

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE MEDICINA



“Efecto bactericida in vitro de miel de *Apis mellífera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente”

TESIS

PARA OPTAR EL GRADO DE

MEDICO CIRUJANO

AUTOR

CRISTIAN ANTONIO NOÉ RAMÍREZ

ASESOR

DRA. MEJÍA DELGADO ELVA MANUELA

TRUJILLO- PERÚ

2015

MIEMBROS DEL JURADO

DR. MARCO ANTONIO ZARATE ARCE

DR. ELENA ADELA CACERES ANDONAIRE

DR. JULIO AMERICO MANAY BARRERA

ASESORA

DRA. ELVA MEJÍA DELGADO

DEDICATORIA

Dedico ésta tesis a mis padres, Fernando y Maritza, quienes estuvieron a mi lado y me motivaron para siempre salir adelante, junto a Dios fueron los principales motores de mis logros, a ellos, mi más sincero agradecimiento.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a Dios nuestro creador, por guiar mis pasos y ser mi sostén en los peores momentos de mi vida.

A mis padres, Fernando y Maritza, por permitir que mis sueños logren hacerse realidad, porque en mis momentos de debilidad siempre me motivaron a salir adelante, los llevo presente en mi corazón a pesar de la distancia que nos separa.

A mis hermanos, Fernando y Danitza, por el cariño compartido hacia mi persona, estando siempre presentes en mi vida con palabras de apoyo.

A mi asesora, Dra. Elvita, por su apoyo incondicional en el proceso de esta investigación, mostrándome un cariño especial que me motivaba a seguir adelante, incluso desde mi pregrado.

A toda esa gente especial que apareció en mi vida, me mostraron que su amistad es sincera y que en ausencia de mi familia, ellos siempre estuvieron presentes para mí.

A toda mi familia en general, porque gracias a ellos aprendí la importancia de siempre permanecer unidos y el verdadero amor que se crea en ese vínculo.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
RESUMEN	07
ABSTRACT	08
INTRODUCCIÓN	09
MATERIAL Y MÉTODOS	21
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	41
RECOMENDACIONES	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	47

RESUMEN

OBJETIVO: Conocer el efecto antibacteriano in vitro de miel de *Apis mellífera* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes.

MATERIAL Y MÉTODO: El presente estudio corresponde a un diseño experimental, prospectivo, comparativo. La población estuvo constituida por cultivos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. La unidad de análisis la constituyeron los halos de inhibición producto del efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellífera* y el antibiótico usado sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Se empleó el Método de dilución en tubos y la prueba de susceptibilidad, utilizando el método de difusión de discos empleando el medio Mueller Hinton.

RESULTADOS: En el estudio realizado se utilizaron las concentraciones de 50% y 100% de miel de *Apis mellífera* realizando diez repeticiones por cada concentración y por cada prueba, como control se utilizó vancomicina, el promedio de los halos de discos al 50% fue de 6.2 mm con una DS de 0.26, al 100% presentó un promedio de 10.55 con DS 1.17 y con vancomicina un halo promedio de 23.6 con DS 1.17, no mostró efecto inhibitorio en concentración del 50%, mientras que en la concentración de 100% la inhibición fue significativa, el valor de significancia “p” fue <0.000

CONCLUSIONES: Se concluye que la miel de *Apis mellífera* al 100% tiene actividad inhibitoria in vitro sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes

PALABRAS CLAVES: Miel de *Apis mellífera*, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, efecto bactericida in vitro.

ASBTRACT

OBJECTIVE: Meet the antibacterial effects *Apis mellifera* honey on the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL AND METHODS: This study is an experimental, prospective, comparative design. The population consisted of crops resistant *Staphylococcus aureus* methicillin. The unit of analysis the inhibition halos were the product of antibacterial effect of honey from *Apis mellifera* and antibiotic used against *Staphylococcus aureus* methicillin resistant. Method dilution tubes and susceptibility testing was employed, using the disk diffusion method using Mueller Hinton medium.

RESULTS: In the study the concentrations of 50% were used and 100% honey of *Apis mellifera* performing ten repetitions for each concentration and each test, vancomycin was used as a control, the average disk halos 50% was 6.2 mm with DS 0.26, 100% showed a mean of 10.55 with DS 1.17 and with an average halo vancomycin 23.6 with DS 1.17, showed no inhibitory effect at concentration of 50%, while the concentration was 100% inhibition significant, the value of significance "p" was <0.000

CONCLUSIONS: It is concluded that *Apis mellifera* honey 100% has in vitro inhibitory activity on the growth of *Staphylococcus aureus* methicillin resistant.

KEYWORDS: *Apis mellifera* honey, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, in vitro bactericidal effect.

INTRODUCCIÓN:

El uso indebido e indiscriminado de los antibióticos en las últimas décadas, para profilaxis y tratamiento de enfermedades tanto en el hombre como en los animales, ha detonado una alarma en el mundo de la medicina microbiológica, ya que los microorganismos han respondido de una manera peligrosa, con la llamada resistencia bacteriana, por eso es necesario reconocer, investigar y aplicar en nuestro campo profesional, las opciones alternas que existen en el campo de la medicina. (1)

La apiterapia, es el uso de productos de las abejas para prevenir, curar o recuperar a alguien de una o más condiciones de enfermedad. La etimología de esta palabra es de por sí implícitamente explicativa, “api” viene del nombre en latín de la abeja *Apis mellífera* y “terapia” viene de la palabra griega que significa un método para tratar a seres humanos o animales contra diferentes enfermedades. (2)

La potencia antibacteriana de la miel se ha atribuido a su fuerte efecto osmótico, naturalmente un pH bajo (Kwakman y Zaat, 2012), la capacidad de peróxido de hidrógeno producido que desempeña un papel clave en la actividad antimicrobiana de la miel (Kačániová et al, 2011.;Wahdan,1998) y los factores de fitoquímicos. Numerosos informes y estudios clínicos tienen demostrado la actividad antimicrobiana de la miel contra una amplia gama de microorganismos, incluyendo cepas resistentes a múltiples antibióticos. (3)

Las muestras de miel recogidas de Irlanda del Norte y Francia mostró una significativa capacidad para inhibir el crecimiento de la comunidad asociada *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM-AC) (Maeda et al., 2010). Otros estudios demostraron la actividad antibacteriana de la miel contra: *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterocolitis*, *Shigella dysenteriae* (Adebolu, 2005;. Voidaou et al, 2011), *Mycobacterium* (Asadi-Pooya et al., 2003), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y Enterococos resistentes a vancomicina (Cooper et al, 1999;. Cooper et al, 2002;.. Al-Waili et al, 2005), las bacterias patógenas comunes gastrointestinales (Lin et al., 2011), y el desarrollo de *Streptococcus pyogenes* biofilms (Maddocks et al., 2012). También se ha

informado la actividad antifúngica de la miel, especialmente la actividad anti-Candida (Irish et al, 2006;.. Koc et al, 2008;.. Ahmad et al, 2012). (4)

Se presentó una entrevista por parte del canal científico: National Geographic, en el año 2005 al doctor Peter Molan, docente de la Universidad de Waikato (Hamilton: Nueva Zelanda) y actual director del laboratorio para estudios de la miel. En un documental se hace referencia al caso de una paciente que sufría una infección cutánea severa en uno de sus antebrazos, causada por el *Staphylococcus aureus* y cuya acción de los antibióticos incluidos los de última generación, era anulada por dicha bacteria. Pasadas unas pocas semanas de haberse iniciado un tratamiento con miel de abejas, (miel de Manuka) la herida sanó de forma rápida y mostró una adecuada cicatrización. (5)

Recientemente se ha observado un aumento en la prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SAMR) en pacientes ambulatorios con infecciones de piel y partes blandas (IPyPB). Los datos epidemiológicos locales disponibles son limitados. Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo, de consultantes con IPyPB en la División Infectología del Hospital General de Agudos Juan A. Fernández – Buenos Aires, Argentina- en el período 01/10/2009 a 31/01/2011. Fueron 130; edad mediana 36 años (RIC 25.9-43.5); hombres 61.5%. El 46.9% era HIV+. Cien cultivos (76.9%), de 100 pacientes, resultaron positivos: 83 *S. aureus*, 8 *Streptococcus spp.* y 9 con otros microorganismos. De los *S. aureus* aislados, 62 (74.7%) fueron resistentes a oxacilina, 12 (14.4%) a clindamicina, 14 (16.9%) a eritromicina, 5 (6%) a ciprofloxacina, presentando en algunos casos más de una resistencia. Todos fueron sensibles a rifampicina y minociclina, y 98.8% (82) a trimetoprima-sulfametoxazol. El 83.8% (52) de los pacientes con SAMR tenían algún factor de riesgo (FR), sin diferencias con los pacientes con otros aislamientos. La presentación clínica más frecuente de IPyPB / SAMR fue forunculosis: 56.4 (35/62) vs. 28.9% (11/38) en infecciones por otros microorganismos ($p = 0.013$). La resistencia a oxacilina fue similar entre pacientes HIV+ y negativos (79.1 vs.70%, $p = 0.179$) (34/43vs.28/40). Concluimos que en la población estudiada se encontró una alta prevalencia de SAMR, independientemente de la serología para HIV o la presencia de FR.

Las opciones de tratamiento empírico para este microorganismo son minociclina y trimetoprima-sulfametoxazol. (6)

Estudios en el Perú muestran que existe una frecuencia de infección por MRSA elevada, sobretodo en hospitales de atención compleja, y en las unidades críticas y de atención a quemados. Echevarría y col. realizaron un estudio en 6 centros hospitalarios de Lima, 4 hospitales del Ministerio de Salud, 1 de las Fuerzas Armadas y uno de Seguridad Social, en que se colectaron 423 cepas de *Staphylococcus spp.* referidas a los laboratorios de microbiologías de pacientes infectados en unidades complejas como UCI, Unidades de Quemados, centros de terapia de Cáncer, Unidades de Cirugía compleja. Para determinar la sensibilidad de estas cepas a meticilina se utilizó el test de Sensibilidad en placa (NSSLS) con discos de oxacilina. Se encontró una frecuencia de Estafilococos meticilino resistentes de 58 %. La distribución por centro hospitalario se observaron cepas meticilino resistentes principalmente en el Instituto Nacional de Salud del Niño. (7)

Staphylococcus aureus es un patógeno humano, que causa infecciones hospitalarias y comunitarias. En su variedad meticilino resistente, se presenta como uno de los patógenos hospitalarios más importantes. Recientemente ha emergido, a nivel comunitario, el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente de origen comunitario, que se denomina SAMR-com (CA - MRSA en inglés), para diferenciarlo del hospitalario que se denomina SAMR (MRSA en inglés). (8)

En la década de los 90 se comunica el surgimiento de nuevas cepas de *Staphylococcus aureus* en personas sin factores de riesgo, denominándose *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad (SAMR-AC); con similares características a los intrahospitalarios, pero con un patrón de sensibilidad antibiótica particular. En nuestro país se identificaron los primeros brotes de infecciones de piel y partes blandas por este germen en comunidades cerradas, cárceles y asentamientos del cinturón periurbano. La población asistida en el Hospital Policial tiene mayor riesgo de sufrir infecciones por SAMR-AC.(9)

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM) ha sido considerado clásicamente un patógeno nosocomial. Sin embargo, también está presente en muchos centros de larga estancia, y en los últimos años ha aumentado su importancia como patógeno comunitario. La trascendencia clínica de este microorganismo radica en que dificulta el tratamiento de las infecciones que produce y obliga a establecer una serie de medidas de control en el ámbito nosocomial. Además, con frecuencia es motivo de alarma entre los pacientes y sus familiares, e incluso entre el personal sanitario que desconoce el problema. (10)

El estafilococo en resumen puede generar cuadros locales por acumulo de pus, diseminación y siembra de otros focos a través de sistema vascular, cuadros de reacción inmunológica y cuadros asociados a toxinas (sustancias enzimáticas bacterianas que actúan como venenos). Por tanto se describe con frecuencia procesos focales como Foliculitis, inflamación con acumulo de pus alrededor del folículo piloso; forunculosis, colección purulenta rebasa el folículo piloso y forma un saco de pus circundado por un rodete inflamatorio que suele ser muy doloroso; Abscesos, que es un saco purulento que compromete varios niveles de planos tisulares. Ántrax, área de necrosis tisular. (7)

Infecciones como celulitis donde el compromiso tegumentario es de piel y tejido celular subcutáneo, con una lesión inflamatoria difusa. Compromiso de planos más profundos como piomiositis, artritis u osteomielitis. Por vía hematógena puede afectar órganos nobles como corazón, pulmón ó Sistema Nervioso Central (SNC), causando infecciones severas como neumonía, endocarditis, meningoencefalitis y sepsis. (11)

El mecanismo que confiere la resistencia a meticilina, es complejo, ya que la bacteria ha generado una variación genética, que se encuentra codificada en el gen *mecA*, por la cual modifica la estructura de su proteína de ligadora o fijadora a penicilina (PBP2a), lo que impide que la meticilina pueda adherirse al lugar donde va a ejercer la acción de bloquear la enzima transpeptidasa (cuya función en el ciclo de vida bacteriana es sintetizar la pared bacteriana). (12)

Este mecanismo confiere al Estafilococo dorado resistencia absoluta contra las penicilinas semi sintéticas (Meticilina y Oxacilina) y Cefalosporinas de primera y segunda generación, que son drogas indicadas. Pero además hace inútiles también a todos los Betalactámicos, incluyendo Cefalosporinas de tercera, cuarta generación y los Carbapenems (Imipenem, Meropenem). La resistencia conferida por este gen se extiende a otras familias antibióticas como las quinolonas y lincosamidas, lo que limita grandemente el armamentario terapéutico. (13)

En los hospitales los organismos pueden diseminarse de paciente a paciente, siendo el vehículo de transmisión el personal hospitalario. La frecuencia de portador nasal en el personal hospitalario varía entre 5-10%. También los pacientes pueden adquirir la infección a través del uso de productos contaminados como antisépticos y otros objetos inanimados y la forma de transmisión puede variar de un sistema de salud a otro. (14, 15)

Los factores de riesgo que son demostrados en la mayoría de estudios, con relación a infección nosocomial por MRSA son: Estancia prolongada hospitalaria, uso de antibióticos de amplio espectro, estancia en UCI o unidad de quemados, infecciones quirúrgicas, úlceras de decúbito, pobre estado funcional, proximidad a otro paciente con MRSA. (16)

Las cepas de *S. aureus* que causan enfermedades producen factores de virulencia, entre ellos las hemolisinas que lisan los glóbulos rojos, como se aprecia en las colonias creciendo en placas de agar sangre. Esta bacteria es capaz también de producir una enterotoxina asociada con enfermedades transmitidas por alimentos. Otra enzima producida por esta especie es la coagulasa, que causa la coagulación de la fibrina formando un coágulo, este factor ha sido asociado con la patogenicidad de la bacteria, ya que al acumularse la fibrina alrededor de la bacteria impide el contacto con los agentes inmunitarios del hospedador evitando su fagocitosis. La mayoría de las cepas de *S. aureus* también producen leucocidina, una proteína que destruye los leucocitos, los glóbulos blancos. En las lesiones de la piel, como en quemaduras y granos, la producción de leucocidina ocasiona una

considerable destrucción de células del hospedador y es uno de los factores responsables de la formación de pus. (17)

Los grupos de riesgo para adquirir MRSA en la comunidad son los niños y ancianos que son Institucionalizados, en guarderías o casas de reposo. A diferencia de las cepas provenientes del hospital, que suelen ser multiresistentes, las cepas de MRSA que afectan a este grupo de pacientes, suelen ser resistentes a los betalactámicos, pero guardan susceptibilidad a otras familias de antibióticos. (18)

Por tanto, en la mayoría de los casos de sujetos que se internan por una infección por MRSA, se detecta algún factor de exposición hospitalaria, y en menor cuantía reciben algún cuidado de salud ó son usuarios de drogas intravenosas, restringiéndose el nicho ecológico de MRSA en la comunidad al grupo familiar de sujetos expuestos hospitalariamente. Aunque no existe una evidencia sólida a la fecha de que MRSA sé este diseminando en la comunidad desde personas sin factor de riesgo, cada vez se reportan más casos de personas en las que no se detecta factor de exposición. (19)

Se incluyeron 91 pacientes con cultivos positivos a SAMR-AC. Las formas clínicas más frecuentes de presentación fueron abscesos (22%), impétigo (21%) y lesión sobreinfectada (18%). El 34% (31) de los pacientes requirieron ingreso a piso de internación pediátrico, el uso de miel de abeja fue considerado un adyuvante antibacteriano para la resolución de éstas. Las infecciones de piel y partes blandas fueron la tercera causa de hospitalización en nuestro servicio durante 2004; de las que 40% fueron por SAMR-AC. (20)

Más antigua que el hombre, la miel, el fruto de las abejas, es mucho más que un alimento natural de incontables propiedades, entre las que se incluye propiedades antibacterianas y terapéuticas, siendo utilizada en el tratamiento de quemaduras y afecciones respiratorias entre otras, el cual desde tiempos remotos era conocido por diversas civilizaciones. (21)

Los egipcios, chinos, persas, hindú, griegos y romanos (pueblos representativos de las civilizaciones clásicas) dejaron innumerables registros del consumo y el uso medicinal de los productos de la colmena. En Egipto las referencias indican el uso del propóleo ante diferentes afecciones y principalmente en el proceso de momificación de los faraones. Estas civilizaciones avanzadas, ubicadas a la orilla del río Nilo, contaban con unos 900 remedios en su medicina tradicional, de los cuales cerca de 500 eran hechos a base de miel de abejas, como dejaron constancia en el papiro de Ebers (3.500 a. C) y en el papiro de Beck Badog (Crane y Graham, 1985; Ulloa et al., 2010). En los textos bíblicos vemos por ejemplo la temprana vocación que tenían los pueblos medio orientales hacia la apicultura, en especial el pueblo Israelita. En la India el Yadaur Veda, considerado el libro más antiguo de medicina en el código Manu, aseguraba que la posibilidad de longevidad era real, si se consumía todos los días pan de abejas (panales frescos de miel con polen). (22)

La miel se ha llegado a definir como una sustancia dulce sin fermentar, producida por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudación de otras partes vivas de las plantas, que las abejas recogen, transforman y combinan con otras sustancias específicas y maduran en panales, se añaden diversos fermentos y enzimas existentes en su tubo digestivo que transforman éstos azúcares (Guzzetti y Santi, 2006). El néctar que transporta en su buche se mezcla con su saliva que contiene invertasa, ésta es una enzima que permite transformar la sacarosa del néctar en fructosa y glucosa. La abeja pecoreadora pasa lo obtenido a una abeja almacenista, quién también lo deposita en su buche, aumentando la concentración de invertasa. El proceso continúa a través de distintas abejas almacenistas. La última de ellas deposita el fluido convertido en miel en una celda. Durante todo el proceso, el contenido de agua del néctar se reduce desde un 70-92% hasta un 17% aproximadamente. La invertasa se desintegra totalmente, por lo tanto, la miel sale sin ningún rastro de su paso por el buche (23,24)

La miel contiene un conjunto de ácidos grasos no saturados como el araquidónico y el linoléico muy importantes para la vida, junto a otros elementos como los ácidos orgánicos - málico, vínico, cítrico, láctico, oxálico, fosfórico y fórmico.(25)

La potencia antibacteriana de la miel se ha atribuido a su fuerte efecto osmótico, un pH naturalmente bajo (Kwakman y Zaat, 2012), la capacidad de los factores de fitoquímicos, especialmente los flavonoides, ácidos aromáticos y los antioxidantes fenólicos son reconocidos por inhibir un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Por otro lado, aún cuando la presencia de lisozima en la miel no está bien esclarecida, en algunos reportes se menciona ésta como uno de los antimicrobianos presentes en la miel. Numerosos informes y estudios clínicos tienen demostrado la actividad antimicrobiana de la miel contra una amplia gama de microorganismos, incluyendo cepas resistentes a múltiples antibióticos. (26,27)

El peróxido de hidrógeno producido desempeña un papel clave en la actividad antimicrobiana de la miel (Kačániová et al, 2011.; Wahdan, 2010) contribuye a las propiedades antimicrobianas de la miel, como se señaló en un estudio realizado por Taormina y col, quienes encontraron que la inhibición del crecimiento de *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* en soluciones de miel de 25% se disminuía luego de tratar dichas soluciones con catalasa; en la miel los niveles de peróxido de hidrógeno son bajos, aproximadamente 1000 veces menos que las soluciones usadas como antisépticos, de manera que no causa daño tisular; sin embargo, sigue siendo efectivo como antimicrobiano. Parte de la efectividad como antimicrobiano del peróxido de hidrógeno se debe a la liberación lenta de éste y a la producción continua por parte de la glucosa-oxidasa. (28,29)

El ácido fórmico ejerce una acción antiséptica contra los microorganismos patógenos. También la miel contiene otro antiséptico, la inhibina, que paraliza el desarrollo de ciertas bacterias y que junto a otro antibiótico natural, la germicidina, harán de la miel un alimento siempre exento de microorganismos y un eficaz y buen desinfectante, que se emplea con éxito para cicatrizar heridas. (30)

La miel al ser un producto de origen animal, es susceptible de contener microorganismos como bacterias y hongos de manera natural. Esto constituye un factor negativo para su uso

medicinal, sobre todo en heridas abiertas. Para eliminar esta posibilidad la miel utilizada en este estudio se colocó a incubación durante una semana, encontrándose que hubo nulo desarrollo de microorganismos, en un estudio en el que midió la carga bacteriológica de miel de diferentes procedencias, encontró que la unidad de formación de colonias (UFC) era menor a diez, lo cual da certeza sobre su calidad para usarlo como antibiótico natural. (31,32)

La miel ha sido reconocida como una fuente de esporas de *Clostridium botulinum* y ha sido fuertemente asociada al botulismo infantil, y aunque hasta ahora no se ha reportado un caso de botulismo de heridas por uso de la miel sobre las mismas, existe un riesgo por el hecho de que la miel puede contener esporas de esta bacteria. (33)

La “actividad del agua” es la concentración mínima de agua requerida en el ambiente de un microorganismo para que este se reproduzca. La miel crea un medio con bajo contenido de agua (alta osmolaridad), dado que el plasma y la linfa migran fuera del tejido hacia la solución e inhiben el crecimiento bacteriano por disminución en la AW del sustrato (N: 0,56 y 0,62). La linfa, por su parte, proporciona nutrientes al tejido. La miel atrae macrófagos que participan en la “limpieza de la herida”, acelera el desprendimiento del tejido desvitalizado, necrótico o gangrenoso, provee una fuente de energía local y forma una capa proteica protectora en la herida. Tiene también propiedades desodorizantes, ya que las bacterias usan glucosa en lugar de aminoácidos para su metabolismo y producen ácido láctico en vez de sustancias malolientes (amonio, aminos y compuestos azufrados). (34,35)

El tejido de granulación útil es un signo de evolución favorable en las heridas sépticas. La miel de abejas favorece la cicatrización por la acción que ejerce sobre la división celular, la síntesis y maduración del colágeno, la contracción y epitelización de la herida y el mejoramiento del equilibrio nutricional. Posee un factor antibacteriano por su alto contenido en peróxido de hidrógeno, así como alta concentración de antioxidantes que protegen al tejido de radicales libres. Se han descrito propiedades antiinflamatorias de disminución del edema, el exudado y el dolor local. Asimismo, su acidez (por debajo de pH

4) beneficia la acción antibacteriana de los macrófagos, ya que un pH ácido (3.5 - 4.5) dentro de la vacuola se relaciona con lisis bacteriana, a la vez que se reduce la formación de amonio tóxico. Es así que la acidificación coadyuva a la cicatrización. (36,37)

Una reciente publicación en la revista FASEB Journal muestra que la miel posee ingredientes bactericidas. El equipo de A. J. Zaat describe en un artículo que la miel acumula cerca de 6 ml/l de agua oxigenada y 0.25 ml/l de metilglioxal, sustancias que poseen toxicidad sobre las bacterias. Además se ha identificado en la miel un nuevo péptido, llamado defensina-1, con propiedades antimicrobianas. (38,39)

El Dr. Tobias Olofsson, líder del equipo investigador, concluyó al respecto: “parece que la naturaleza nos ofrece una excelente opción terapéutica para tratar a nuestros pacientes infectados con cepas de MRSA y Enterococcus. Aunque no lo hemos testeado aún en seres humanos, los resultados en animales fueron sorprendentes. Cabe resaltar que la actividad del producto se vio potenciada cuando la miel utilizada era fresca y natural, es decir, aquella comprada en la tienda no tendría las mismas propiedades (...) Hay países muy pobres donde el acceso a los antibióticos de amplio espectro es muy reducido, pero que cuentan con fácil acceso a miel de abejas recién obtenida. Es en estas regiones donde esperamos que nuestro descubrimiento tenga mayor impacto”. (40)

IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Se está observando un incremento marcado en la resistencia antibiótica por parte de diferentes bacterias que agravan el curso de una enfermedad dificultando el tratamiento para ésta, presentándose así un problema de salud pública mundial, con consecuencias graves de morbilidad en los hospitales y pérdidas económicas para las instituciones de salud. Las principales bacterias causantes de infecciones nosocomiales son las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus coagulasa negativa*, *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- β -lactamasas (MBL), *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus spp* y *Acinetobacter baumani*.

En nuestro medio es importante la realización del estudio etno-medicinal ya que forma parte del acervo cultural de nuestra región, es decir, de conocimientos y prácticas que se han heredado de generación a generación. Dentro de las prioridades en investigación en salud en el Perú está el encontrar alternativas que promuevan o faciliten el acceso a la salud para todos en la costa, sierra y selva del Perú.

La apiterapia es un tema multidisciplinar, siendo necesaria la actuación conjunta de Químicos, Médicos, Farmacéuticos, Biólogos, Ingenieros Agrónomos y Agrícolas, Botánicos y Agricultores, los cuales son los profesionales responsables de la seguridad, desde la producción de la materia prima hasta su consumo final para que los principios activos puedan ser usados con eficacia y sin riesgos de los consumidores.

Con el fin de intentar paliar esta problemática, se consideró en el presente trabajo el uso de miel de *Apis mellífera* como un tratamiento alternativo por su bajo costo y su eficacia demostrada en el presente trabajo.

JUSTIFICACIÓN

La aparición de resistencia a los antibióticos en los microorganismos y su propagación está amenazando la comunidad. Esto es particularmente cierto en el caso de *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria es la causa más común de infección nosocomial, y es cada vez más preocupante debido a su tendencia a múltiples resistencias a los antibióticos que a menudo complican el tratamiento. Muchas cepas de *S. aureus* se han encontrado para ser resistentes a la nueva semi-sintético beta-lactamas (metilina, oxacilina y flucloxacilina), que se conoce como *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA).

Durante las últimas cuatro décadas MRSA se ha extendido por todo el mundo y se ha convertido en altamente endémica en muchas zonas geográficas. Las infecciones por SARM son difíciles de tratar debido a su resistencia a los antibióticos de uso común contra estafilococos denominados macrólidos, tetraciclina, aminoglucósidos, etc. Algunas de estas cepas de MRSA son resistentes a los antibióticos más potentes como la vancomicina.

El aumento en el uso de los consumidores de las medicinas complementarias ha provocado un creciente interés en los tratamientos médicos tradicionales y no convencionales. Un tratamiento que tiene mucho interés recibido es la miel. La miel es un tratamiento tópico tradicional para la herida infectada y puede ser eficaz en cepas resistentes a los antibióticos.

La miel tiene una larga tradición de uso en varios sistemas médicos y la última década, varios grupos de investigación se han centrado su atención en este producto. La miel es esencialmente una solución de agua altamente concentrada de dos azúcares, dextrosa y levulosa, con pequeñas cantidades de otros, al menos, 22 azúcares más complejos. Muchas otras sustancias también se producen en la miel, pero los azúcares son, con mucho, los componentes principales. Las principales características físicas y el comportamiento de la miel se deben a sus azúcares, pero los constituyentes menores tales como materiales aromatizantes, pigmentos, ácidos y minerales son en gran medida responsables de las diferencias entre los diferentes tipos de miel. La capacidad de la miel para matar los microorganismos se ha atribuido a su alto efecto osmótico, alta naturaleza ácida, la concentración de peróxido de hidrógeno y la naturaleza fitoquímico, que incluye su contenido de derivados de la tetraciclina, peróxidos, amilasa, ácidos grasos, fenoles, ácido ascórbico, terpenos, alcohol bencílico y ácido benzoico. La producción y el tipo de miel producida por las abejas es dependiente de las flores de vegetación natural que florecen en diferentes estaciones del año. Así, las flores de las que las abejas recolectan néctar para producir la miel puede contribuir a la diferencia en las actividades antimicrobianas. El propósito del presente estudio es, evaluar la actividad antibacteriana de la miel contra el MRSA in vitro para posteriormente poder realizar estudios in vivo como en pacientes que sufren de heridas infectadas.

1.1 Enunciado

¿Cuál es el efecto bactericida in vitro de *Apis mellifera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes?

1.2 Hipótesis:

H0: La Miel de *Apis mellífera* no tiene efecto bactericida in vitro sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

H1: La Miel de *Apis mellífera* tiene efecto bactericida in vitro sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

1.3 Objetivos:

1.3.1 Objetivo General

Conocer el efecto antibacteriano in vitro de miel de *Apis mellífera* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes.

1.3.2 Objetivos Específicos:

- Determinar la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente in vitro a la miel de *Apis mellífera* en dos concentraciones 50% y 100%.
- Determinar cuál es la concentración de la miel de *Apis mellífera* 50%, 100% que tiene efecto antibacteriano in vitro sobre *Staphylococcus aureus* meticilina resistente.
- Comparar el efecto bactericida de la miel de *Apis mellífera* en dos concentraciones 50% y 100% combinada con meticilina sobre *Staphylococcus aureus*.

II. MATERIAL Y MÉTODOS:

2.1 Población Muestral

Estará constituida por cultivos de *Staphylococcus aureus*

2.2 Muestra

Unidad de análisis

La unidad de análisis la constituirán los halos de inhibición producto del efecto

antibacteriano de la miel de *Apis melífera* en dos concentraciones 50% y 100% sobre *Staphylococcus aureus* meticilina resistente.

Unidad de muestreo

Unidades formadoras de colonias de *Staphylococcus* producto del efecto antibacteriano de la miel de *Apis melífera* en dos concentraciones 50% y 100% sobre *Staphylococcus aureus* meticilina resistente.

Tamaño de muestra

Para determinar el tamaño de la muestra se hizo uso de la siguiente fórmula:

Tamaño muestral

Para calcular en número de halos, se consideró que los antibióticos de uso común presentan 80% de alta efectividad, considerando el efecto bactericida en estudios previos de la miel de abeja al 28%.

$$n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 (p1.q1 + p2.q2)}{(p1 - p2)^2}$$

Donde:

n = Número de elementos necesitados en cada uno de los dos grupos

p1 = Proporción estimada con el atributo del grupo 1

p2 = Proporción estimada con el atributo del grupo 2

$$q1 = 1 - p1$$

$$q2 = 1 - p2$$

p2 - p1 = Mínimo nivel de diferencia que desea detectar entre los dos grupos (En estudio y contraste)

Z α = Desviación normal para error alfa. Para 0,05 y dos colas Z α = 1.96

$Z\beta$ = Desviación normal para error beta. Para 0,2 y una cola $Z\beta= 0.84$

Reemplazando valores:

$$p1= 0,80$$

$$p2= 0,28$$

$$q1= 0,20$$

$$q2= 0,72$$

$$Z\alpha = 1,96$$

$$Z\beta = 0,84$$

$$n = \frac{(1,96 + 0,84)^2 ((0,80)(0,20) + (0,28)(0,72))}{(0,28 - 0,80)^2}$$
$$n = 10$$

2.3. Diseño de estudio:

2.3.1 Tipo de estudio:

El presente estudio corresponde a un diseño experimental, prospectivo.

2.3.2 Diseño Específico:



Donde:

NR: Sensibilidad del *Staphylococcus aureus* a las concentraciones de la miel de *Apis mellífera* en dos concentraciones 50% y 100% .

O1: Medida de la halos

G1: Medida de sensibilidad de la miel de *Apis mellifera* en *Staphylococcus aureus*

2.4 Descripción de variables y escalas de medición:

VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INIDICADOR	ESCALA
VARIABLE INDEPENDIENTE Efecto bactericida de miel de <i>Apis mellífera</i>	Capacidad de miel de <i>Apis mellífera</i> de inhibir el crecimiento bacteriano que se desarrolla en un medio dado.	Cuantitativa	Diámetro de halo de inhibición Diámetro de halo de inhibición (Según las pautas de Duraffourd)	Medido en mm. Nula (-) Sensible (+) Muy sensible (++) Sumamente sensible (+++)
VARIABLE DEPENDIENTE <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente	Especie bacteriana que desempeña un papel preponderante en el desarrollo de infecciones nosocomiales	Cuantitativa	Crecimiento bacteriano	UFC/ml

2.5 Definiciones operacionales:

Métodos cualitativos (disco difusión) son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente. Este es uno de los métodos más utilizados en la práctica diaria. Tenemos Medida de los diámetros de los halos de inhibición en mm, según la escala de Duraffourd.

➤ **Efecto antibacteriano in vitro:**

Capacidad para evitar la reproducción o producir la muerte de la bacteria en condiciones experimentales.

➤ **Halo de Inhibición:**

Zona alrededor del disco donde una sustancia antibacteriana es capaz de impedir el crecimiento de la bacteria al cabo de 18 a 24 horas de incubación. Se utilizará como medida los diámetros de estas zonas en mm, según la escala de Duraffourd y cuantitativamente según la concentración inhibitoria mínima (CIM).

➤ **Escala de Duraffourd:** Escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición.

- Nula (-) para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Medio (muy sensible = ++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20 mm.

Métodos cuantitativos son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM).

➤ **Concentración inhibitoria:** La concentración del antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro

de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes).

2.6 PROCEDIMIENTOS:

2.6.1 Obtención de miel de *Apis mellífera* (ANEXO 1)

La cosecha de miel o cata se realizó tras la mielada, cuando los aportes de néctar cesaron y al menos tres cuartas partes de las celdillas del panal estuvieron operculadas.

Tras la expulsión de las abejas mediante un ahumador, se extrajeron los cuadros de la colmena.

Posteriormente, se procedió al desoperculado de los mismos.

Luego a la extracción de la miel de las celdillas mediante una centrifuga, manual o eléctrica.

La miel fue recogida y sometida a un posterior filtrado

A continuación, pasó a un madurador o decantador donde las impurezas que han quedado ascendieron a la superficie y fueron eliminadas.

La pasteurización es un tratamiento por el que la miel alcanzó una temperatura de 78°C/5-7 min., para después ser enfriada rápidamente.

2.7 *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

2.7.1 Recolección de la muestra:

Para el presente proyecto la cepa de *S.aureus* meticilino resistente fue obtenida del laboratorio MediMark R Europe, que envió la muestra al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo. (ANEXO 2).

2.7.1.1 Obtención de la cepa de *S. aureus*

Las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) fue obtenida de cepario brindado por la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

Las cepas se conservaron en agar soya tripticasa, hasta la realización del trabajo experimental.

2.7.1.2 Identificación de *S.aureus* meticilino resistente

La identificación de los SARM se realizó mediante el método estandarizado de difusión con discos (conocido como Bauer-Kirby), utilizando agar Mueller-Hinton sin suplementar con NaCl y discos de cefoxitina 30 µg; se consideró como resistentes a la meticilina aquellas cepas que presenten halos de inhibición iguales o menores de 14mm, según normas establecidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

2.7.2 Preparación de la cepa

Una vez obtenida las cepa, ésta fue cultivada en tubos de ensayo con tapa rosca en medio Agar soya tripticasa (TSA).

2.7.3 Preparación del inóculo de *Staphylococcus aureus*:

Método de suspensión directa de colonias (ANEXO 3)

Las cepas de SARM se conservaron en agar soya tripticasa, para la realización del trabajo experimental.

El método de suspensión directa de colonias es el más adecuado para la preparación del inóculo. Se colocaron 5 ml de suero fisiológico estéril en un tubo de ensayo.

Se preparó el inóculo haciendo un cultivo directo en solución salina de las cepas aisladas en agar soya tripticasa, con un tiempo de cultivo de 24 horas en a fin de obtener colonias jóvenes, se realizó tomando con un asa bacteriológica del agar tres o cuatro colonias morfológicamente similares y se suspenden en el tubo hasta alcanzar una turbidez comparable a la solución de Mc Farland 0.5, para realizar este paso se realizó visualmente, con una luz adecuada para comparar el tubo del inóculo con el estándar 0,5 de McFarland frente a una tarjeta de fondo blanco y líneas negras, se obtuvo así una suspensión que contiene aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ unidades formadores de colonias (UFC)/ml para *Staphylococcus aureus*.

Inoculación de las placas (ANEXO 4)

Lo ideal es que dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, se sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotó el hisopo varias veces y presionó firmemente por las paredes internas del tubo por encima del nivel del líquido. Este procedimiento elimina el exceso de líquido del hisopo.

Se inoculó la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Se repitió este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Como paso final, se debe estrió el hisopo por el borde del agar.

La tapa se dejó entreabierta durante tres a cinco minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos impregnados con el antibiótico.

Determinación del efecto antibacteriano (ANEXO 5) y (ANEXO 6)

Mediante la difusión de discos de Kirby y Bauer, el cual consiste en preparar discos de papel de filtro estériles, los cuales fueron sumergidos dentro de cada concentración de miel de abeja: 50% y 100% por el periodo no menor de 1 hora, luego con una aguja estéril, éstos se colocaron sobre los cultivos de *S. aureus* en las placas petri previamente preparadas; las placas se mantuvieron en la misma posición por un periodo de 10 minutos.

Luego de este tiempo las placas se voltearon de posición y se incubaron a 37° C, durante 24 horas. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama de un mechero.

La lectura de los resultados, se llevó a cabo después de las 24 horas, mediante la inspección visual de cada placa. Se efectuó tomando el registro en milímetro de los halos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Determinación de la concentración inhibitoria in vitro de dos concentraciones de miel de abeja sobre MRSA. (ANEXO 7)

Se determinó la concentración inhibitoria (CMI) mediante la técnica de dilución en tubos de cada una de las cepas de *Staphylococcus aureus*, con las dos concentraciones determinadas de 50 y 100%.

Los ensayos se repitieron 10 veces para cada concentración de miel, por tanto, cada grupo estuvo conformado por 10 tubos de ensayo.

En los tubos se colocarán 0.2 ml. de la dilución de la cepa en solución salina (semejante a tubo # 0,5 de Mac Farland) seguido de 0.8 ml de cada concentración de miel de abeja.

Luego, se incubaron todos los tubos de ensayo en la estufa a 37° C por 24 horas. Posteriormente se sembró 0.1 ml. de solución de cada uno de los tubos en placas petri con agar mueller hinton, utilizando el asa de Driglasky para dispersar la muestra, Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm. de la llama de un mechero. Dichas placas fueron colocadas en estufa por 48 hrs. a 37°C. Finalmente se observó el crecimiento bacteriano y se realizó el conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

2.8 Análisis estadístico e interpretación de datos

Para el análisis de datos del estudio se utilizaron:

2.8.1 Estadística Analítica

En este proyecto, por tratarse de variables cuantitativas, se usaron tablas de frecuencias y porcentajes, para su desarrollo y utilización de técnicas probabilísticas, analizando correctamente y sacando deducciones de informaciones numéricas.

2.8.2 Estadística inferencial

Se realizó la estimación de una característica de una población, basándose sólo en los resultados de las muestras controladas determinadas por el tamaño muestral previamente realizado.

Se utilizó el programa IBM SSPS v.22.0 para el análisis estadístico, reportándose la media aritmética y desviación estándar para cada variable; y a la vez se realizó la comparación a través del test de ANOVA con un nivel de significancia menor a 0.05.

2.9 Ética

El proyecto de investigación se presentó para consideración, comentario, consejo y aprobación a los comités designados por la Facultad de Medicina de la UPAO.

Al realizar la investigación se tuvo en cuenta principios de bioseguridad, prestando atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente. Declaración de Helsinki.

III. RESULTADOS

TABLA N° 1: Diámetro del halo de inhibición de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en función de 2 concentraciones de miel de *Apis mellífera* y vancomicina.

Diámetro de Halo (mm)	Efecto bactericida in vitro de miel de <i>Apis mellífera</i>			
	Vancomicina	100%	50%	Control
Halo 1	25	8	6	0
Halo 2	24	11	6.5	0
Halo 3	24.5	11.5	6.5	0
Halo 4	25.5	10.5	6	0
Halo 5	23	10.5	6	0
Halo 6	24	10	6.5	0
Halo 7	22.5	11	6	0
Halo 8	23	12	6	0
Halo 9	22	9.5	6.5	0
Halo 10	22.5	11.5	6	0

Fuente: Datos obtenidos por el investigador, año 2015

En la tabla N°1 se muestran los halos inhibitorios registrados en 10 repeticiones por cada concentración de miel de *Apis mellífera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

TABLA N° 2: Diámetro promedio de Halo del Efecto Bactericida, del Antibiótico Vancomicina y diferentes concentraciones de la Miel de *Apis mellífera* sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Grupos de investigación	Ni	Media	Desv. Est.
50%	10	6.2	0.26
100%	10	10.55	1.17
Vancomicina	10	23.6	1.17

Fuente: Datos obtenidos por el investigador, año 2015

En la tabla N°2 se muestra el diámetro promedio de los halos en sus concentraciones de 50%, 100% y vancomicina, obteniendo la media mayor en vancomicina como tratamiento ideal de la bacteria, en su concentración al 50% no muestra efecto inhibitorio, mientras que en la concentración de 100% la inhibición fue significativa.

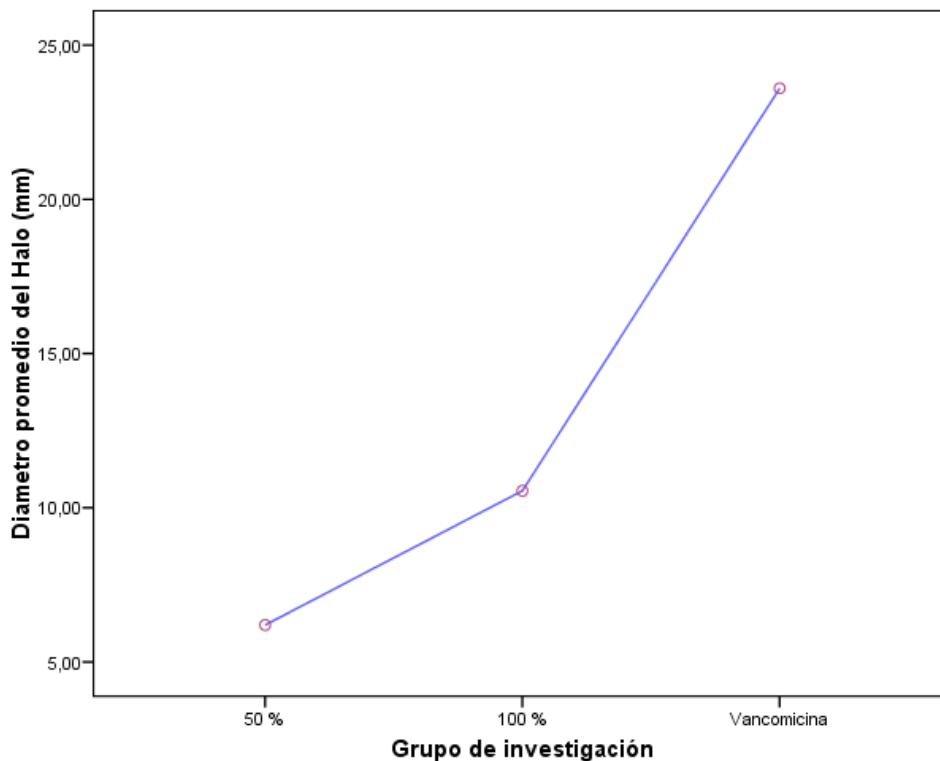
TABLA N°3: Análisis de Varianza del Efecto Bactericida, del Antibiótico Vancomicina y diferentes concentraciones de la Miel de *Apis mellífera* sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

FV	SC	Gl	CM	F	P
Tratamientos	1639.95	2	819.975	877.674	2.72E-25
Error	25.225	27	0.934		
Total	1665.175	29			

Fuente: Datos obtenidos por el investigador, año 2015

En la tabla N°3 se muestra el análisis de varianza, además se obtuvo como resultado que existe una diferencia estadística significativa del diámetro del halo de inhibición del crecimiento del *Staphylococcus aureus* meticilino resistente de acuerdo a la concentración de miel de *Apis mellífera* aplicada.

GRÁFICO N°1: Media del diámetro del halo de inhibición de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en función de dos concentraciones de miel de *Apis mellífera* y vancomicina.



Fuente: Datos obtenidos por el investigador, año 2015

En el gráfico N°1 se aprecia que conforme aumenta la concentración de miel de *Apis mellífera*, aumenta el diámetro de halo de inhibición, es decir, aumenta el efecto inhibitorio, siendo el tratamiento ideal la vancomicina.

TABLA N° 4: Comparaciones Múltiples del Efecto Bactericida, del Antibiótico Vancomicina y diferentes concentraciones de la Miel de *Apis mellífera* sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Mediante la prueba de DUNCAN

Grupo de investigación	ni	Grupo para Alpha = 0.05		
		G1	G2	G3
50%	10	6.2		
100%	10		10.55	
Vancomicina	10			23.6

Fuente: Datos obtenidos por el investigador, año 2015

En la tabla N°4 se muestran los promedios de diámetro de halo de inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente después de la aplicación de discos con miel de *Apis mellífera* a diferentes concentraciones, se realizó la prueba de significancia de Duncan, que comparó cada uno de los promedios de los halos, demostrando que existe diferencia significativa entre los diámetros promedio de los halos inhibitorios de la mie de *Apis mellífera* entre 50% y 100%. ($p < 0.05$)

TABLA N° 5: Susceptibilidad del *Staphylococcus aureus* meticilino resistente a la Miel de *Apis mellífera*

Efecto Bactericida	Concentración de la Miel de <i>Apis Mellifera</i>			
	50%		100%	
	n	%	n	%
Nula	10	100	0	0
Sensible	0	0	10	100
Total	10	100	10	100

Fuente: Datos obtenidos por el investigador, año 2015

En la tabla N°5 se describe la susceptibilidad del *Staphylococcus aureus* frente a la miel de *Apis mellífera* en sus dos concentraciones, hallándose nula en las 10 muestras al 50% y sensible en las 10 muestras al 100%.

TABLA N° 6: Número UFC de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en función de 2 concentraciones miel de *Apis mellifera*, vancomicina y control bacteriológico

	UFC			
	Vancomicina	100%	50%	Control
1	0	8	41	73477
2	0	9	38	67815
3	0	6	44	65398
4	0	6	42	71569
5	0	6	40	74304
6	0	8	39	69088
7	0	7	38	72841
8	0	0	41	75195
9	0	7	40	71060
10	0	6	42	70487

Fuente: Datos obtenidos por el investigador, año 2015

En la tabla N°6 se muestran las UFC registrados en 10 repeticiones por cada concentración de miel de *Apis mellifera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

TABLA N° 7: Comparación del Efecto Bactericida de la Miel de *Apis mellífera* sobre *Staphylococcus aureus* metilino resistente

Parametros	50%	100%
Muestra	10	10
Promedio	40.50	6.30
Desviación Estándar	1.900	2.452
Prueba estadística "t"	34.8648	
Significancia "p"	< 0.001	

Fuente: Datos obtenidos por el investigador, año 2015

En la tabla N°7 se compara el efecto bactericida de la Miel de *Apis mellífera* sobre *Staphylococcus aureus* metilino resistente con el promedio del número de UFC realizado, el cual muestra al 50% un promedio de 40.5 UFC con DS de 1.9 y al 100% un promedio de 6.3 UFC con DS 2.4, siendo el valor de significancia “p” <0.001

IV. DISCUSIÓN

El empleo de terapias alternativas ha venido aumentando desde hace algunos años por factores como la composición química de dichas sustancias, es por ello que se realizan ensayos farmacológicos in vivo, in vitro así como ensayos químicos.

El presente estudio tipo experimental, demostró el efecto inhibitorio in vitro de la miel de *Apis mellífera* a dos concentraciones de 50% y 100% frente a una cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, similar a la conclusión hallada por Kwakman et col (38) en los efectos de inhibición, en éste caso encontrándose nulo el efecto inhibitorio en concentración del 50% mientras que en la concentración de 100% la inhibición fue altamente significativa llegando a mostrarse sensible.

Esta prueba mostró la sensibilidad del *Staphylococcus aureus* meticilino resistente a la concentración de miel de *Apis mellífera* al 100% en sus 10 repeticiones, todas estas presentaron formación de halo inhibitorio, el tamaño varió según lo que se reportó en las tablas, obteniendo halos inhibitorios desde 8mm hasta 12mm de diámetro. Según la prueba de Duncan, se determinaron 2 grupos estadísticos en función al promedio de diámetro de halo inhibitorio, determinándose que las concentraciones al 50% pertenecen a un grupo considerado de nula sensibilidad, lo que no ocurre al compararla con el diámetro de inhibición en la concentración al 100%, el cual constituye un grupo con una mayor sensibilidad (Tabla 4).

El presente trabajo también comparó el efecto de miel de *Apis mellífera* en sus diferentes concentraciones con el antibiótico control siendo la vancomicina, en donde los diámetros de halo de inhibición oscilaron entre 22mm y 25.5 mm.

Según la prueba de Duncan se determinaron 3 grupos estadísticos en función al promedio del halo inhibitorio, determinándose que las concentraciones al 50% presentan un diámetro de halo promedio de 6.2 mm con DS 0.26, al compararla con el diámetro de halo promedio en concentración 100% es de 10.5 mm con DS 1.17, con

vancomicina presenta un diámetro de halo promedio en 23.6 con DS 1.17 concentración la cual genera el mayor halo y con mayor sensibilidad según la escala de Duraffourd.

La concentración inhibitoria obtenida fue la del 100%, ya que a esta concentración pocas UFC, sin embargo, según los resultados, las dos concentraciones tuvieron un buen efecto inhibitorio comparado con el control (cultivo sin tratamiento), en donde se observó un crecimiento elevado de 10^9 UFC/ml. Así mismo con la prueba de Duncan se determinó dos grupos estadísticos distintos, demostrándose así que el efecto inhibitorio varía de acuerdo a la concentración aplicada.

En ambas concentraciones se observó efecto inhibitorio de dimensiones reducidas, siendo los resultados evaluados mediante la técnica de difusión en discos, probablemente se deban a que la miel de *Apis mellífera* no se difunde bien en el agar Müller Hinton por la consistencia que posee.

Kačániová et al (3) La miel de *Apis mellífera* es una sustancia considerada con propiedades antisépticas por su alto efecto osmótico, pH bajo, su contenido de peróxido de hidrógeno que desempeña un papel clave en la actividad antimicrobiana de la miel y los factores de fitoquímicos, flavonoides, ácidos aromáticos y los antioxidantes fenólicos, que se usa en forma de tratamiento alternativo.

Cooper RA (27) en su investigación demuestra que las características antes mencionadas tienen propiedades antibacterianas ya que genera lesiones en la membrana citoplasmática, ocasionando una disfunción en la composición interna de las células bacterianas.

Los resultados obtenidos con el presente trabajo de investigación indican el efecto inhibitorio in vitro de la miel de *Apis mellífera* frente a una cepa de *Staphylococcus aureus* metilino resistente, es así que el presente estudio muestra alternativas naturales, eficiente y de bajo costo, sobre todo para zonas de difícil acceso a medicamentos y con resistencia antibiótica a que se han venido presentando en éstas épocas.

V. CONCLUSIONES

1. Se encontró efecto antibacteriano in vitro de miel de *Apis mellifera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.
2. La miel de *Apis mellifera* al 100% mostro efecto antibacteriano menor que la vancomicina, pero considerado sensible según la escala de Duraffourd para *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.
3. Se encontró mayor efecto inhibitorio de miel de *Apis mellifera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en la concentración del 100% a comparación de la concentración al 50% que presentó efecto inhibitorio menor.

VI. RECOMENDACIONES

1. Confrontar el efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellífera* contra otros gérmenes Gram positivos.
2. Comprobar la acción in vivo de la miel de *Apis mellífera* como antimicrobiano.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Romero Y, Gómez LA. Determinación in vitro del efecto antibacteriano de la miel de la abeja común (*Apis mellífera*) y de la abeja angelita (*Tetragonisca angustula*) ante el *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo. Rev Sist Prod Agroecol. 2013 ;4(284)40-65
2. Mayz Vallenilla E. 1975 Hombre y Naturaleza. Clase magistral del rector. Universidad Simón Bolívar; Sartenejas, Venezuela.
3. Sulaiman A. Antibacterial potential of honey from different origins: a comparison with manuka honey, 2012 : 1 (5) 1328-1338
4. Ahmed, M. – Djebli, N. – Hammoudi, S. – Aissat, S. – Akila, B. – Hemida, H. 2012. Additive potential of ginger starch on antifungal potency of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. In Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, vol. 2, 2012, no. 4, p. 253-255.
5. Allen, K. L.; Molan, P. C. y Reid, G. Survey of activity of some New Zealand honeys. New Zealand: Apypharm. 2010.
6. Bermejo V, Spadaccini L, Elbert . Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en infecciones de piel y partes blandas en pacientes ambulatorios. Clin Microbiol rev. 2012; 72: 283-286
7. Echevarria J, Iglesias D. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. Rev Med Hered 14 (4), 2010 195
8. Cercenado E, Sánchez-Carrillo C, Alcalá L, Bouza E y Grupo de Trabajo para el estudio de Estafilococos. Situación actual de la resistencia de *Staphylococcus* en España. Cuarto estudio nacional (2010). Enferm Infec Microbiol Clin 2010;197:12-26
9. Savio E, Medina J, Hernández O. Emergencia de un nuevo *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente comunitario (SAMR-com) con un perfil más angosto de resistencia. Montevideo: OPS, jul 2011.
10. Bearman G, Edmond M. *Staphylococcus aureus*. In: Wenzel R, Brewer T, Butzler JP, ed. A guide to infection control in the hospital. 3 ed. Boston: ISID, 2010: 204-8.

11. Turnidge J, Chang FY, Fowler VG. *Staphylococcus aureus*: Antimicrobial Therapy and Vaccines 2010 Second Edition 631-58.
12. Boyce JM. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Dis Clin North Am 2011;3:901-13.
13. Turnidge J, Chang FY, Fowler VG. *Staphylococcus aureus*: Antimicrobial Therapy and Vaccines 2010 Second Edition 631-58.
14. Assadian O, Daxboeck F, Aspoeck C, Blacky A, Dunkl R, Koller W. National Surveillance of Methicillinsensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Austrian Hospitals: 2008-2010. Journal of Hospital Infections 2012; 55: 175-79.
15. Gil A, Gaspar M, Sánchez P, Coello R, Fereres J. Personal sanitario como fuente de infección de un brote nosocomial de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Enferm Infec Microbiol Clin 2010;15:173-4.
16. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. NEJM 1998; 339:520-532.
17. Echevarria, J; Iglesias, D. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. Rev Med Hered, Lima, v. 14, n. 4, oct. 2010.
18. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 2011 Oct;10(4):781- 91. Review.
19. Naimi TS , LeDell KH, Como-Sabeti K. Comparison of Community and Health Care Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. JAMA, 2010; 290: 2976 - 2984.
20. Bonino A, Gnesetti A, Pujadas M, Broggi A. Infecciones por *Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirido en la comunidad: análisis de la población pediátrica asistida en el Hospital Policial de Uruguay, 2004 Arch Pediatr Urug 2011; 78(1): 41-47.
21. Lavandera I. Use of honey to cure of septic wounds. Revista Cubana de Cirugía 2011;50(2):187-196
22. Allen, K. L. y Molan, P. C. The sensitivity of mastitis causing bacterias to the antibacterial activity of honey. Hamilton, New Zealand: s. n. 2010.

23. Cabrera L, Ojeda G, Céspedes E y Colina A. Antibacterial Activity of Multifloral Honey Bees (*Apis mellifera* scutellata) from Four Apiarists Zones in Zulia State, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIII, N° 3*, 205-211, 2012.
24. Kartal M, Yildiz S, Kaya S, Kurucu S, Topçu G, 2003. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*. Pag. 69-73.
25. Redescubrimiento del poder curativo natural de la miel. La Colmena Huber. 21-02-2010 <http://www.apiguia.com.ar/miel/poder%20curativo.htm>
26. Alnaimat S, Wainwright M, Al'Abri K. Antibacterial potential of honey from different origins: a comparison with manuka honey. Sulaiman Alnaimat et al. 2012 : 1 (5) 1328-1338.
27. Cooper RA, Molan PC, Harding K. The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J Applied Microb*. 2009; 93: 857-863.
28. Ramírez J, Calderón R, Ortiz R, Sánchez L. *Manual de Apicultura*. Programa de Publicaciones e Impresiones de la Universidad Nacional, Costa Rica. Tomo I, 2010; pp 44-77.
29. Taormina P, Niemira B, Beuchat L. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int J Food Microb*. 2010; 69: 217-225.
30. Redescubrimiento del poder curativo natural de la miel. La Colmena Huber. 21-02-2011 <http://www.apiguia.com.ar/miel/poder%20curativo.htm>
31. Zamora, L. (2011). Calidad Microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abeja sin aguijón. *Revista biomédica*. Vol. 22, No. 2: 59-66.
32. Martins H, Martins L, Bernardo F. Bacillaceae spores, fungi and aflatoxins determination in honey. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias*. 2011; 98:86-88.
33. Nakano H, Okabe T, Hashimoto H, Sakaguchi G. Incidence of *Clostridium botulinum* in honey of various origins. *Jpn J Med Sci Biol*. 1990; 43:183-195.
34. Massanari M, Wenzel RP. Hospital infection control. En: Stein JH. *Internal medicine*. 5 ed. New York: Mosby; 1998. Pp. 1363-4.

35. The National Honey Board. Honey-Health and Therapeutic Qualities .(The National Honey Board, 390 Lashley Street Longmont,CO 80501-6045 USA). Disponible en: www.nhb.org/download/factsht/compendium.pdf
36. Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. Arch Med Res. 2011;36:464-7.
37. National Honey Board. pH & Acids in Honey. (The National Honey Board, 390 Lashley Street Longmont,CO 80501-6045 USA). Disponible en: <http://www.nhb.org/download/factsht/ph-acid.pdf>
38. Kwakman et col. (2010) How honey kills bacteria. FASEB J. 24:2576-2582.
39. Cooper R, Molan PC, Harding KG. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. J R Soc Med. 2006; 92:283-285.
40. Koneman E, García I. “La miel podría ser utilizada para evitar las infecciones en las heridas”. 15 de enero de 2010. Journal of Applied Microbiology 2012.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

PROCESO DE OBTENCION DE MIEL DE *APIS MELLIFERA*

1. AHUMAR PANALES



2. DESOPERCLAR PANALES

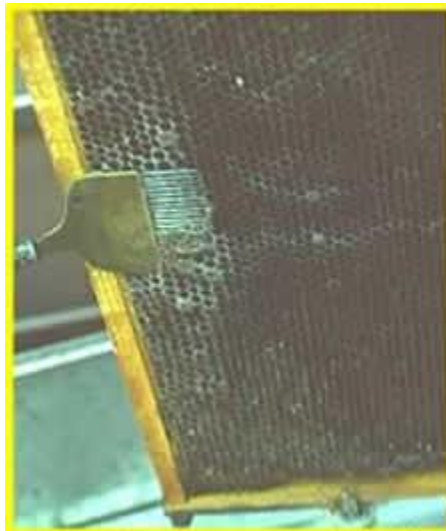
Cualquier recipiente de plástico o metal provisto de soporte para los cuadros y colador puede hacer las veces de tanque de desoperculación; hay quienes utilizan dos recipientes plásticos de diferentes dimensiones e introducen una parte del uno en el otro, perforando con pequeños orificios el fondo del que entra, para que haga las veces de colador, con buenos resultados y a muy bajo costo.



3. Aquí se utiliza el **DESOPERCULADOR**, Puede ser un **CUCHILLO** con filo por los dos lados, con un largo de 25 cm. por 4 de ancho. Si se calienta previamente cortará mejor los opérculos sin dañar el panal.



Otro auxiliar en esta operación es el **ESCARIFICADOR** o **GARFIO DESOPERCULADOR**, compuesto de dientes de acero rectos con puntas afiladas y fijados a un soporte.



4. CENTRIFUGACION

El EXTRACTOR DE MIEL o CENTRIFUGA, es un aparato que sirve para extraer la miel de los cuadros sin dañarlos, pudiendo ser devueltos a la colmena para ser llenados de nuevo por las abejas.

Consiste de manera general, en un tanque de lámina galvanizada o de acero inoxidable con drenaje inferior, dentro del cual va una canastilla que gira por un sistema de piñones sobre un eje central produciendo una fuerza centrífuga.



5. FILTRACION

Debido a que la miel puede salir con pedazos de cera, abejas y otras suciedades, es necesario usar **FILTROS**, y los más sencillos son los coladores de tela.



6. DECANTACION O MADURACION

Dependiendo de la capacidad económica, puede usar un tanque para decantación. La decantación es una operación por la cual la miel va al fondo y las partículas de cera, polen, larvas o adultos flotan formando una capa de espuma, la cual es fácilmente recogida.

Como **TANQUE DE DECANTACION** se usa un recipiente de acero inoxidable, amplio y limpio, con tapa y llave de salida.



7. **PASTEURIZACION** La pasterización es un tratamiento por el que la miel alcanza una temperatura de $78^{\circ}\text{C}/5-7$ min., para después ser enfiada rápidamente.



ANEXO 2

METODO DE SUSPENSION DIRECTA

Las cepas de SARM se conservan en agar soya tripticasa, para la realización del trabajo experimental. El método de suspensión directa de colonias es el más adecuado para la preparación del inóculo. Se colocan 5 ml de suero fisiológico estéril en un tubo de ensayo. De las cepas aisladas en agar soya tripticasa, preparar el inóculo haciendo un cultivo directo en solución salina, tomando con un asa bacteriológica del agar y se suspenden en el tubo hasta alcanzar una turbidez comparable a la solución de Mc Farland 0.5.



ANEXO 3



Cepa de *Staphylococcus aureus*

ANEXO 4

INOCULACIÓN DE LAS PLACAS

Sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotar el hisopo varias veces y presionar firmemente por las paredes internas del tubo por encima del nivel del líquido.

Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller Hinton estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.



ANEXO 5

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO

Preparar discos de papel de filtro estériles, los cuales serán sumergidos dentro de cada concentración de miel de abeja: 50% y 100% por el periodo no menor de 1 hora, luego con una aguja estéril, éstos se colocarán sobre los cultivos de *S. aureus* en las placas petri previamente preparadas; las placas se mantendrán en la misma posición por un periodo de 10 minutos.

Luego de este tiempo las placas se voltearán de posición y se incubarán a 37° C, durante 24 horas. Todo el procedimiento se llevará a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama de un mechero.



ANEXO 6

METODO DE DIFUSION KIRBY Y BAUER



ANEXO 7

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) IN VITRO DE DOS CONCENTRACIONES DE MIEL DE ABEJA SOBRE MRSA.

Se determinará la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la técnica de dilución en tubos de cada una de las cepas de *Staphylococcus aureus*, con las dos concentraciones determinadas de 50 y 100%.

Los ensayos se repetirán 10 veces para cada concentración de miel, por tanto, cada grupo estará conformado por 10 tubos de ensayo.

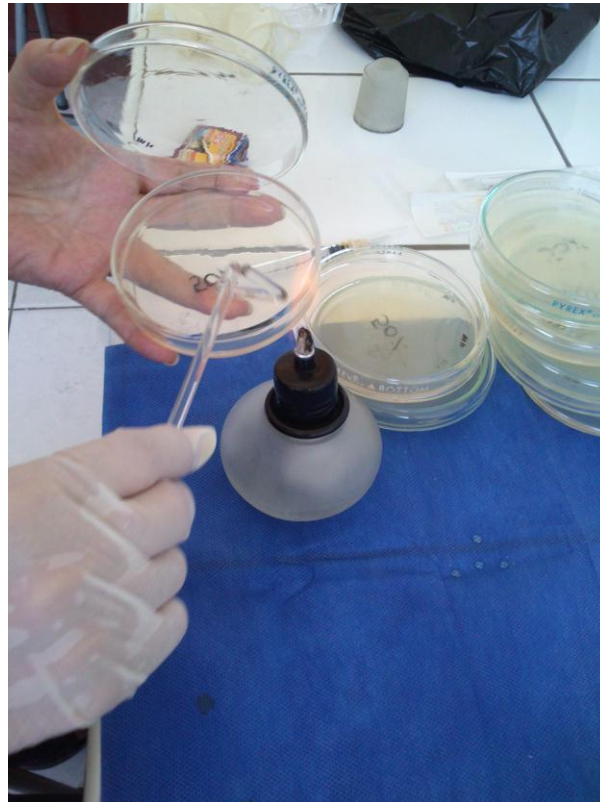
En los tubos se colocarán 0.2 ml. de la dilución de la cepa en solución salina (semejante a tubo # 0,5 de Mac Farland) seguido de 0.8 ml de cada concentración de miel de abeja.

Luego, se incubaran todos los tubos de ensayo en la estufa a 37° C por 24 horas. Posteriormente se sembrará 0.1 ml. de solución de cada uno de los tubos en placas petri con agar Mueller Hinton, utilizando el asa de Driglasky para dispersar la muestra, Todo el procedimiento se llevará a cabo dentro del diámetro de 10 cm. de la llama de un mechero. Dichas placas serán colocadas en estufa por 48 hrs. a 37°C. Finalmente se observará el crecimiento bacteriano y se realizará el conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).



ANEXO 8

DISPERSIÓN DE LA MUESTRA SOBRE PLACAS PETRI CON AGAR MUELLER HINTON UTILIZANDO EL ASA DE DRIGALSKY



ANEXO 9

Diámetro del halo de inhibición de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en función de 2 concentraciones de miel de *Apis mellifera* y vancomicina.

PROTOCOLO DE DATOS

Diámetro de Halo (mm)	Efecto bactericida in vitro de miel de <i>Apis mellifera</i>			
	Vancomicina	100%	50%	Control
Halo 1				
Halo 2				
Halo 3				
Halo 4				
Halo 5				
Halo 6				
Halo 7				
Halo 8				
Halo 9				
Halo 10				

ANEXO 10

Número de UFC de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en función de 2 concentraciones de miel de *Apis mellífera*, vancomicina y control bacteriológico.

PROTOCOLO DE DATOS

	UFC			
	Vancomicina	100%	50%	Control
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				