón de turbidez BBL preparado. McFarland Turbidity Standard No. 0.5*. Obtenido de [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)\\_es.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf)
- Becerra, D., Cabrera, J., & Solano, M. (2016). Efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones frente a *staphylococcus aureus*. *Scielo*.
- Bengtsson, B., Unnerstad, H., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Ost, M., & Waller, K. (2009). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Veterinary Microbiology*.
- Cabrera, L., Ojeda, G., Céspedes, E., & Colina, A. (2003). ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MIEL DE ABEJAS MULTIFLORALES (*APIS MELLIFERA SCUTELLATA*) DE CUATRO ZONAS APICOLAS DEL ESTADO ZULIA, VENEZUELA. *FCV-LUZ*.
- Calderón, A., & Rodríguez, V. (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*.

- Cantón, R. (2013). *EUCAST Comité Europeo del Antibiograma*. Obtenido de [https://www.aemps.gob.es/laAEMPS/eventos/AEMPS/2013/docs/J-plan-resistencias-antimicrobianas/p\\_RafaelC-Uantibioticos.pdf?x99050](https://www.aemps.gob.es/laAEMPS/eventos/AEMPS/2013/docs/J-plan-resistencias-antimicrobianas/p_RafaelC-Uantibioticos.pdf?x99050)
- Carpio, A. (Abril de 2018). *EVALUACIÓN DEL EFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DE MIEL DE ABEJAS EN EL TRATAMIENTO DE MASTITIS SUBCLINICA BOVINA*. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15164>
- Cavaleri, S. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*.
- Cheng, M. R., Cheng, A., & Lee, T. (2016). Back to the Future: Penicillin-Susceptible Staphylococcus Aureus. *The American Journal of Medicine*.
- CODEX. (1981). *Codex Normal para la miel*. Obtenido de [file:///C:/Users/sofis\\_000/Downloads/cxs\\_012s%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/sofis_000/Downloads/cxs_012s%20(3).pdf)
- CODEX, S. (1987). *NORMA DE CODEX PARA LA MIEL*. Obtenido de [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/Codex\\_Alimentarius/normativa/codex/stan/12-1987.PDF](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/Codex_Alimentarius/normativa/codex/stan/12-1987.PDF)
- Concha, C. (s.f.). *MASTITIS BOVINA: ASPECTOS DE DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y CONTROL*. Obtenido de [file:///C:/Users/sofis\\_000/Downloads/mastitis%20bovina%20nuevos%20aspectos%20de%20diagnostico%20tratamiento%20y%20control%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/sofis_000/Downloads/mastitis%20bovina%20nuevos%20aspectos%20de%20diagnostico%20tratamiento%20y%20control%20(1).pdf)
- Cooper, R., & Molan, P. (1999). Antibacteria activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds. *Journal of the royal society of medicine*, 284.
- Cooper, R., & Molan, P. (1999). The use of honey as an antiseptic in managing Pseudomonas infection. *Scielo*.
- Cooper, R., Molan, P., & Harding, K. (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology*.
- Coyle, M. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*.
- Crane, J. (2014). Resurgence of Penicillin-susceptible Staphylococcus aureus at a hospital in New York State, USA. *J Antimicrob Chemother*.
- DANE. (2014). *La mastitis bovina, enfermedad infecciosa de gran impacto en la producción lechera*. Obtenido de [https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos\\_s\\_factores\\_de\\_produccion\\_ago\\_2014.pdf](https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_s_factores_de_produccion_ago_2014.pdf)
- Dardón, M., & Enríquez, E. (2008). *Caracterización físico química y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin agujón (Meliponini) de Guatemala*. Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442008001200011](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442008001200011)

- Dardón, M., & Enríquez, E. (2008). *Caracterización físico-química y antibacteriana de la miel de nueve especies de abeja sin aguijón (meliponini) de Guatemala*. Obtenido de <http://sss.redalyc.org:9081/articulo.oa?id=33913809>
- De la Rosa, M., & de Cueto, M. (s.f.). *Streptococcus Agalactiae*. SEIMC. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/agalac.pdf>
- Deshpande, S., & Kulkarni, K. (2010). In Vitro Effect in Some Indian Honeys on Staphylococcus aureus from Wounds. *Indian Journal of Experimental Biology*.
- Díaz, R. (2015). *ABEJAS SIN AGUIJÓN: INTRODUCCIÓN A LA MELIPONICULTURA*. Obtenido de <https://www.zamorano.edu/2015/07/08/abejas-sin-aguijon-introduccion-a-la-meliponicultura/>
- Echevarria, J., & Iglesias, D. (2003). *Estafilococo Meticilino Resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos*. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v14n4/v14n4tr01.pdf>
- Efem, S., Udoh, K., & Iwara, C. (1992). The Antimicrobial Spectrum of Honey and Its Clinical Significance . *Infection* 20.
- Elizondo, J. (2010). *Anatomía de la ubre y secreción de la leche*. ECAG. Obtenido de [https://eeavm.ucr.ac.cr/Documentos/ARTICULOS\\_PUBLICADOS/2010/155.pdf](https://eeavm.ucr.ac.cr/Documentos/ARTICULOS_PUBLICADOS/2010/155.pdf)
- Estrada, H., Gamboa, M., Chavez, C., & Arias, M. (2005). Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Salmonella enteritidis, Listeria monocytogenes y Aspergillus niger. Evaluación de su carga. *Scielo*.
- EUCAST. (Febrero de 2012). *EUCAST: método de difusión con discos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. Obtenido de <http://coesant-seimc.org/documents/Descripci%C3%B3n%20del%20m%C3%A9todo%20de%20disco.pdf>
- Ewnetu, Y., & Lemma, W. B. (2013). Antibacterial effects of Apis mellifera and stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Klebsiella pneumoniae in Gondar, Northwest Ethiopia. *Complementary & Alternative Medicine*, 3-4-5-6.
- Fernández, O., Trujillo, J., Jhon, P., Cerquera, J., & Granja, Y. (2012). *MASTITIS BOVINA: GENERALIDADES Y MÉTODOS DE*

- DIAGNÓSTICO*. Obtenido de [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciosas/bovinos\\_leche/78-mastitis.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf)
- Frank, L. (2009). *Bacterial Classification, Structure and Function*. Obtenido de <http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/pathophys/id/2009/introNotes.pdf>
- Gamboa, V., & Figueroa, J. (2009). PODER ANTIBACTERIAL DE MIELES DE *Tetragonisca angustula*, VALORADA POR CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA. *Acta Biológica Colombiana*, 99-100.
- Godocikova, J., Bugarova, V., Kast, C., Majtan, V., & Majtan, J. (2020). Antibacterial potential of Swiss honeys and characterisation of their bee-derived bioactive compounds. *J Sci Food Agric*.
- Gutiérrez, D. (2016). *Reacción estadística de las propiedades químicas, físicas y microbiológicas de tres muestras de mieles (Apis mellifera) comerciales, distribuidas en supermercados del Distrito Metropolitano de Quito*. Obtenido de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/13244>
- Heringstard, B., Klemetsdal, & Ruane, J. (1999). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *LIVESTOCK PRODUCTION SCIENCE*.
- Herrera, M. (1999). *Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de Laboratorio*. Obtenido de [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85461999000100010](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010)
- IDEXX. (Marzo de 2019). *IDEXX*. Obtenido de <https://www.idexx.com/files/microbiology-guide-interpreting-mic.pdf>
- INEN, N. (1988). *Miel de abeja. Requisitos*. Obtenido de <https://archive.org/details/ec.nte.1572.1988/mode/2up>
- Insuasty, E., Martínez, J., & Jurado, H. (2016). *IDENTIFICACIÓN DE FLORA Y ANÁLISIS NUTRICIONAL DE MIEL DE ABEJA PARA A PRODUCCIÓN APÍCOLA*. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v14n1/v14n1a05.pdf>
- Mandal, M., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 156-157.
- MDM. (2017). *Inserto Patrón Mc Farland*. Obtenido de <http://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2017/07/Patr%C3%B3n-McFarland-05072017-O-P.PD-311-INSERTO-05072017-MDM-cient%C3%ADfica.pdf>
- Mera, R., Muñoz, M., Artieda, J., Ortiz, P., Gonzáles, R., & Vega, V. (2017). *Mastitis Bovina y su repercusión en la calidad de la leche*. *REDVET*. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/636/63653574004.pdf>

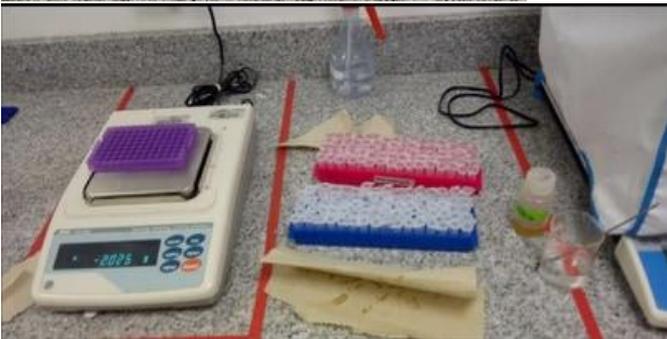
- Montenegro, G., Salas, F., Peña, R., & Pizarro, R. (2009). Actividad antibacteriana y antifúngica de mieles monoflorales de Quillaja saponaria, especie endémica de Chile. *Scielo*.
- Montero, M., Vayas, L., Avilés, D., Pazmiño, P., & Erazo, V. (2018). Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. *Scielo*.
- Morrone, G., Alvarez, J., Brenciani, A., Simoni, S., Fioriti, S., Pugnali, A., . . . Giovanetti, E. (2018). Comparison of the Antimicrobial Activities of Four Honeys From Three Countries (New Zealand, Cuba, and Kenya). *Frontiers in Microbiology*.
- Nodarse, R. (2001). Estafilococos multiresistentes: uso del disco de oxacilín como marcador de resistencia a antibióticos. *Scielo*.
- Noé, C. (2015). Efecto bactericida in vitro de miel de *Apis mellifera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Universidad privada Antenor Orrego*.
- OIE. (Enero de 2011). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Obtenido de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/mrsa-es.pdf>
- Ordoñez, C. (2015). EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA MIEL DE ABEJA PURA Y DOS CONCENTRACIONES, ADMINISTRADAS VÍA INTRAMAMARIA, EN GANADO LECHERO CON MASTITIS SUBCLÍNICA; EN SAN JOSÉ PINULA, GUATEMALA. *Universidad de San Carlos de Guatemala*.
- Osteras, O., Solverod, L., & Reksent, O. (2006). *Milk Culture Results in a Large Norwegian Survey-Effects of Season, Parity, Days in Milk, Resistance and Clustering*. Obtenido de American Dairy Science Association: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16507696>
- Patel, J., Cockerill, F., Bradford, P., Eliopoulos, G., Hindler, J., Jenkin, S., . . . Weinstein, M. (Enero de 2015). *CLSI. M07-A10 Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Tenth Edition*. Obtenido de [https://clsi.org/media/1632/m07a10\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf)
- Peter, I. (2001).
- Pirez, C. (s.f.). *Morfología y Estructura bacteriana*. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%209.pdf>
- Quevedo, W. (2018). Recuentos de células somáticas (rsc), como indicador en la resistencia de la mastitis bovina. *Revista Ciencia, Tecnología e innovación*. Obtenido de [http://www.scielo.org.bo/pdf/rcti/v16n17/v16n17\\_a05.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/rcti/v16n17/v16n17_a05.pdf)

- Rodríguez, I. (2011). *Curación de heridas sépticas con miel de abejas*.  
Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74932011000200006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74932011000200006)
- Rodríguez, Í. (2012). EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PROPÓLEOS Y MIEL SOBRE CEPAS NATIVAS DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA NEGATIVO AISLADAS DE MASTITIS BOVINA. *Universidad Austral de Chile*.
- Rubin, J., Ball, K., & Chirino-Trejo, M. (2011). Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius isolates from various animals . *The Canadian Veterinary Journal*.
- Ruiz, R. (s.f.). *Mastitis bacteriana en ganado bovino: Etiología y técnicas diagnósticas en el laboratorio*. Obtenido de [https://www.ammveb.net/articulos/Mastitis\\_bacteriana.pdf](https://www.ammveb.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf)
- Sanz, S., & Sanz, M. (1994). *Humedad, cenizas y conductividad eléctrica de mieles de la Rioja*. Logroño: Zubía.
- Seija, V. (2004). *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Montevideo: FEFMUR.
- Sojka, M., Valachova, I., Bucekova, M., & Majtan, J. (2016). Antibiofilm efficacy of honey and bee-derived defensin-1 on multispecies wound biofilm. *JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY. VOLUME 65*.
- Tablas, C. y. (1987). Obtenido de [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1989\\_07.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1989_07.pdf)
- Ulloa, J., Mondragón, P., Rodríguez, R., Reséndiz, J., & Rosas, P. (2007). *La miel de abeja y su importancia*. Obtenido de <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/01-04/2.pdf>
- Vargas, M. (2016). *Estudio de las propiedades antimicrobianas y antifúngicas de la miel de abeja (apis mellifera) como tratamiento de infecciones causadas por clostridium perfringens, pseudomona aeruginosa, candida tropicalis y aspergillus brasiliensis*. Obtenido de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/5385>
- Venancio, A. (2011). *La miel*. Obtenido de [https://www.usc.gal/export9/sites/webinstitucional/gl/investigacion/grupos/malaterra/publicaciones/IV\\_Ciclo/Tema\\_13\\_Benancio\\_Trabajo\\_de\\_la\\_miel.pdf](https://www.usc.gal/export9/sites/webinstitucional/gl/investigacion/grupos/malaterra/publicaciones/IV_Ciclo/Tema_13_Benancio_Trabajo_de_la_miel.pdf)
- Vit, P. (2009). *Valorización de la miel de abejas sin aguijón (Meliponini)*. Obtenido de <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/29306/articulo4.pdf;jsessionid=C406F82022A9B3A47EA4B274297FEC84?sequence=1>

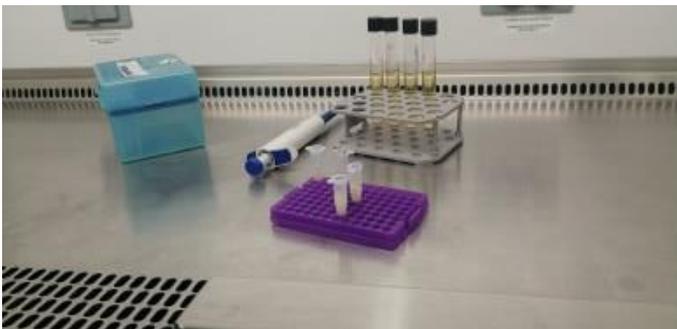
- Vit, P., Gonzáles, I., Sorroza, L., & R. M, S. (2016). *Caracterización fisicoquímica de la miel de angelita Tetragonisca angustula producida en Esmeraldas, Ecuador*. Obtenido de <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/350/304>
- Vit, P., Medina, M., & Enríquez, M. (2015). *Quaity Standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela*. Obtenido de [file:///C:/Users/sofis\\_000/Downloads/Qualityestandarshoneyguatemalamexicoyvenezuela.pdf](file:///C:/Users/sofis_000/Downloads/Qualityestandarshoneyguatemalamexicoyvenezuela.pdf)
- Weinstein, M., Lewis, J., Bobenchik, A., Campeau, S., Cullen, S., Galas, M., . . . Simner, P. T. (Enero de 2020). *M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. eCLIPSE.
- Willix, D., Molan, P., & Harfoot, C. (1992). A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *Journal of Applied Bacteriology*, 390-391.
- Zamora, L., & Arias, M. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Biomed* 22, 59-66.
- Zandamela, E. (2008). *CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y EVALUACIÓN SANITARIA DE LA MIEL DE MOZAMBIQUE*. Obtenido de <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2007/tdx-1114108-130045/emfzm1de1.pdf>

## **ANEXOS**

## ANEXO 1: Pesaje muestras de miel y diluciones

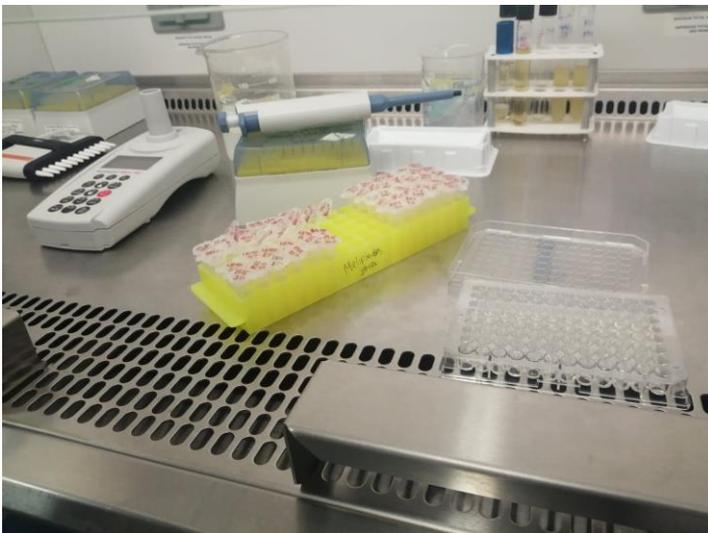


## ANEXO 2: Cultivos bacterianos





### **ANEXO 3: Cultivos bacterianos tratados con miel**



## ANEXO 4: Diluciones de antibiótico



