

**EVALUACIÓN DEL EFECTO *IN VITRO* DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO  
DE *APIS MELLIFERA* Y LA LISOZIMA SOBRE BACTERIAS CAUSANTES  
DE MASTITIS EN BOVINOS**



**UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**VIVIANA EUGENIA BUSTOS CASAS**

**COD: 10511721190**

**FABIANNA ORTIZ GARCIA**

**COD: 10511724791**

**TUTOR: FRANCISCO JAVIER VARGAS ORTIZ MV, MSc, PhD**

**CO-TUTORA: DOLLY PATRICIA PARDO MORA MV, PhD**

**BOGOTA D.C**

**2022**

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>6</b>
<b>2.JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	9
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
<b>4. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>10</b>
4.1 MASTITIS.....	10
4.1.1.Definición. ....	10
4.1.2.Mastitis clinica .....	10
4.1.3.Mastitis subclínica.....	10
4.1.4.Signos.....	10
4.1.5.Diagnóstico .....	10
4.1.6.CMT .....	11
4.1.7.Cultivo bacteriano.....	11
4.1.8.Examen clínico.....	11
4.1.9.Tratamiento.....	11
4.2. AGENTES CAUSALES DE MASTITIS .....	12
4.2.1.Patógenos bacteriano.....	12
4.2.2.Identificación de la bacteria.....	13
4.2.3.Agar MacConkey.....	13
4.2.4.Agar sangre.....	14
4.2.5.Agar Manitol salado .....	14
4.2.6.Agar Muller Hinton.....	14
4.2.7 .Caldo LB.....	14
4.2.8 Tinción de gram.....	15
4.2.9.Prueba de Coagulasa.....	15
4.2.10 Prueba de oxidasa.....	15
4.2.11.Prueba de Catalasa.....	15
4.2.12 Agar Bilis Esculina .....	15
4.2.13 Prueba de CAMP.....	16
4.2.14 Agar TSI.....	16
4.2.15 Antibiograma.....	16
4.2.16 Agar Salmonella Shigella.....	17
4.2.17 Agar EMB.....	17
4.2.18 Agar Citrato de Simmons.....	18
4.2.19 Agar Cetrimide .....	18
4.2.20 Agar LIA.....	18
4.2.21 Agar DNAsa.....	19
4.2.22 Agar SIM.....	19
4.2.23 Caldo MR-VP.....	19

4.3 TÉCNICAS DE LABORATORIO .....	20
4.3.1 Microdilución en caldo.....	20
4.3.2 Espectrometría.....	20
4.3.3. Recuento Bacteriano.....	21
4.4 PROPÓLEO.....	21
4.4.1 Definición.....	21
4.4.2. Propiedades físicas.....	21
4.4.3 Composición Química.....	21
4.4.4. Recolección y Almacenamiento.....	22
4.4.5. Usos y aplicaciones.....	22
4.4.6 Extracto Etanólico de Propóleo.....	22
4.5 LISOZIMA.....	23
4.5.1. Definición.....	23
4.5.2. Usos y aplicaciones.....	23
4.5.3. Mecanismo de Acción.....	23
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>24</b>
5.1. VARIABLES A OBSERVAR.....	24
5.1.1. Criterios de inclusión.....	24
5.1.2. Criterios de exclusión.....	24
5.1.3. Variables.....	24
5.1.3.1. Variable Dependiente.....	24
5.1.3.2. Variable Independiente.....	24
5.2. HIPÓTESIS GENERAL DEL TRABAJO.....	25
5.3. Selección de Muestras.....	25
5.4. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO.....	25
5.4.1. Procesamiento de las muestras de leche.....	25
5.4.1.1. Aislamiento e identificación de colonias.....	25
5.4.2. Elaboración del extracto de propóleo .....	25
5.4.3. Elaboración de Lisozima.....	26
5.4.4. Pruebas de sensibilidad in vitro.....	26
5.4.5. Antibiograma.....	28
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>8. CONCLUSION.....</b>	<b>48</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>50</b>

## TABLA DE GRÁFICAS

<b>Figura 1.</b> Caracterización de las bacterias-Marco teórico.....	13
<b>Firuga 2.</b> Mapa guía para el montaje de cada placa .....	27

<b>Figura 3.</b> Placa de ELISA con una cepa bacteriana expuesta a distintas concentraciones de propóleo y lisozima.....	28
<b>Figura 4.</b> Antibiograma montado para una de las cepas bacterianas aisladas donde se observan halos de inhibición para dos tipos de antibióticos.....	29
<b>Figura 5.</b> Morfología bacteriana. En este gráfico se observa la morfología correspondiente a las bacterias elavuadas coco gram positivos 77,4%, bacilos gram negativos 12,9%, cocobacilo gram negativo 9,7%.....	31
<b>Figura 6.</b> Bacterias sometidas a pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i> , cepas ATCC, número de bacterias, clasificación de coco gram positivos, cocobacilos gram positivo, bacilos gram negativos.....	31
<b>Figura 7.</b> CI 50 e Intervalo de confianza propóleo y lisozima; concentración inhibitoria 50, resultados basados en el programa Graphpad Prisma.....	32
<b>Figura 8.</b> Bacterias sometidas a tratamiento propóleo y antibiótico.....	42
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de inhibición lisozima, porcentaje de inhibición de antibiótico de elección (Gentamicina) en 10 bacterias de tipo coco gram positivo.....	42
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de cepas que fueron inhibidas a uno o varios tratamientos.....	47

## INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad muy común presente en las ganaderías principalmente lecheras debido al constante ordeño de los animales, se puede presentar de forma clínica o subclínica, siendo uno de los principales problemas del ganado lechero a nivel mundial (Boldyreva, 2014; Gomes et al, 2016) ya que

representa pérdidas económicas entre el 10 % y 20 % en cuanto a las utilidades del ganadero (Universidad de La Salle-CONtexto ganadero, 2015).

La causa de esta enfermedad es variada, pero se atribuye principalmente al manejo que se da a los animales en el momento del ordeño y la higiene del mismo, ya que después de este proceso el esfínter del pezón de los animales queda más distendido permitiendo el paso de distintos patógenos contaminantes, principalmente de tipo bacteriano. Esta problemática suele verse con mayor frecuencia en explotaciones que no mantienen un programa de prevención y control adecuado.

Los antibióticos son los medicamentos de elección para el tratamiento de la mastitis, sin embargo si no se maneja un tiempo de retiro adecuado, el producto final puede ser de alto riesgo para la salud del consumidor debido a la residualidad de estos fármacos, además, el constante aumento de cepas bacterianas que han venido mostrando resistencia completa o parcial ante los antibióticos de uso frecuente es una problemática mundial en el campo de la salud humana y animal (Condron, 2013; OIE, 2015; OMS, 2016), razón por la cual se ha planteado buscar alternativas con productos naturales, como en este caso el extracto de Propóleo de abejas *Apis mellifera* y la Lisozima, que han demostrado tener un posible efecto inhibitorio que podría llegar a ser significativo, contrarrestando el problema de la resistencia bacteriana y disminuyendo la residualidad que suelen generar los antibióticos al ser productos de origen natural, disminuyendo efectos secundarios para la salud humana y animal. Por esta razón se decidió evaluar el efecto del extracto de propóleo y la Lisozima frente a diversos microorganismos aislados en muestras de leche tomadas de animales ubicados en fincas de la sabana de Bogotá, diagnosticados con mastitis mediante la prueba de CMT, seleccionando únicamente hembras que se encontraran en periodo de lactancia y con signos clínicos de mastitis.

El propóleo manejado fue colectado del apiario de la Universidad Antonio Nariño ubicada en la Localidad de Usme, Bogotá; la composición química de este propóleo colombiano fue evaluada y analizada por GC-MS, midiendo la actividad antioxidante y sus componentes principales para establecer una asociación con su concentración inhibitoria al 50% y su potencial antibacteriano. La lisozima que se utilizó fue de carácter comercial.

Para las pruebas *in vitro* se utilizó la técnica de microdilución en placa partiendo de una concentración de 16,3 mg/ml del extracto de propóleo y 20 mg/ml de lisozima; se realizaron los ensayos de inhibición bacteriana, corroborados por recuento en placa después de 24 horas de incubación en agar. Un total de 71 cepas bacterianas se aislaron, de las cuales 26 fueron expuestas a pruebas, siendo 18 cepas caracterizadas como multirresistentes y dando prioridad a la exposición en ellas. Se evaluaron además las cepas ATCC *Staphylococcus aureus* 29213, *Streptococcus uberis* 700403, *Escherichia Coli* 25922 y *Pseudomona aeruginosa* 27853.

El extracto de propóleo y la lisozima mostraron porcentajes de inhibición con algunas variaciones de acuerdo a la cepa bacteriana tratada, lo que permite inferir que ambos

tratamientos podrían ser una alternativa profiláctica para la mastitis bovina e incluso otro tipo de enfermedades de origen infeccioso, siendo una alternativa natural que puede ser utilizada en el desarrollo de estrategias terapéuticas para la enfermedad, más aún ante la problemática de la resistencia bacteriana a antibióticos usados comercialmente y además disminuyendo significativamente los efectos de residualidad.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la sabana de Bogotá existen gran cantidad de hatos lecheros; la mastitis es una patología frecuente en estas ganaderías que se presenta por diversas causas, desde el desconocimiento y/o la falta de capacitación de los empleados hasta condiciones propias de la salud de los animales. A nivel mundial, se estima que el 10% de los casos de mastitis, corresponden a la forma clínica y aproximadamente el 90% son del tipo subclínico. Dentro de los agentes causales de mastitis se resaltan bacterias como *Staphylococcus aureus*, que globalmente es la más prevalente y que muestra mayor patogenicidad (Cruz et al., 2007; Calderón y Rodríguez, 2008). En Colombia, estudios recopilados por la “Revista Scielo” reportan que los patógenos aislados con más frecuencia para mastitis subclínica fueron *S. agalactiae* con un 34,4%, ECN con

17,6% y *Corynebacterium sp* con 13,2%. También hay otros artículos que reportan que los agentes etiológicos aislados en el país con más frecuencia incluyen nuevamente al *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pasteurella multocida*, *Nocardia spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomona sp*, *Staphylococcus aureus* (Maldonado W. 2015). La prevalencia general de esta enfermedad en el país se encuentra entre el 16,9%-51,3% (Posada D.,2010) siendo, como ya se recalco, de las patologías más comunes y presentes en las ganaderías lecheras y de doble propósito, y por lo tanto de importancia a nivel productivo y económico.

Para Ruiz (2011) la implementación de un programa de control y prevención de la mastitis debe hacerse con base en las características de los microorganismos para así tener un programa más eficiente. Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud, señala que la resistencia bacteriana a los antibióticos debe ser considerarse un problema grave, complejo y de repercusión internacional, recomendando poner en marcha un sistema globalizado de vigilancia de la resistencia bacteriana tanto en medicina humana y como en veterinaria (WHO, 2000), y esta enfermedad al ser tratada con medicamentos antibióticos también debe ser relevante en cuanto a la búsqueda de nuevas alternativas para conservar la eficacia de los compuestos farmacológicos frente a los patógenos. Esto lleva a cuestionarse, ¿Qué efecto podría tener el extracto de propóleo y la lisozima para combatir las bacterias causantes de mastitis en bovinos?, siendo así una alternativa terapéutica que disminuya el uso de antibióticos.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de investigación se elabora con el propósito de evaluar una posible alternativa terapéutica tratando de disminuir el uso de antibióticos como primera opción, contrarrestando así las problemáticas que esto conlleva, entre ellas el constante aumento de la resistencia bacteriana hacia los mismos.

El extracto de propóleo ha sido reportado por distintos autores como un antibacteriano con propiedades bactericidas; en un estudio realizado en el departamento del Cauca se reportó que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Staphylococcus aureus* fue de 15,39 mg/ml y 17,03 mg/ml en dos extractos de propóleo analizados. Para *Pseudomona aeruginosa* se encontró en el mismo estudio que la CMB fue de 17,3 mg/ml con un propóleo de Buenos Aires y 30,78 mg/ml con un propóleo de Totoró. Además se mencionan reportes de otros autores con concentraciones más altas, y otras más bajas, concluyendo que si hay una efecto significativo por parte de

los extractos de propóleo, siendo más efectivo en bacterias gram positivas que gram negativas, atribuyéndolo a que las bacterias gram negativas poseen una pared más compleja, con proporciones lipídicas mayores a las gram positivas, lo que podría explicar una mayor resistencia al extracto (Mirzoeva,1997). Al ser un producto natural los efectos secundarios se reducen significativamente, siendo solo relevante una posible reacción alérgica al mismo.

La lisozima se encuentra en una gran variedad de organismos vivos, de una manera notable, en estudios recientes (Wang et al.,2005), la función antibacteriana es a través de la acción bacteriolítica en la pared celular bacteriana y también estimula la acción fagocítica de los macrófagos, actúa frente a bacterias Gram positivas, provocando la lisis de estas mediante la alteración de las propiedades de las estructuras de la superficie de la célula destruyendo el enlace glucosídico entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina en el peptidoglicano bacteriano, que es un componente importante de la pared celular (Sahoo et al., 2012, Gong, 2014). Se ha aislado y purificado una lisozima de la pupa de *Cameraria ohridella* capaz de lisar las células de *Bacillus megaterium*, ocasionando una disminución en la densidad óptica del crecimiento bacteriano (Fiołka et al. 2005). Según algunos autores, es posible que la lisozima tenga dos funciones, una forma digestiva que descompone las bacterias ingeridas en el intestino y una respuesta defensiva contra los patógenos que ingresan. Una lisozima aislada y purificada del tejido de una planta de coliflor afectó el crecimiento de bacterias como *Erwinia carotovora* (Manikandan et al., 2015). Sin embargo, la actividad antibacteriana de la lisozima de huevo de gallina sigue siendo más eficaz que la de otros tipos de lisozima estudiados.

En el año 2010, se dio a conocer al mundo el concepto de “Una Sola Salud”, la OMS, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA) y expertos internacionales en salud pública, sanidad animal y medio ambiente declararon que la resistencia bacteriana a los antibióticos, la rabia y la influenza de origen animal, son las tres principales amenazas mundiales emergentes. La OMS, FAO y OIE reconocieron una responsabilidad conjunta de hacer frente a las zoonosis y a otras enfermedades de alto impacto socioeconómico, con el objetivo a largo plazo y con colaboración internacional, de coordinar actividades a nivel mundial para superar los riesgos para la salud en la interfaz entre humanos, animales y ecosistemas (World Health Organization, 2015). El 60 % de los patógenos humanos son de origen animal y el 75 % de las enfermedades animales emergentes pueden transmitirse a los humanos, teniendo en cuenta que cinco enfermedades emergentes surgen cada año (World Health Organization, 2015). Combatir el creciente aumento de resistencia bacteriana a antibióticos es por lo tanto un trabajo conjunto, y otras opciones como los tratamientos alternativos aquí descritos son prometedores y beneficiosos para el futuro de la medicina humana y animal.

Teniendo en cuenta esto, se busca dar un aporte significativo a los estudios de esta enfermedad justificándonos en los resultados que se obtuvieron en la facultad de Medicina Veterinaria en la Universidad Antonio Nariño.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar el efecto *in vitro* del extracto de propóleo de *Apis mellifera* y la lisozima inhibiendo el crecimiento de bacterias causantes de la mastitis en bovinos identificadas en distintos muestreos de leche realizados en fincas de la Sabana de Bogotá.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar las bacterias causantes de mastitis mediante técnicas microbiológicas y pruebas específicas de identificación.

- Determinar la concentración mínima inhibitoria eficaz *in vitro* del extracto de propóleo y la lisozima contra las bacterias causantes de la mastitis en bovinos mediante técnicas para medir sensibilidad antimicrobiana.
- Comparar el efecto del extracto de propóleo y la lisozima vs. antibióticos convencionales para la enfermedad (Eritromicina, Penicilina, Cloxacilina, Gentamicina)

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 MASTITIS

**4.1.1 Definición.** La mastitis bovina es una patología causada por una reacción inflamatoria de la glándula mamaria por la invasión de microorganismos a través del pezón, produciendo alteraciones físicas y químicas en la leche y en la ubre, aumento del número de células somáticas y finalmente cambios como es la pérdida de la funcionalidad. La enfermedad puede cursar como subclínica o como clínica. Clásicamente se la ha definido como una “enfermedad polifactorial”, porque el riesgo de infección depende de la habilidad de la vaca para combatirla, del tipo y patogenicidad de las bacterias presentes en un hato y, fundamentalmente, de las condiciones del medio ambiente y del manejo en general del ordeño en particular que se estén desarrollando en un establecimiento. (Corbellini,1996)

**4.1.2 Mastitis clínica.** Según la Federación Internacional de Lechería (1999), define a la mastitis clínica como la categoría de mastitis en la que se manifiestan signos claros y observables en la ubre del animal o en la leche. (Corbellini,1996).

**4.1.3 Mastitis subclínica.**

Según la Federación Internacional de Lechería (1999), define a la mastitis subclínica como la categoría de mastitis en la cual se producen signos invisibles en la ubre, excepto cuando se usan herramientas de diagnóstico tales como: determinación de enzimas inflamatorias o recuento de células somáticas (RCS). (Corbellini,1996).

**4.1.4 Signos.** La mastitis clínica se caracteriza por presentar alteraciones visibles, como cambios en el color de la leche, observándose amarillenta o hasta rojiza, variación en su sabor y consistencia cremosa y/o espesa. A la palpación podemos detectar cambios en el parénquima glandular percibiéndose caliente, firme y dura; los animales pueden presentar fiebre, taquicardia, polipnea, anorexia, atonía, etc. (Lopez , 2011).

**4.1.5 Diagnóstico.** Los casos de mastitis clínica se reconocen debido a las evidentes alteraciones en la glándula mamaria, pero el diagnóstico del agente causal sólo se logra mediante cultivo microbiológico de la secreción. Existen diferentes pruebas que pueden ayudar a detectar la mastitis, clasificándose en pruebas físicas, químicas, biológicas, microbiológicas y métodos de conteo electrónico celular. Las pruebas físicas son útiles cuando la mastitis ya está avanzada y no se detecta mastitis subclínica. Dentro de las pruebas químicas se encuentra la conductividad eléctrica de la leche, papel indicador de mastitis y la prueba de Whiteside. Pueden mencionarse también las pruebas biológicas que existen, entre ellas la prueba de California para mastitis (CMT), prueba de Catalasa, prueba de Wisconsin y el análisis de células somáticas, así como el diagnóstico bacteriológico por los métodos de aislamiento, cultivo, tinción, bioquímica e identificación. (Lopez,G,J 2011)

**4.1.6 CMT.** La prueba de California de mastitis, de acuerdo con Mellenberg (2001), es un examen rápido que predice y aproxima el conteo de células somáticas en muestras de leche por cada cuarto. El reactivo CMT es un detergente con un indicador de pH añadido; la leche y el reactivo se mezclan en igual cantidad, tomando 2 ml de cada uno; el reactivo disuelve o rompe las paredes celulares externas y las nucleares de cualquier leucocito, constituidas principalmente de grasa (el detergente disuelve la grasa), liberando el ADN desde el núcleo. El ADN se gelifica formando una masa fibrosa que se mide en 0, trazas, 1, 2 y 3, siendo positivo desde 1, en donde habrá mayor cantidad de gel en los pozos correspondientes a cuartos afectados debido a que el número de células somáticas es más elevado.

**4.1.7 Cultivo Bacteriano.** Los cultivos se realizan para identificar los organismos específicos que se encuentran comprendidos en un caso clínico de mastitis y para distinguir los animales sanos de aquellos que presentan un caso subclínico. La confiabilidad de los resultados de laboratorio depende de los cuidados sanitarios que se tengan durante la toma de muestras y su manipulación posterior. Los procedimientos bacteriológicos son esenciales para la selección de los tratamientos que tienen especificidad para el agente presente. (Lopez,G,J 2011)

**4.1.8 Examen clínico.** Se debe observar la presencia de inflamación en uno, varios cuartos o de toda la glándula, aumento de la temperatura en el área afectada, enrojecimiento de la zona, dolor al tacto, hay aumento también de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Cuando se encuentran todos o alguno de los signos mencionados se puede interpretar como un caso de mastitis clínica, donde además se encuentran cambios importantes en la leche que produce el tejido afectado (Bedolla-Cedeño, C. 2019) Sin embargo, en la mastitis subclínica estos cambios no son muy evidentes y la ubre de la vaca permanece sana a simple vista, la leche que produce se observa aparentemente normal, pero eso no descarta la posibilidad de una infección que esté dañando el tejido glandular y provocando por lo tanto una alteración en la leche que esta produce (Pérez et al., 2005).

#### **4.1.9 Tratamiento.**

Los objetivos del tratamiento de la mastitis son eliminar el microorganismo causal evitando la progresión de la infección, prevenir las nuevas infecciones intramamarias, restablecer lo más pronto posible el estado general de la vaca, evitar o minimizar la lesión de la ubre, recuperar la producción de leche lo más pronto posible, prevenir el descarte prematuro de vacas afectadas y evitar un menor precio de la leche debido a su baja calidad (Rodriguez, 2014). Los antibióticos son la primera elección y se administran por vía sistémica o local (aplicación intramamaria). Adicionalmente se toman medidas de protección con el propósito de reducir la inflamación. Debe alcanzarse una concentración efectiva antibacteriana en el tejido, de acuerdo con el patógeno que se trate. Básicamente para la terapia antibacteriana de Mastitis se recomiendan los Betalactámicos, aminoglucósidos, lincosamidas, macrólidos, tetraciclina, polipéptidos, trimetoprim-sulfamidas combinadas, polipéptidos y fluocinolona. Es muy importante realizar una terapia dirigida a los efectos tóxicos, para evitar daños permanentes al tejido glandular, la pérdida de un cuarto o de la vaca (Lopez,G,J 2011). Hoy en día se maneja en casos de mastitis leve el uso de antiinflamatorios no esteroideos locales o sistémicos esperando que el animal resuelva la infección de forma autónoma observando mejoras 24 horas después de la aplicación, esto con el fin de combatir la problemática actual de resistencia bacteriana a los antibióticos. Se enfatiza mucho el tratamiento preventivo con prácticas de ordeños adecuadas, y la buena higiene del operador ya sea con la vaca, limpiando dos veces la ubre, realizando correctamente el presellado y el sellado. Otros tratamientos alternativos también como segunda medida si la infección aumenta y ya se hacen notorios los cambios en la morfología de la ubre; en estos casos ya se inicia con tratamiento sistémico, Algunos de los tratamientos alternativos que llegan a ser utilizados son naturales y únicamente de forma local, como paños o baños de la ubre con algunas plantas como manzanilla, hinojo, diente de león, caléndula, las cuales tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias. ( Finegold. 1994)

## **4.2 AGENTES CAUSANTES DE MASTITIS**

### **4.2.1 Patógenos bacterianos.**

Las bacterias que pueden producir mastitis habitan en diferentes ambientes, razón por la que difieren en su mecanismo de transmisión, infección y control. *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* están fundamentalmente asociados a ubres infectadas, lesiones de los pezones y colonización del canal del pezón, transmitiéndose de vaca a vaca y de cuarto a cuarto al momento del ordeño o poco después. Los llamados “patógenos ambientales” (*coliformes*, *Streptococcus uberis* y *Pseudomona aeruginosa*), están ampliamente extendidos en los lugares donde viven los animales, en especial si están húmedos (barro) y/o con un alto contenido de materia orgánica (materia fecal, restos de alimentos como ensilajes o granos húmedos, etc.). (Corbellini,1996).

- **Patógenos contagiosos**

*Streptococcus agalactiae*

*Staphylococcus aureus*

*Corynebacterium bovis*

- **Patógenos ambientales**

*Streptococcus dysgalactiae*

*Enterococos*

*Coliformes (E.coli)*

- **Otros agentes patógenos**

*Pseudomona sp*

*Mycobacterium sp*

*Arcanobacterium pyogenes*

*Mohos- levadura*

**Figura 1.** Caracterización de las bacterias - marco teórico

Grupo	Especie	Características Tintoriales (gram)
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	Gram (+)
	<i>S. agalactiae</i>	Gram (+)
<i>Mycoplasma</i>	<i>M. bovis</i>	Gram (-)
<i>Corynebacterium</i>	<i>C. bovis</i>	Gram (+)
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	Gram (-)
<i>Klebsiella</i>	<i>Spp</i>	Gram (-)
<i>Enterobacter</i>	<i>Spp</i>	Gram (-)
<i>Streptococcus</i>	<i>S. uberis</i>	Gram (+)
	<i>S. dysgalactiae</i>	Gram (+)

(Bedolla & Ponce de León, 2008).

La edad, etapa de lactancia, la estación del año, la variación de la temperatura ambiental y las variaciones día a día de las condiciones climáticas son factores también relevantes en la proliferación de los microorganismos (Bedolla & Ponce de León, 2008).

Otros factores predisponentes de mastitis incluyen la ubicación geográfica, donde los climas húmedos y cálidos favorecen la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma sp*; el control incorrecto de ectoparásitos, la alta prevalencia de la

enfermedad en las vacas adultas y el suministro de leches contaminadas a las terneras (Contreras, 2009).

Acceder a los registros de la presentación de la enfermedad en las ganaderías es esencial para el monitoreo individual y a nivel del hato, siendo prerrequisito para la evaluación económica y control de los programas (Bedolla & Ponce de León, 2008).

#### **4.2.2 Identificación de la bacteria**

Para realizar cualquier tipo de evaluación se deben identificar todas las cepas presentes para tener en cuenta sus características, morfología y requerimientos, es por esto que al recibir cualquier tipo de muestra, esta debe ser procesada. Para la identificación de bacterias existen distintas pruebas que guían al investigador hacia la especie correspondiente.

**4.2.3 Agar MacConkey.** Es un medio de cultivo diferencial diseñado para aislar selectivamente bacilos Gram negativos y entéricos diferenciándolos sobre la base de la fermentación de la lactosa. El cristal violeta y las sales biliares contenidas en el agar inhiben el crecimiento de bacterias gram positivas, lo que permite el aislamiento de bacterias gram negativas. Las bacterias entéricas que tienen la habilidad de fermentar lactosa se pueden detectar utilizando el carbohidrato de lactosa y el indicador de pH rojo neutro. (Anderson, Cindy 2013)

**4.2.4 Agar Sangre.** Este medio de cultivo proporciona el crecimiento de la gran mayoría de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como de hongos (mohos y levaduras). La infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, aún para aquellos microorganismos nutricionalmente exigentes, a su vez el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El agregado de 5-10 % sangre ovina desfibrinada estéril promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.5 Agar Manitol salado.** Es un medio de cultivo que permite el crecimiento de bacterias Gram-positivas y además inhibe el crecimiento de Gram-negativas. El manitol actúa como el hidrato de carbono fermentable. El cloruro de sodio en alta concentración, es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante y el rojo fenol es el indicador de pH. Este medio es altamente selectivo por la alta concentración salina y la capacidad de fermentación del manitol por los microorganismos. Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, modificando el pH del medio y de esta forma activando el indicador de pH del color rojo al amarillo. Los Staphylococcus crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol. Los Staphylococcus coagulasa positiva fermentan el manitol y se visualizan como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color. Por otro lado, los Staphylococcus que no fermentan el manitol, se observan como colonias rojas, rodeadas de una zona del mismo color o púrpura (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.6 Agar Muller Hinton.** Es un medio de cultivo nutritivo que no es selectivo y promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para ser utilizado de forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que este medio presenta buena reproducibilidad en las pruebas de sensibilidad; también a su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina que es bajo y la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.7 Caldo LB.** El Caldo Luria o Caldo LB Miller se utiliza para el crecimiento y mantenimiento de las cepas recombinantes de E. coli utilizadas en procedimientos de microbiología molecular. Estas cepas generalmente derivan de E. coli K12, que no pueden producir vitamina B, por lo que este medio está formulado para promover el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes. La triptona proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El extracto de levadura actúa de igual forma como fuente de vitaminas, particularmente del grupo B, y el cloruro de sodio suministra electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.8 Tinción gram.** Es un tipo de tinción que se realiza sobre las bacterias para observarlas mejor bajo el microscopio. Se realiza esta tinción con el fin de confirmar que la muestra esté pura e identificar qué tipo de bacteria es la que tenemos en crecimiento, ya sea un coco, un bacilo o una espiroqueta. Con esta tinción observamos de igual manera el gram de acuerdo a la conformación de su pared, específicamente la presencia de peptidoglicanos en la misma. Según esto, es una bacteria gram positiva si se tiñe de morado, y una gram negativa si se tiñe de rosado. Esto da un indicio de la posible cepa que se está caracterizando. Si se observan colonias de diferentes formas o color, se debe hacer de nuevo un pase hasta que la lámina en el gram se vea pura y homogénea (Gram, C. 1884).

**4.2.9 Prueba de Coagulasa.** Esta prueba se utiliza para la diferenciación de especies del género Staphylococcus debido a la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa, enzima que convierte el fibrinógeno en fibrina. Existe en dos formas, la primera es la coagulasa unida a la pared celular y la segunda es la coagulasa libre o enzima extracelular que solo se produce cuando la bacteria se cultiva en caldo. La primera se detecta mediante la prueba de la coagulasa en porta y ambas mediante la prueba de la coagulasa en tubo (AF Olmos, 2011)

**4.2.10 Prueba de oxidasa.** Prueba utilizada para determinar si un microorganismo produce la enzima citocromooxidasa. La prueba se usa en la caracterización inicial de bacterias gramnegativas. La oxidasa es una enzima que cataliza una reacción de oxidación y reducción empleando oxígeno molecular como aceptor de electrones. En

estas reacciones el oxígeno se reduce a agua o peróxido de hidrógeno. Las oxidasas son una subclase de las oxidorreductasas (AF Olmos, 2011).

**4.2.11 Prueba de la Catalasa.** Se utiliza en la caracterización inicial de la mayoría de las bacterias. Esta prueba se realiza con el fin de determinar si la enzima catalasa está presente en las colonias aisladas, aspecto característico de bacterias aerobias aunque esta enzima está presente en gran parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo, siendo excepción el *Streptococcus* spp y *Enterococcus* spp. Para realizar la prueba se expone la bacteria a una cantidad mínima de peróxido de hidrógeno observando si esta lo descompone formando burbujas inmediatamente (AF Olmos, 2011).

**4.2.12 Agar Bilis Esculina.** Este medio de cultivo es ideal para el aislamiento y diferenciación de enterococos intestinales y estreptococos del grupo D , basado en la hidrólisis de la esculina en presencia de bilis. Los organismos positivos para hidrólisis de esculina hidrolizan el glucósido esculina en esculetina y dextrosa. La esculetina reacciona con el citrato férrico dando lugar a colonias marrón oscuro o negras. La tolerancia a la bilis y la habilidad de hidrolizar la esculina constituye un test seguro para la identificación presuntiva de enterococos. El color marrón alrededor de las colonias aparece después de 18-24 horas de incubación a la temperatura de 35.2 °C indicando una reacción positiva. La presencia de enterococos intestinales, es un indicador de contaminación fecal, especialmente cuando la contaminación se produjo mucho antes y las bacterias coliformes\_menos resistentes, incluyendo *Escherichia coli*, ya pueden estar muertas cuando se lleva a cabo el análisis. (Condalab, 2019). La presencia de extracto de carne y peptona de carne que aportan nutrientes para el desarrollo microbiano (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.13 La prueba de CAMP.** Sirve principalmente para determinar la capacidad de un microorganismo para producir una proteína conocida como factor CAMP. La proteína produce un efecto sinérgico con la  $\beta$ -hemolisina de *S. aureus* sobre eritrocitos ovinos y bovinos que se observa como un fenómeno lítico en la intersección de los dos microorganismos cuando se siembran en proximidad. Como alternativa se puede utilizar el CAMP inverso. En esta prueba la hemólisis producida por algunos microorganismos se inhibe por la  $\beta$ -hemolisina de *S. aureus* (por ejemplo, la producción de fosfolipasa D de *Arcanobacterium haemolyticum* o la fosfolipasa E de *Rhodococcus* spp.) (AF Olmos, 2011)

**4.2.14 Agar TSI.** Medio de cultivo empleado para la diferenciación de enterobacterias gram negativas, en base a la fermentación de los hidratos de carbono, glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico. En el medio, el extracto de carne y la pluripeptona, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico; el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones  $Fe^{3+}$  , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico para producir sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es



el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.15 Antibiograma.** Las pruebas de sensibilidad o antibiogramas permiten determinar el nivel de susceptibilidad o resistencia de un microorganismo frente a los medicamentos antimicrobianos, a partir de la exposición de una concentración estandarizada del agente infeccioso a los fármacos que se quieran evaluar. Las pruebas de sensibilidad pueden hacerse para bacterias, hongos o virus. Para algunos microorganismos, los resultados obtenidos con un fármaco permiten predecir los resultados que se obtendrán con fármacos similares, de esta forma, no todos los medicamentos potencialmente útiles necesitan probarse (Vazquez, M. 2020 para “Manual MSD”)

**4.2.16 Agar Salmonella shigella.** Medio de cultivo selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de Salmonella spp. y de algunas especies de Shigella spp. aisladas a partir de muestras de heces, alimentos y otros materiales en los cuales se sospeche su presencia. En el medio de cultivo la pluripeptona y el extracto de carne aportan los nutrientes para el desarrollo microbiano. Las sales biliares y el verde brillante inhiben el desarrollo de una gran variedad de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasor del Proteus spp. La lactosa es el hidrato de carbono fermentable. El tiosulfato de sodio permite la formación de SH<sub>2</sub> que se evidencia por la formación de sulfuro de hierro. El rojo neutro es el indicador de pH y el agar es el agente solidificante. Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo. Salmonella, Shigella y otros microorganismos no fermentadores de lactosa, crecen adecuadamente en el medio de cultivo, y producen colonias transparentes. La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro. Para aumentar la selectividad, se recomienda incubar previamente la muestra en caldo de Selenito (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.17 Agar EMB.** Este medio, también denominado E.A.M., es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae. El medio de cultivo combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos. Es nutritivo por la presencia de peptona que favorece el desarrollo microbiano. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está guiada por los indicadores eosina y azul de metileno, los cuales ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas. Muchas cepas de Escherichia coli y Citrobacter spp. presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras. También, pueden crecer

especies de *Candida* y se observan como colonias rosadas y puntiformes; la siembra en profundidad permite el desarrollo de clamidiosporas en *C. albicans*. *Enterococcus* spp. crece en este medio como colonias puntiformes y transparentes, mientras que *Acinetobacter* spp. y otras bacterias oxidativas se observan como colonias de color azul lavanda; esto puede ocurrir aunque las cepas no sean capaces de acidificar a partir de lactosa al 0.5% y ello se debe a la incorporación de azul de metileno a sus membranas. En este medio se obtiene también un buen desarrollo de especies de *Salmonella* y *Shigella* (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.18 Agar citrato de Simmons.** Medio utilizado para la diferenciación de enterobacterias en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía. En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono; estos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer y el magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira a color azul en medio alcalino. Este medio de cultivo es diferencial debido a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad. El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato genera progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces gracias a todas estas propiedades vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.19 Agar cetrimide.** Medio usado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y de otras especies del género. Su formulación permite el crecimiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y estimula la formación de pigmentos. Este es un medio muy semejante al King A, en el cual la peptona de gelatina aporta los nutrientes para el desarrollo microbiano. El cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína de *P. aeruginosa*. La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de *Pseudomonas* (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.20 Agar LIA.** Medio de cultivo utilizado para diferenciar microorganismos, especialmente *Salmonella* spp., basado en la descarboxilación, la desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico. La peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas descarboxilasa y deaminasa. El citrato de hierro y amonio y el tiosulfato de sodio son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El purpura de bromocresol, es el indicador de pH, en donde un color amarillo en el pH es igual o menor a 5.2 y violeta es igual a un pH igual o mayor a 6.8. Los microorganismos fermentadores de glucosa actúan acidificando el medio y provocan el viraje del color

púrpura a un color amarillo. El ambiente ácido favorece la actividad enzimática decarboxilasa, se metaboliza la lisina a cadaverina elevando el pH del medio de cultivo y lo torna a un color púrpura o violeta. Los microorganismos fermentadores de glucosa que no tienen actividad lisina decarboxilasa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al color amarillo. A las 24 horas de incubación se observa el fondo del tubo color amarillo y la superficie de color violeta debido al consumo de las peptonas que producen alcalinidad. La generación de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro. Las cepas de los géneros *Proteus*, *Providencia* y algunas de *Morganella*, desaminan la lisina. Esto produce un ácido alfa-ceto-carbónico, el cual con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno forma un color rojizo en la superficie del medio (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.21 Agar DNAsa.** Medio de cultivo utilizado para la detección de enzimas desoxirribonucleasas. Es especialmente útil para la diferenciación entre especies de estafilococos, así como para la diferenciación de *Serratia* spp. de especies de *Klebsiella* y *Enterobacter*. En el medio de cultivo, la tripteína es la fuente de nitrógeno, aminoácidos, y aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano. El ácido desoxirribonucleico (DNA), se encuentra en grado altamente polimerizado, y es el sustrato de la enzima desoxirribonucleasa (DNAsa), la cual lo hidroliza. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. Este medio de cultivo, permite diferenciar bacterias que poseen la enzima desoxirribonucleasa de aquellas que no la poseen. La presencia de la enzima, se puede detectar mediante el agregado de ácido clorhídrico 1N. El ácido desoxirribonucleico hidrolizado presenta transparencia, mientras que el ácido desoxirribonucleico polimerizado, precipita y torna opacidad al medio de cultivo (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.22 Agar SIM.** Medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno por los microorganismos. Es útil para diferenciar miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. La tripteína y la peptona aportan nutrientes para el desarrollo microbiano. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas y particularmente de la tripteína y puede ser metabolizado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasas. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Ehrlich o de Kovacs, para originar un compuesto de color rojo. A partir del tiosulfato de sodio los microorganismos pueden generar ácido sulfhídrico que reacciona con el hierro presente formándose un compuesto de color negro. El agar es el agente solidificante y a esta concentración le otorga al medio la propiedad de ser semisólido, condición necesaria para detectar movilidad, que se evidencia por la turbidez del medio o por crecimiento que expande más allá de la línea de siembra del microorganismo en estudio (Britania Lab.com, 2021).

**4.2.23 Caldo MR-VP.** Medio utilizado para la realización del ensayo de Rojo de Metilo y Voges Proskauer. En el medio de cultivo, la pluripeptona aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y la glucosa es el hidrato de carbono

fermentable. La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se originarán productos finales ácidos, ya sea ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, o productos finales neutros como acetil metil carbinol. La diferencia en el metabolismo bacteriano podría ser reconocida por la adición de un indicador como rojo de metilo, para revelar la presencia de productos ácidos, y por la adición de alfa naftol e hidróxido de potasio para evidenciar la presencia de productos finales neutros. Voges y Proskauer, describieron una coloración rojiza que aparecía después de adicionar hidróxido de potasio a los cultivos de ciertos microorganismos en medio con glucosa. Esta coloración se debe a la oxidación del acetil metil carbinol a diaceto el cual reacciona con la peptona del medio para dar un color rojo (Britania Lab.com, 2021).

### **4.3 TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EVALUAR SENSIBILIDAD**

**4.3.1 Microdilución en caldo.** La microdilución en caldo es el método de elección dentro de los métodos de dilución para estudiar la sensibilidad a antimicrobianos. Se emplea una placa de microtitulación en la que cada pozo equivale a un tubo específico de ensayo del método de macrodilución. El método está basado en la inhibición del crecimiento bacteriano en un medio líquido en la presencia de un tratamiento en progresión aritmética. Tradicionalmente estos métodos se han usado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antibióticos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antibiótico a evaluar en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio con las cepas bacterianas elegidas y tras la incubación, para permitir el crecimiento del microorganismo, se hace la lectura, determinando cual es la concentración que causa la inhibición esperada del crecimiento del microorganismo (R. Cantón, 2003).

La CMI será la concentración de antibiótico o tratamiento alternativo contenida en el primer pozo donde no se observa crecimiento bacteriano, es decir, sin presencia de turbidez. Si el microorganismo crece en todos los pozos, la CMI es superior a la mayor concentración de antimicrobiano estudiada. Si no crece en ningún pozo, la CMI es inferior a la menor concentración de antimicrobiano estudiada. La lectura de la placa se realizará mediante espectrofotometría. Se debe comparar el valor obtenido de la CMI con el estándar conocido para asignar la categoría interpretativa correspondiente. (Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009).

#### **4.3.2 Espectrofotometría.**

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución, basándose en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez en que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración (NA. Diaz, 2006). Es uno de los métodos de análisis óptico usado en investigaciones utilizando un instrumento llamado espectrofotómetro, que ayuda a comparar la radiación absorbida o

transmitida por una solución que contienen una cantidad de soluto desconocida junto con una cantidad conocida de la misma sustancia. La absorción de las radiaciones ultravioleta, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química. Cuando la luz atraviesa una sustancia, parte de la energía es absorbida; la energía radiante no puede producir ningún efecto sin ser absorbida. El color de las sustancias se debe a que éstas absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y solo dejan pasar a nuestros ojos aquellas longitudes de onda no absorbidas.

#### **4.3.3 Recuento bacteriano**

El recuento bacteriano es un métodos utilizado para determinar el número de microorganismos viables en un medio líquido, cuando las concentraciones son bajas a través de un medio de cultivo en placa de petri; los microorganismos retenidos en la membrana se desarrollan formando colonias, permitiendo su cuantificación. (Ramírez S Julián A, 2018)

### **4.4 PROPÓLEO**

**4.4.1 Definición.** Es una sustancia producida por las abejas *Apis mellifera* a partir de resinas y bálsamos de procedencia vegetal y de consistencia glutinosa (Vásquez R, et al,2012). Las abejas añaden secreciones salivares, cera y polen para la elaborar el propóleo como producto final. Ellas prefieren las horas más calientes del día para recolectar las resinas porque éstas son más maleables, lo que facilita su recolección. (López G, 2011). Las abejas lo recolectan raspándolo con las mandíbulas y con las patas lo manipulan hasta formar pequeñas esferas que ponen en las corbículas. Lo utilizan como antibiótico natural, para protegerse de bacterias, virus y hongos, y para mantener limpia la colmena.(Vásquez R, et al,2012).

**4.4.2 Propiedades físicas.** Aspecto es de una masa oscura, resinosa y sólida, insoluble en agua, pero soluble en éter, acetona, benceno y tricloroetileno. Su densidad es de 1.127 g/cc y su punto de solidificación 15 °C. (Vásquez R, et al,2012).

#### **4.4.3 Composición química.**

La composición es muy compleja, los porcentajes varían según el tipo de planta de donde se colecta, la época del año y la región geográfica. Básicamente se compone de resinas y bálsamos aromáticos, de cera de abeja, de aceites esenciales o volátiles, de polen, de materiales diversos. (López G, 2011).

Se han identificado más de 160 compuestos, una gran parte son compuestos fenólicos, a los que se les atribuye la acción farmacológica. Los principales fenoles identificados son los flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres, aldehídos aromáticos, cumarinas, triglicéridos fenólicos.

Se identifica otro grupo de compuestos y elementos minerales que se encuentran en cantidades que casi no se perciben, pero que son de fundamental importancia en la

actividad biológica del propóleo y en el metabolismo celular; entre estos se destaca la provitamina A y algunas vitaminas del complejo B, especialmente la vitamina B3 o nicotinamida, además de lactonas, polisacáridos, aminoácidos y otras sustancias aún no reconocidas. (López G, 2011).

#### **4.4.4 Recolección y almacenamiento.**

Se inicia con un sistema de colecta por raspado en donde se extraen las resinas de todas las partes de la colmena donde las abejas han depositado propóleo utilizando una espátula. Es de tener en cuenta que la calidad de este propóleo es baja por presentar alta contaminación con polvo y otros materiales extraños presentes en el ambiente como madera y pintura. Otra alternativa de recolección es usando las trampas recolectoras consisten en un marco de madera que contiene una malla dispuesta de tal manera que las abejas van rellenoando con propóleo el espacio que se va abriendo. Al igual que el raspado, este método presenta desventajas por contaminación.

Al momento de recoger el producto se debe evitar hacer grandes bolas de Propóleo ya que de esta forma se hace más difícil su manipulación y pierde la calidad. Una vez cosechado, este debe ser guardado en envases que lo protejan de los gases, polvo, contacto con el aire, insectos, humedad del ambiente y del sol. Por todo esto es importante almacenarlo en frascos de vidrio de color ámbar con una temperatura ideal para su conservación de 15° C, para evitar pérdidas de los componentes volátiles que contribuyen a sus propiedades (López G, 2011).

#### **4.4.5 Usos y aplicaciones**

Se ha reportado que puede ser utilizado como antibacteriano y anticariogénico, bacteriostático contra *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *E. Coli* y *Ps. Aeruginosa*; Antiviral, antifúngico y anti-levaduras; ayuda a las úlceras tanto en piel como en el tracto digestivo, además es inmunoestimulante, broncodilatador, antiinflamatorio, analgésico, relajante sobre el músculo liso, cicatrizante en quemaduras y lesiones de la piel y antitumoral (Vásquez R, et al,2012). Se conoce que ha sido empleado en el tratamiento de enfermedades oculares con efectividad en el hombre y los animales. (Giral T., 2007)

**4.4.6 Extracto etanólico de propóleo.** Los extractos etanólicos de propóleo tienen una actividad antibacteriana significativamente mayor que los extractos acuosos, y esta actividad depende de su procedencia y de la especie bacteriana evaluada. (Carrillo M, 2011)

### **4.5 LISOZIMA**

**4.5.1 Definición.** La lisozima fue descubierta en 1922 por Alexander Fleming, quien también descubrió la penicilina. La lisozima, también llamada muramidasa, es una enzima de 14,4 kilodalton que daña las células bacterianas catalizando la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano. La lisozima se encuentra en muchos organismos como virus, insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, produciéndose en multitud de tejidos y fluidos, incluyendo huevos de aves, leche humana, lágrimas, saliva y es además secretada por leucocitos polimorfonucleares (Niyonsaba y Ogawa, 2005).

**4.5.2 Usos y aplicaciones.** La lisozima ha sido usada en la profilaxis y tratamiento de infecciones bucofaríngeas para estimular las reacciones del organismo y como apoyo en la acción de antibióticos o quimioterápicos. Se ha utilizado en la industria alimenticia como aditivo en productos cárnicos, lácteos y vinos evitando el crecimiento bacteriano en los mismos. Otros reportes indican su aplicación sobre algunas bacterias y también hongos, afectando el proceso de gemación, entre estos se incluyen *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Candida parapsilosis* y *C. albicans* (Woods et al., 2011). La lisozima es capaz de romper los enlaces químicos en la pared celular externa de la bacteria la cual contiene una capa de peptidoglicano, compuesto significativo en bacterias que pertenecen al grupo de las gram positivas (Phillips, 1967)

**4.5.3 Mecanismo de acción.** La capa de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias contiene moléculas alternas llamadas N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, las cuales forman una fuerte cadena de glicano que actúa como sostén de la pared celular. La lisozima divide el enlace entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico y, una vez que esta cadena se rompe, se produce la muerte bacteriana. En una bacteria Gram positiva, esta capa de peptidoglicano está en la superficie más externa de la célula. Sin embargo, en una bacteria Gram negativa, la capa de peptidoglicano de la pared celular se localiza hacia el interior, razón por la que la lisozima pura puede destruir más fácilmente las bacterias Gram positivas que las bacterias Gram negativas. Sin embargo, al modificarla adecuadamente la lisozima utilizada en un producto para problemas dermatológicos en animales, tiene el mismo efecto bactericida sobre Gram positivos y Gram negativos, además de ofrecer un alto efecto cicatrizante, antiinflamatorio y regenerador de la piel. (Jglobal, 2013).

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 VARIABLES A OBSERVAR

- **Tipo de Estudio: Cuasiexperimental.** En este tipo de estudio, el investigador ya tiene la hipótesis de trabajo que pretende comprobar; además, conoce y

controla una serie de variables que tienen relación con la hipótesis y que le servirán para explicar el fenómeno.

- **Población y Muestra:** En este estudio se utilizaron 74 cepas bacterianas aisladas de muestras de leche que se tomaron en distintas fincas localizadas en la sabana de Bogotá. Los animales seleccionados para las pruebas presentaban signos de mastitis y la prueba de CMT positiva.

#### **5.1.1 Criterios de inclusión**

- Hembras en periodo de lactancia
- Hembras con signos clínicos de mastitis
- Hembras con prueba CMT positiva de > 2

#### **5.1.2 Criterios de exclusión**

- Terneras
- Novillas
- Vacas viejas o fuera de producción
- Hembras presentes en el horro

#### **5.1.3 Variables**

**5.1.3.1 Variable dependiente:** Concentración Mínima Inhibitoria para cada una de las especies de bacterias de la mastitis aisladas a nivel de campo.

**5.1.3.2 Variable independiente:** Efecto del extracto de propóleo y la lisozima sobre el crecimiento bacteriano, teniendo en cuenta la variedad de concentraciones para cada uno, y comparando su acción con un grupo control (sin propóleo y lisozima) y con un grupo tratado con antibiótico convencional.

### **5.2 HIPÓTESIS GENERAL DEL TRABAJO**

Se espera que los tratamientos alternativos a evaluar (Extracto de propóleo y Lisozima) tengan cierto nivel de inhibición, ya sea igualando o superando el efecto inhibitorio ejercido por los antibióticos de uso frecuente en el tratamiento de la mastitis bovina.

### **5.3 SELECCIÓN DE MUESTRAS**

Se seleccionaron muestras de leche que al ser cultivadas en agar sangre como medio nutritivo mostraron crecimiento de una o más cepas bacterianas, indicando así la



presencia de contaminación en las mismas y relacionándolas con la prueba CMT para determinar la presencia de la enfermedad.

## **5.4. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO**

### **5.4.1. Procesamiento de las muestras de leche**

Después de colectadas las muestras en campo, se procede a llevarlas al laboratorio para iniciar el aislamiento y caracterización de los patógenos presentes en las mismas, para esto se inicia con una siembra masiva de la muestra en Agar base sangre, introduciendo un hisopo estéril en cada uno y pasándolo a la caja de petri con el agar, para posteriormente poner todas las muestras debidamente marcadas a incubar, con una temperatura de 37°C durante 24 horas.

Pasadas 24 horas, se debe observar la cantidad de colonias en cada caja, ya que normalmente suele haber más de un tipo de bacteria en cada muestra.

**5.4.1.1 Aislamiento e identificación de colonias.** De acuerdo a sus características morfológicas se empiezan a identificar y separar las distintas colonias tomando una pequeña cantidad de cada una con un asa estéril y sembrando en una nueva caja con agar sangre, esto con el fin de purificar cada colonia aislada para iniciar con su caracterización. En este proceso se realizan todas las pruebas ya mencionadas en el orden que el bacteriólogo o el investigador considere según se vayan dando los resultados, ya que a medida que cada cepa se expone a los distintos agares de cultivo y pruebas complementarias se obtienen nuevos datos de las mismas, acercándose así a la posible identidad de las especies aisladas.

### **5.4.2. Elaboración del extracto de propóleos**

Los propóleos que se utilizaron fueron obtenidos principalmente de colmenas ubicadas en el apiario de Usme en donde las principales fuentes de resina para la elaboración de propóleos son los árboles de la zona. Estos propóleos son puros, libres de tierra, trozos de madera y los residuos macroscópicos; también fueron debidamente caracterizados para saber exactamente sus propiedades. Para la elaboración del Extracto Etanólico de propóleos al 70% se utilizaron 100 gramos de propóleo, 500 ml de etanol al 96% y 250ml de agua destilada estéril para pasar el etanol a una concentración de 70%.

Para la preparación del extracto de propóleo inicialmente las muestras se maceran en un molino de café. Es importante pesar el propóleo seco antes de hacer la preparación en una gramera. Se toman 4,5 g de propóleo que serán disueltos en 15 ml de etanol al 70%, para luego distribuir en frascos con tapa bien protegidos de la luz, una mezcla entre el propóleo seco y el etanol diluido al 70%, tapar bien y dejar 24 horas con agitación constante cada hora. Pasadas las 24 horas, sacar la mezcla de propóleo más etanol y filtrar en un embudo con papel filtro para obtener el peso seco (mg/ml). Recoger extracto etanólico final y almacenarlo en frascos ámbar más pequeños debidamente marcados para someterlos a evaporación en un rotavapor, reconstruirlos en agua destilada estéril y ser usados posteriormente.

Se realizaron pruebas de susceptibilidad con los extractos de propóleo y antibióticos a manera de control. Para determinar la sensibilidad y resistencia de las bacterias ante antibióticos (Gentamicina y Amoxicilina) se realizará mediante la prueba de

difusión en disco en agar Müller-Hinton (CLSI, 2007).

#### **5.4.3.Elaboración de Lisozima**

La lisozima será utilizada a una concentración de 20 mg/ml, SIGMA lysozyme from chicken egg white; tomada desde su presentación comercial en polvo y transformada a un estado líquido, siendo diluida en agua destilada esteril y alicuotando la misma para garantizar su inocuidad en cada montaje.

#### **5.4.4 Pruebas de sensibilidad *in vitro***

Para la evaluación *in vitro* de los tratamientos se hicieron montajes mediante la técnica de microdilución en placa, organizado como se observa en la figura 2 y 3, siendo 8,2 mg/ml la concentración más alta del extracto de propóleo y 10 mg/ml la de lisozima, con diluciones  $\frac{1}{2}$  realizando 3 diluciones en el caldo de cultivo. Se manejó una proporción 50/50 con un volumen total por pozo de 120 uL, es decir, 60 uL del tratamiento y 60 uL de la bacteria seleccionada cultivada en caldo nutritivo. Se incluyeron los respectivos controles para asegurar la validez de estos resultados, siendo el control positivo únicamente el caldo con la bacteria, el control negativo la bacteria más un antibiótico que haga efecto, en este caso la gentamicina y un control del caldo más los tratamientos y los solventes utilizados para la preparación de los mismos con el fin de corroborar que no haya presencia de ningún tipo de contaminación en los mismos . Se manejó además una mezcla de ambos tratamientos para observar si se potenciaba o inhibía su efecto. A manera confirmatoria se realizó una siembra masiva del contenido de los pozos en cajas de petri con agar nutritivo para recuento bacteriano, identificando si la acción de los tratamientos era más de tipo bactericida o bacteriostática.

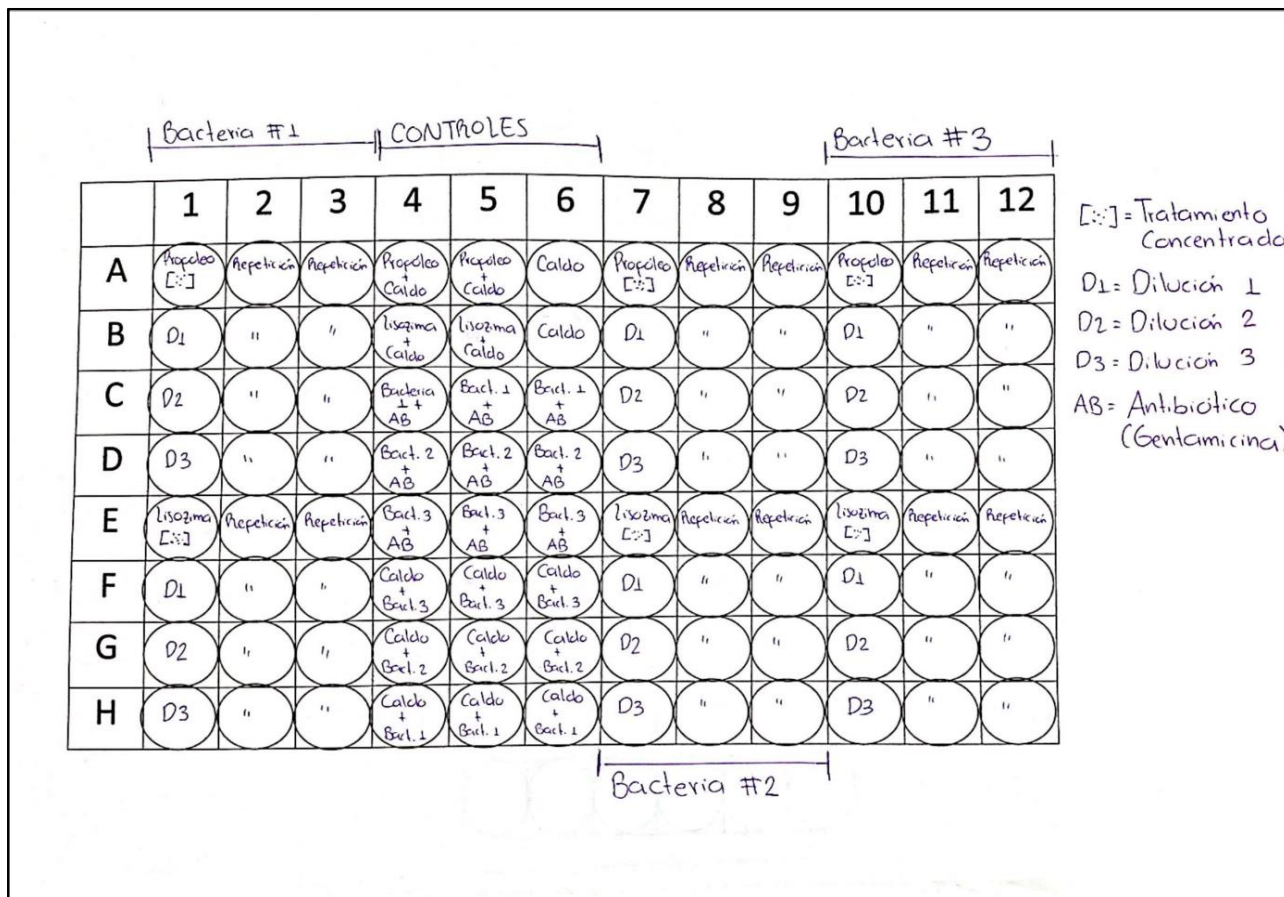


Figura 2. Mapa guía para el montaje de cada placa

Antes de la inoculación, las cepas aisladas fueron transferidas a caldo nutritivo e incubadas a 37°C. Todas las cepas se cultivaron bajo las mismas condiciones. Las suspensiones bacterianas se manejaron y guardaron en medio agar sangre, y también fueron criopreservadas en medio de congelación preparado con caldo LB y glicerol esteril. Se ajustó la densidad bacteriana de todos los cultivos para ensayo a una concentración de 2 según la escala de Mc Farland. Los resultados fueron leídos usando un lector de microplacas.

Después de realizar la lectura de las placas, se trasladaron a mayor escala las muestras de los pozos sembrando su contenido en cajas con agar nutritivo, esto con el fin de corroborar la presencia o ausencia de algún crecimiento bacteriano y de esta manera al compararse con los resultados en el lector, determinar si la información coincide y el posible efecto que pueden tener los tratamientos sobre las bacterias, ya que si se observa una disminución en la densidad de los pozos pero hay crecimiento de colonias en el agar, se puede sospechar de una posible acción bacteriostática, pero si por el contrario ambas pruebas muestran un crecimiento negativo, es posible que el tratamiento evaluado este generando un efecto de tipo bactericida.

La Concentración Mínima Inhibitoria se define como la más baja concentración de extracto de propóleo y Lisozima que inhibe el crecimiento bacteriano comparado con el control positivo.

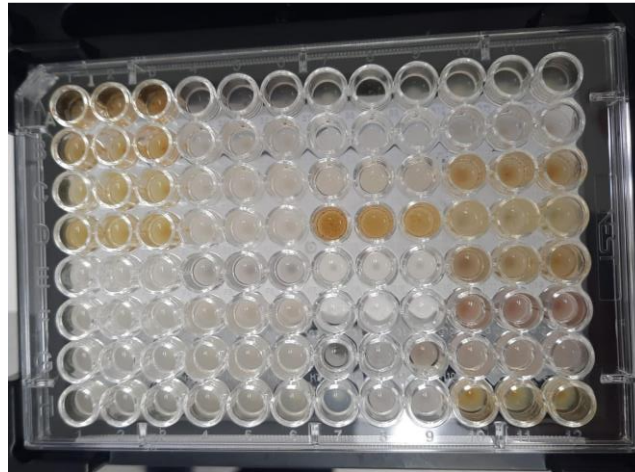


Figura 3. Placa de ELISA con una cepa bacteriana expuesta a distintas concentraciones de propóleo y lisozima.

### 5.4.5 Antibiograma

El antibiograma es una prueba de laboratorio de microbiología para analizar la sensibilidad de los microorganismos a uno o varios antibióticos. Se realizó mediante la técnica de Kirby Bauer utilizando discos impregnados de distintos antibióticos a cierta concentración con el fin de determinar el nivel de resistencia o susceptibilidad de una cepa en específico; esto se evaluaba mediante la medición de halos de inhibición que se creaban alrededor de cada disco de antibiótico, como se observa en la figura 3. En este trabajo se expusieron y evaluaron 71 cepas bacterianas a distintos antibióticos seleccionados según el gram de cada una, siendo usados en el caso de las gram positivas Penicilina, Amoxicilina, Gentamicina, Eritromicina, Trimetoprim, Nitrofurantoina, Tetraciclina y Clindamicina; para las gram negativas fueron utilizados antibióticos como la Tobramicina, Tetraciclina, Ceftazidime, Amikacina, Imipenem, Ceftriaxona, Ampicilina, entre otros. Estas pruebas se efectuaron con el fin de identificar los antibióticos con mayor efecto sobre las cepas para ser utilizadas como control negativo en los montajes de microdilución en placa.

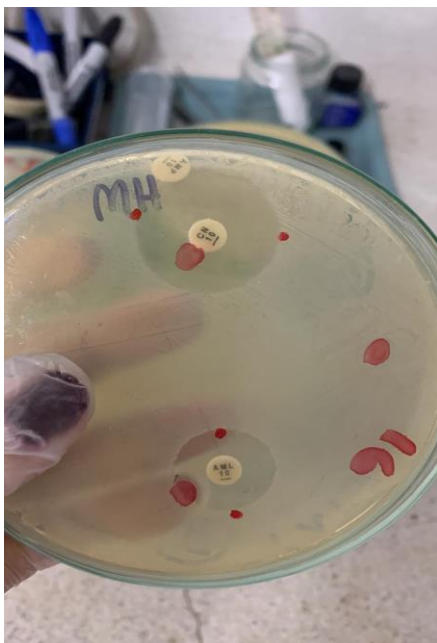
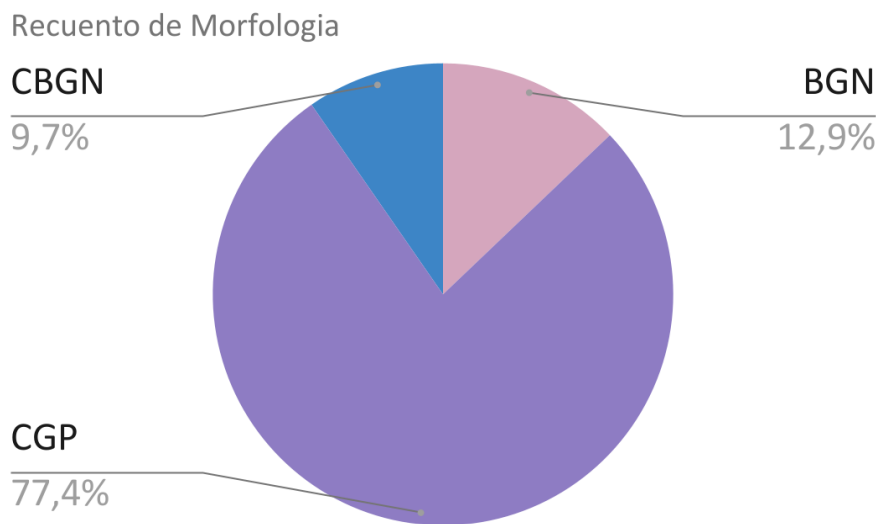


Figura 4. Antibiograma montado para una de las cepas bacterianas aisladas donde se observan halos de inhibición para dos tipos de antibióticos.

## 6. RESULTADOS

Un total de 71 cepas bacterianas se aislaron de las cuales 63 fueron cocos gram positivos (CGP), 4 bacilos gram negativos (BGN) y 4 cocobacilos gram negativos (CBGN), como se muestra en la figura 2; del total de cepas aisladas se lograron exponer 25 a pruebas de sensibilidad, siendo 20 CGP, 2 BGN y 3 CBGN (Figura 3); 18 de las cepas aisladas totales mostraron ser resistentes a más de dos antibióticos de uso comercial para el tratamiento de mastitis bovina, sin embargo solo fueron expuestas a pruebas de sensibilidad 15 de ellas, señalizadas con una celda de color verde (Figura 3). Se evaluaron además las cepas ATCC *Staphylococcus aureus* 29213, *Streptococcus uberis* 700403, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 y *Escherichia coli* 26922 para un total de 31 cepas bacterianas sometidas a pruebas de sensibilidad *in vitro*.



**Figura 5. Morfología bacteriana.** En este gráfico se observa la morfología correspondiente a las bacterias elavuadas coco gram positivos 77,4%, bacilos gram negativos 12,9%, cocobacilo gram negativo 9,7%.

# Bacteria	Morfología
9	BGN
19	CGP
32	CGP
33	CGP
37	CGP
44	CGP
53	CGP
66	CGP
<i>S. aureus</i> (51)	CGP
<i>S. uberis</i>	CGP
51	CGP
13	CGP
16	BGN
34	CBGN
3	CGP
4	CGP
5	CBGN
6	CGP
8	CGP
25	CGP
26	CGP
28	CGP
35	CBGN
38	CGP
52	CGP
63	CGP
65	CGP
70	CGP
<i>E. coli</i>	BGN
<i>P. aeruginosa</i>	BGN
<i>S. aureus</i> (53)	CGP

Figura 6. Bacterias sometidas a pruebas de sensibilidad *in vitro*, cepas ATCC, número de bacterias, clasificación de coco gram positivos, cocobacilos gram positivo, bacilos gram negativos.

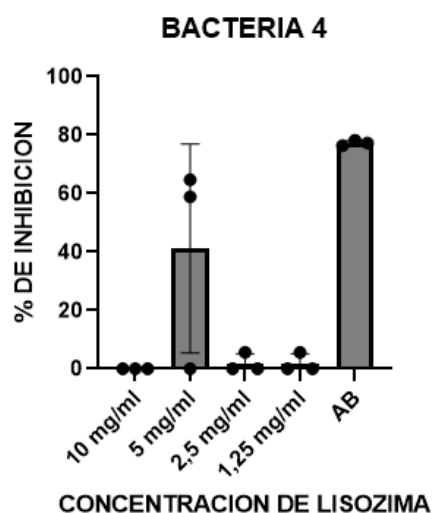
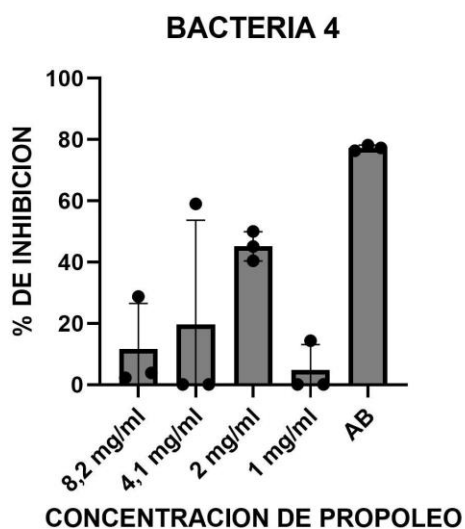
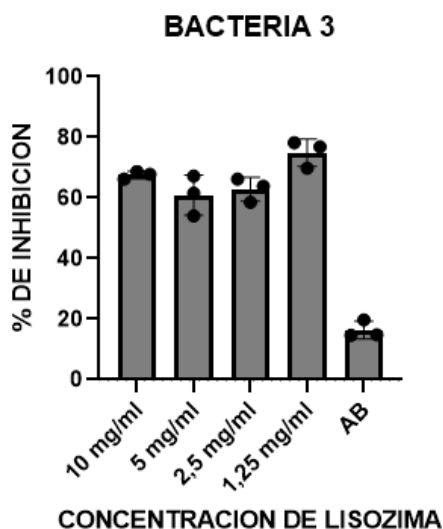
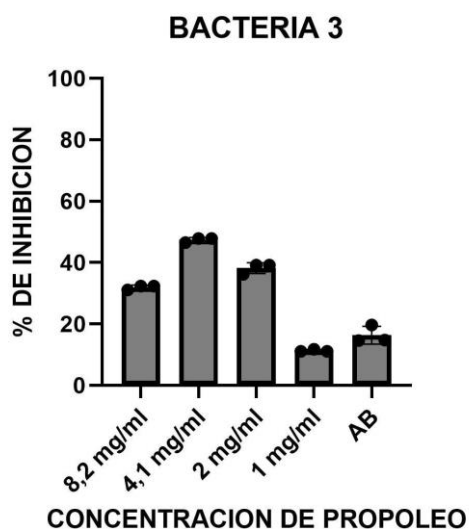
Se realizaron en total 11 montajes, pero fueron viables únicamente 4 de ellos, en donde se modificó el propóleo para poder ser leído por el espectrofotómetro. Para el propóleo se obtuvo una concentración inhibitoria 50% (CI50) de 6,79 mg/ml, mientras que para la Lisozima la CI50 fue de 5,43 mg/ml (Figura 4).

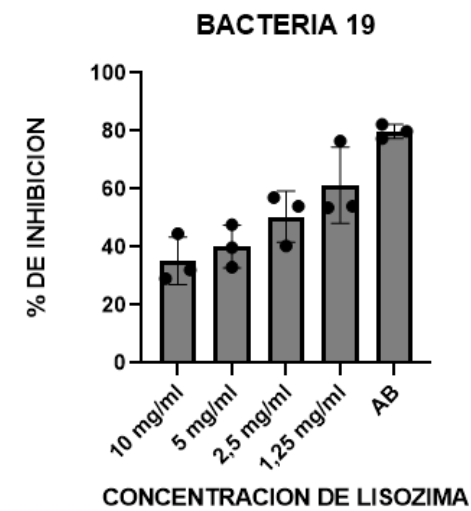
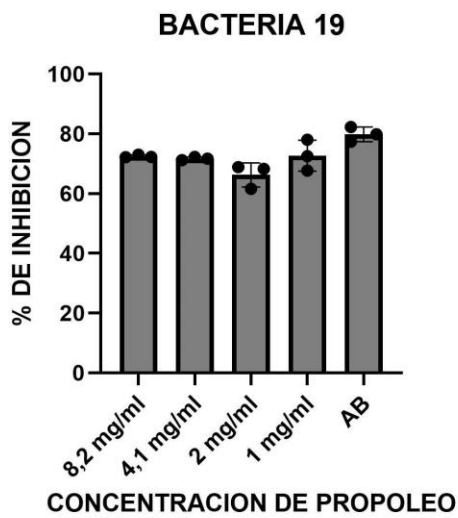
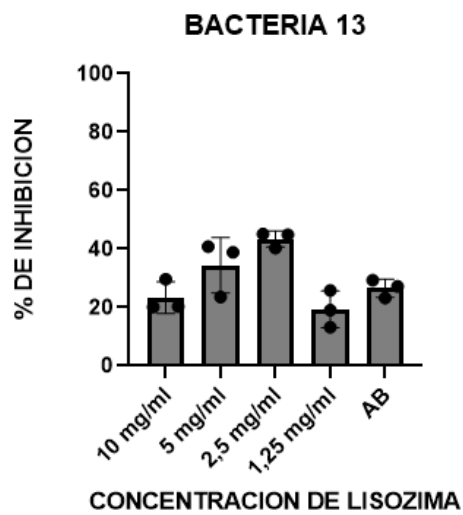
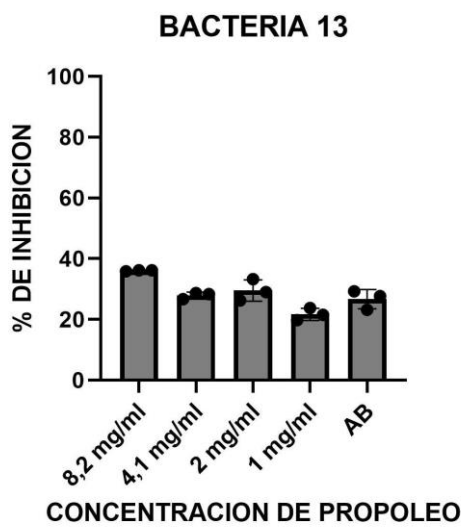
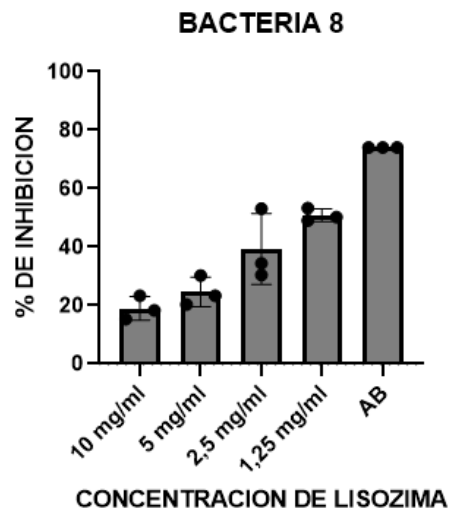
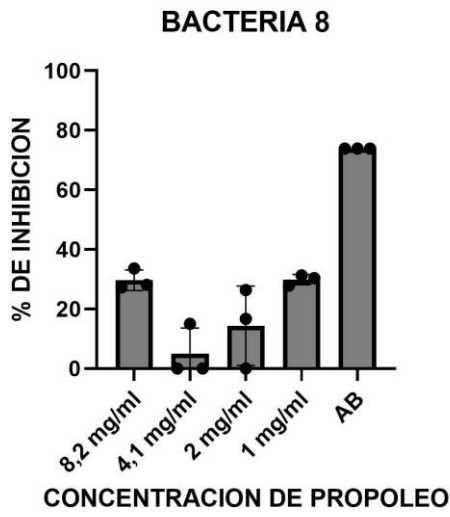
TRATAMIENTO	CI50 (Promedio)	INTERVALO DE CONFIANZA (IC)
PROPÓLEO	6,79 mg/ml	IC: 1,314-45,95
LISOZIMA	5,45 mg/ml	IC: 1,017-40,14

Figura 7. CI 50 e Intervalo de confianza propóleo y lisozima; concentración inhibitoria 50, resultados basados en el programa Graphpad Prism.

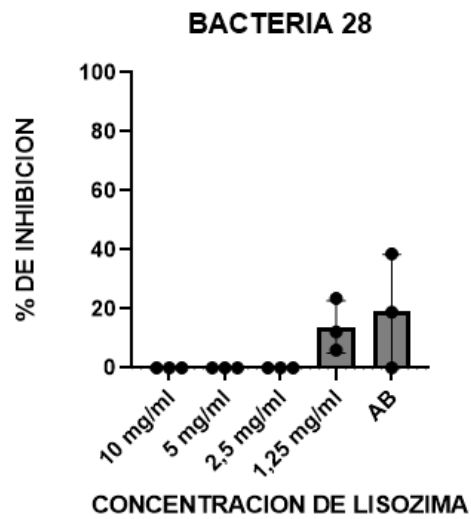
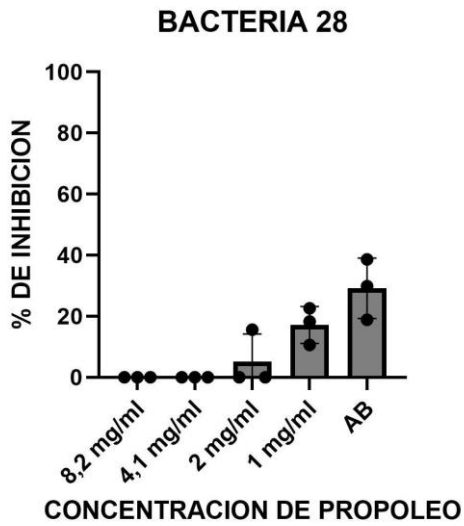
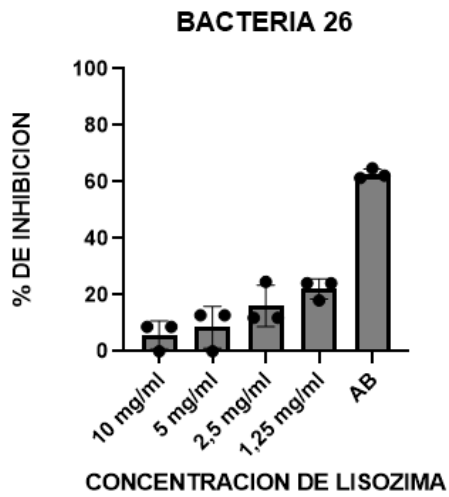
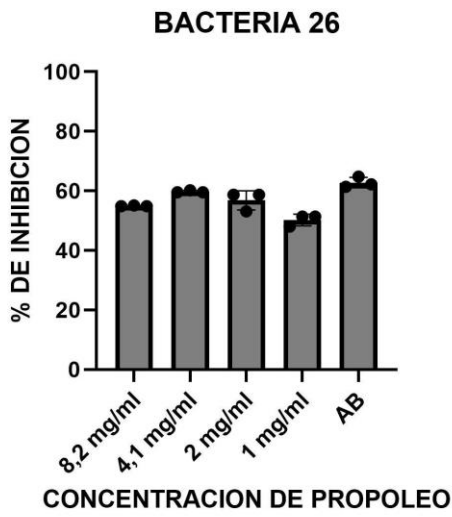
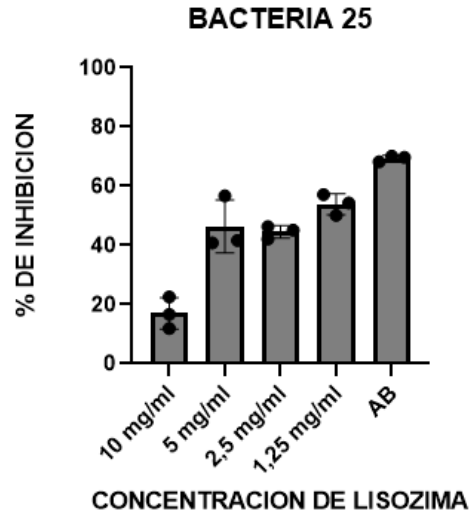
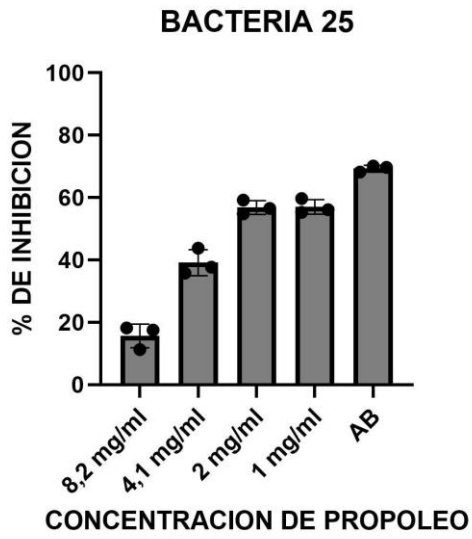
Los resultados fueron graficados para cada cepa con ambos tratamientos a probar, incluyendo el respectivo control con antibiótico de uso frecuente que en este caso fue la gentamicina a 8 mg/ml, agrupándolos según la morfología bacteriana; para evaluar el efecto inhibitorio se tuvieron en cuenta únicamente porcentajes iguales o superiores al 50%.

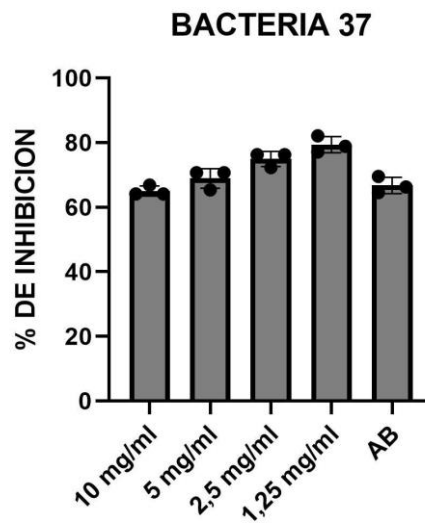
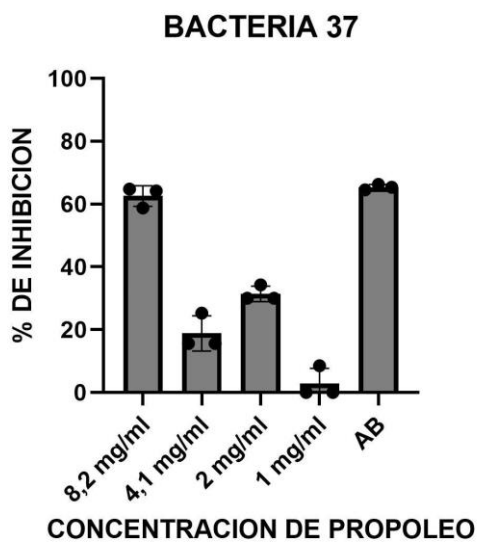
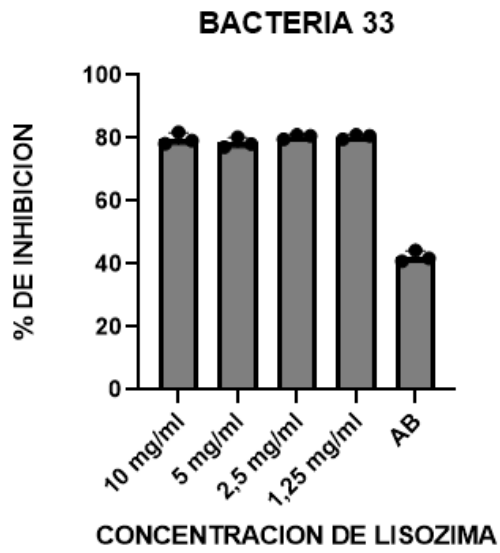
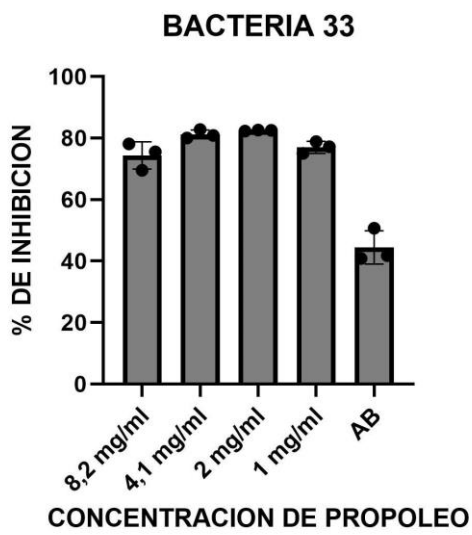
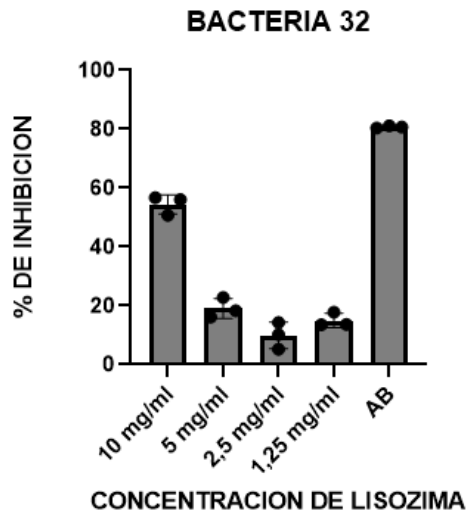
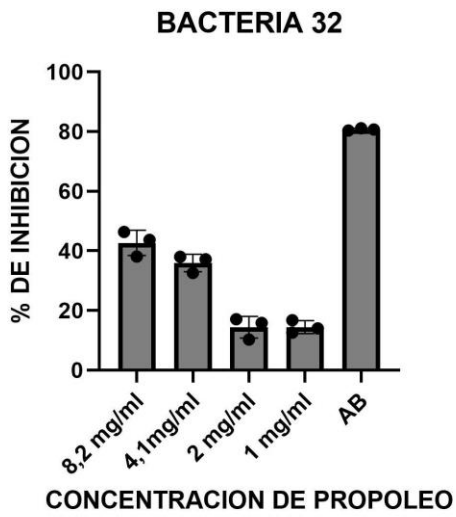
- **COCOS GRAM POSITIVOS**



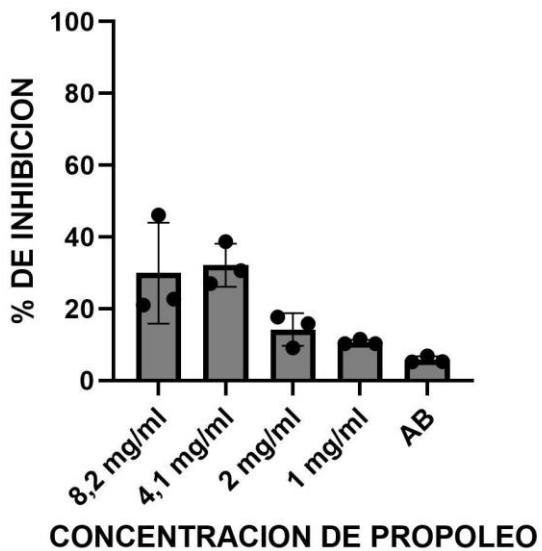




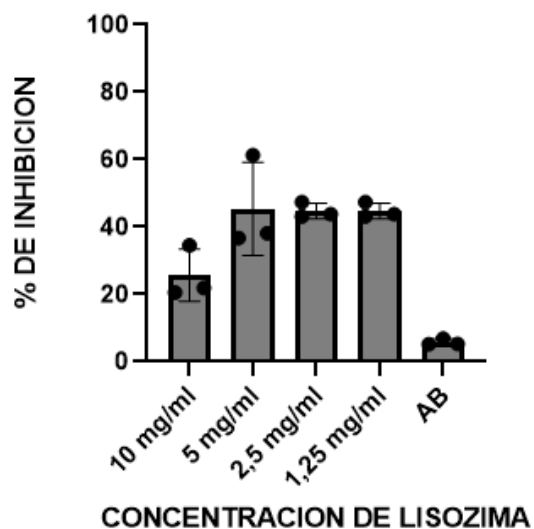




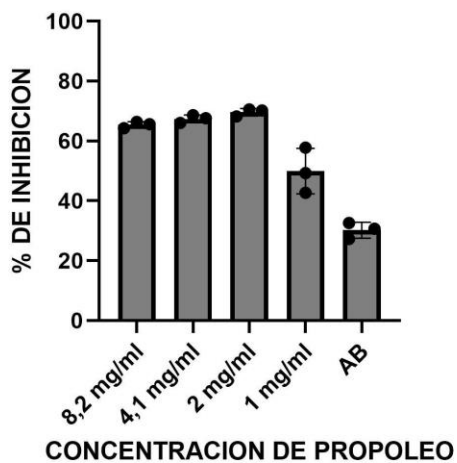
### BACTERIA 38



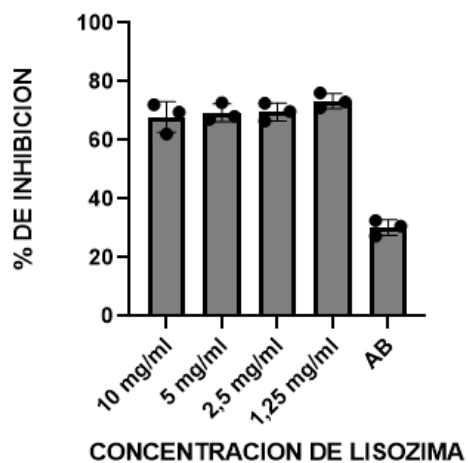
### BACTERIA 38



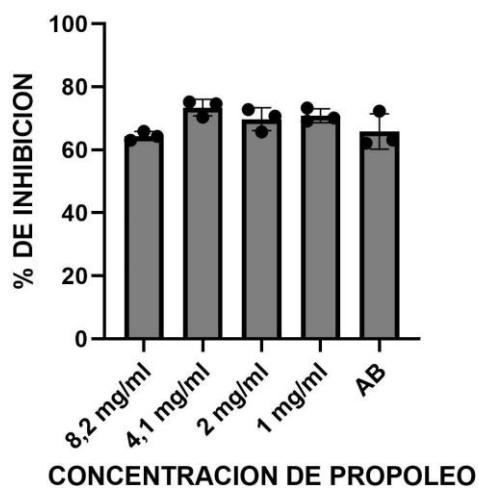
### BACTERIA 44



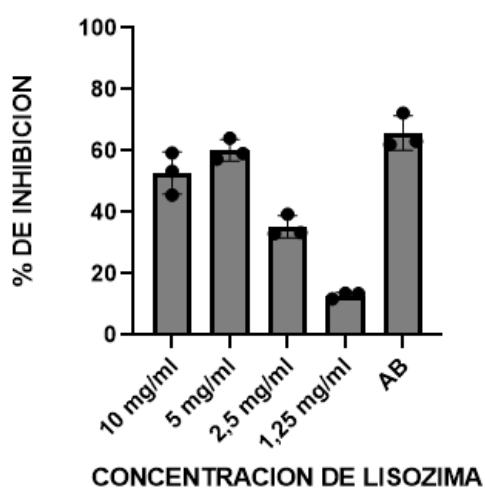
### BACTERIA 44

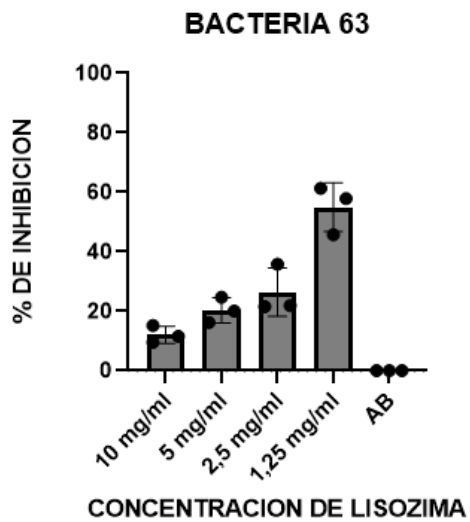
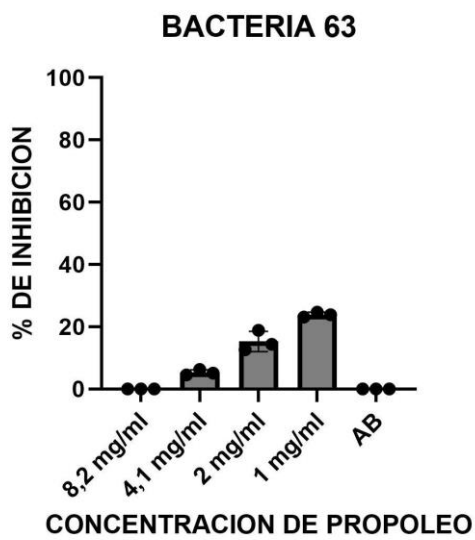
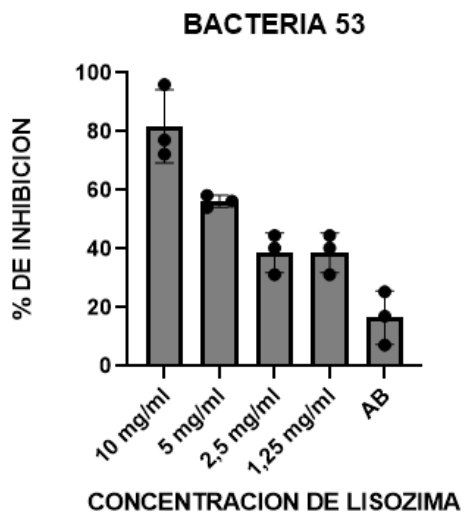
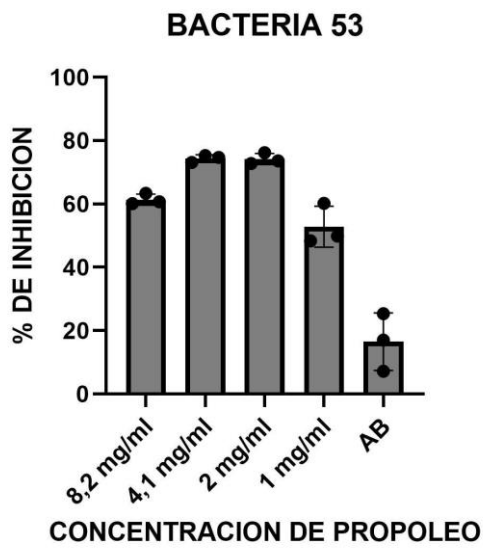
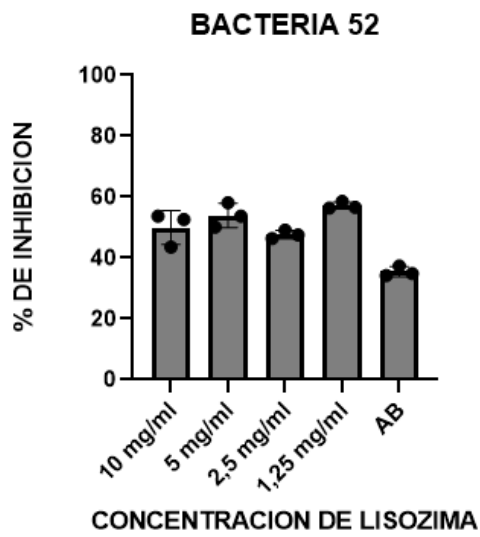
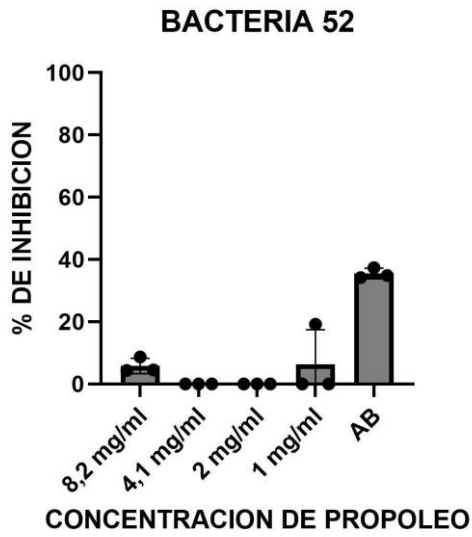


### BACTERIA 51

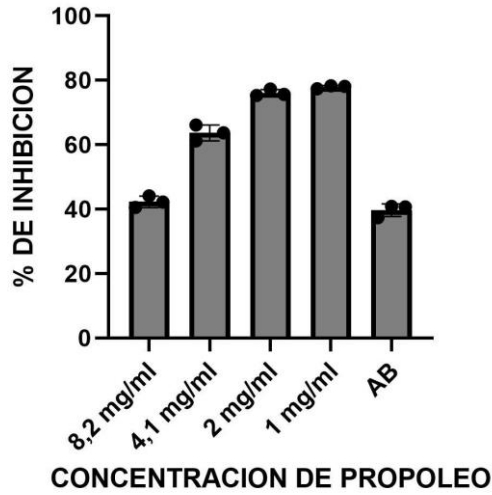


### BACTERIA 51

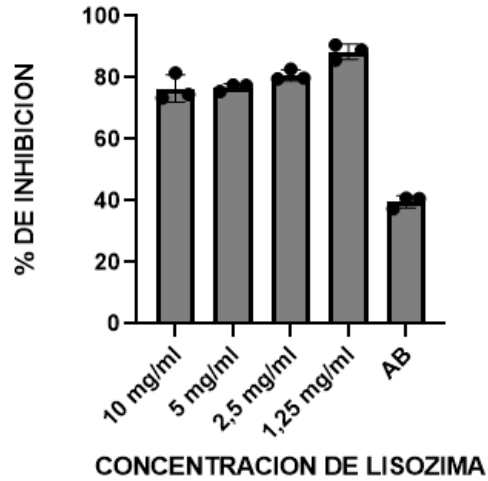




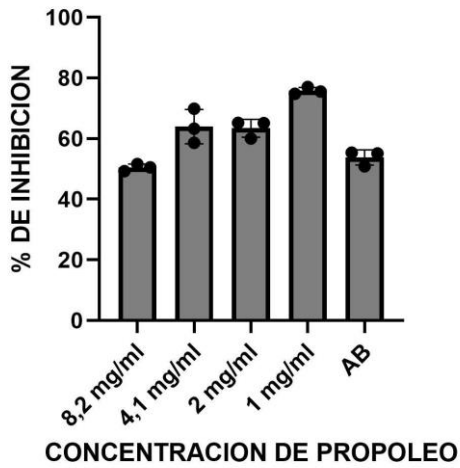
### BACTERIA 65



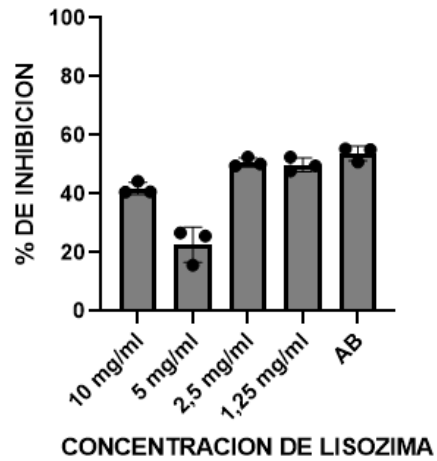
### BACTERIA 65



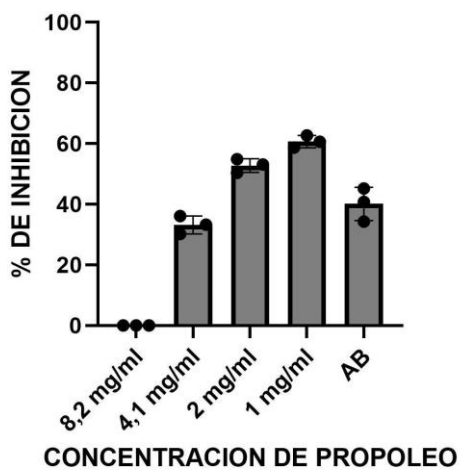
### BACTERIA 66



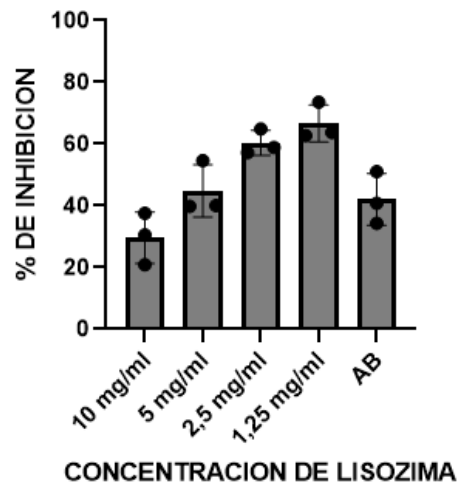
### BACTERIA 66

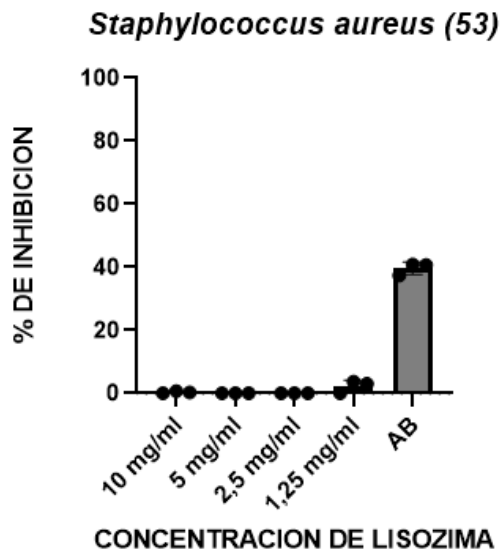
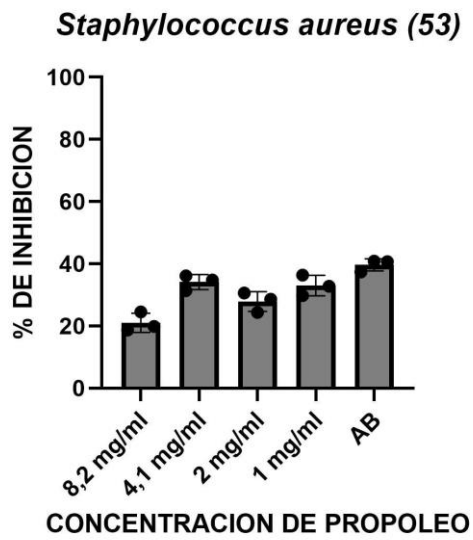
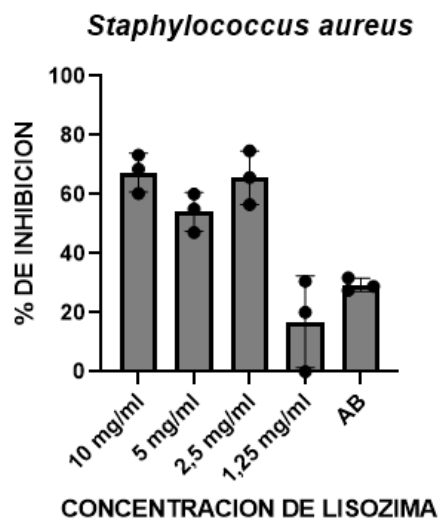
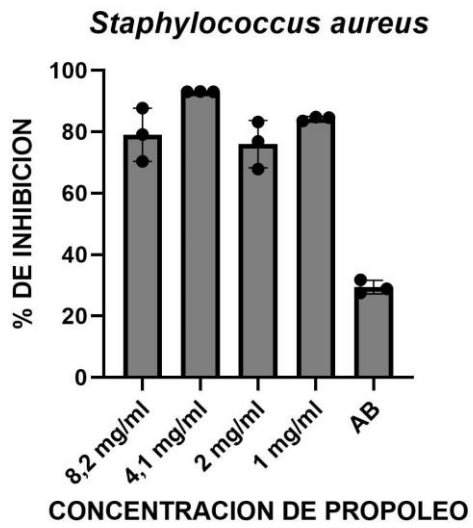


### BACTERIA 70



### BACTERIA 70





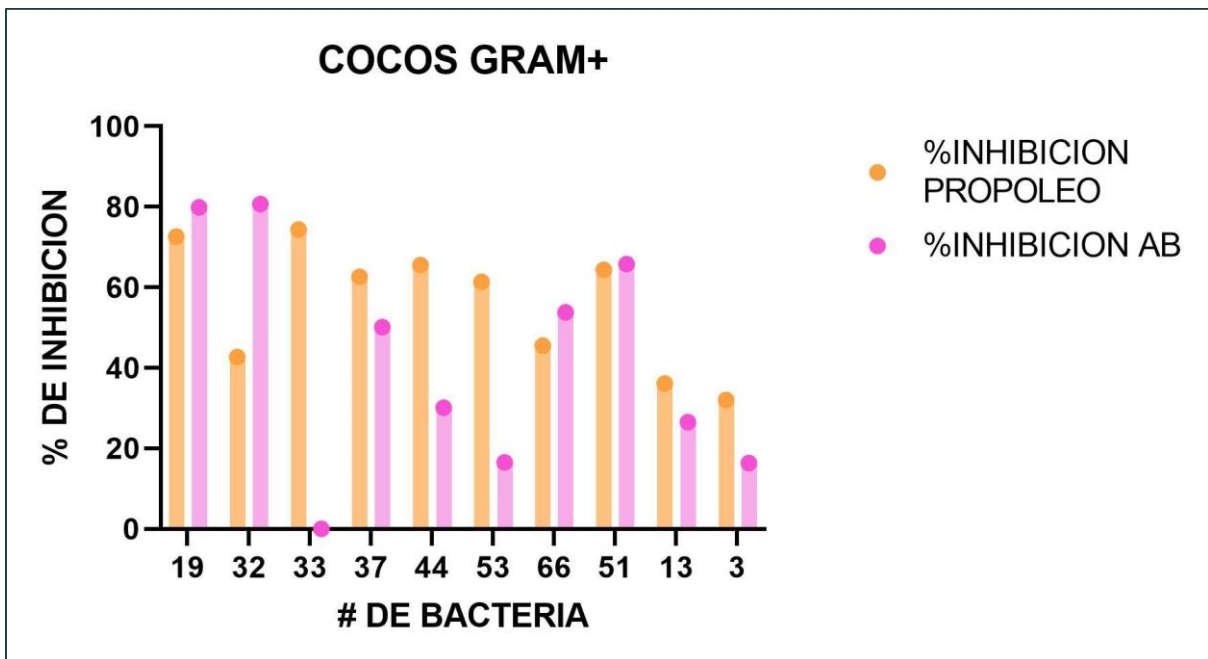
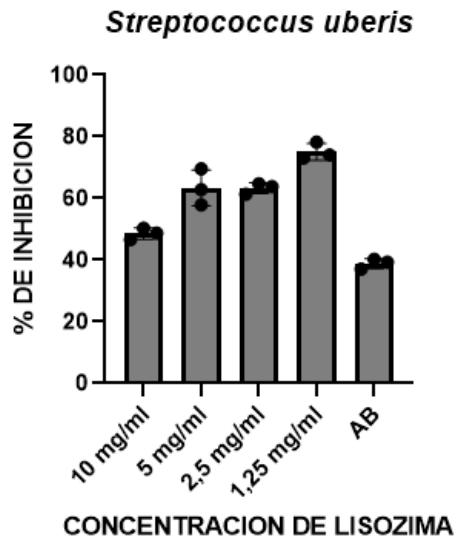
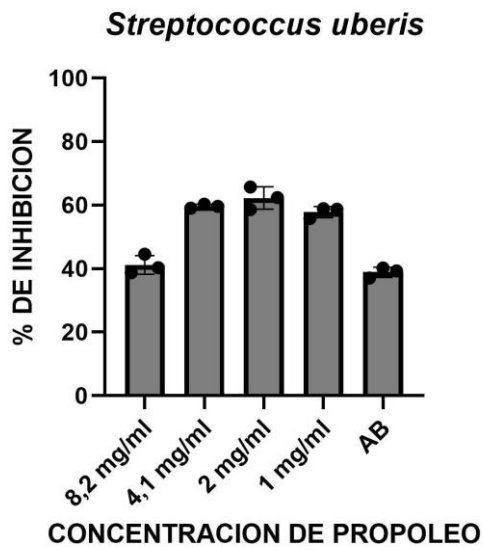


Figura 8. Bacterias sometidas a tratamiento propóleo y antibiótico.

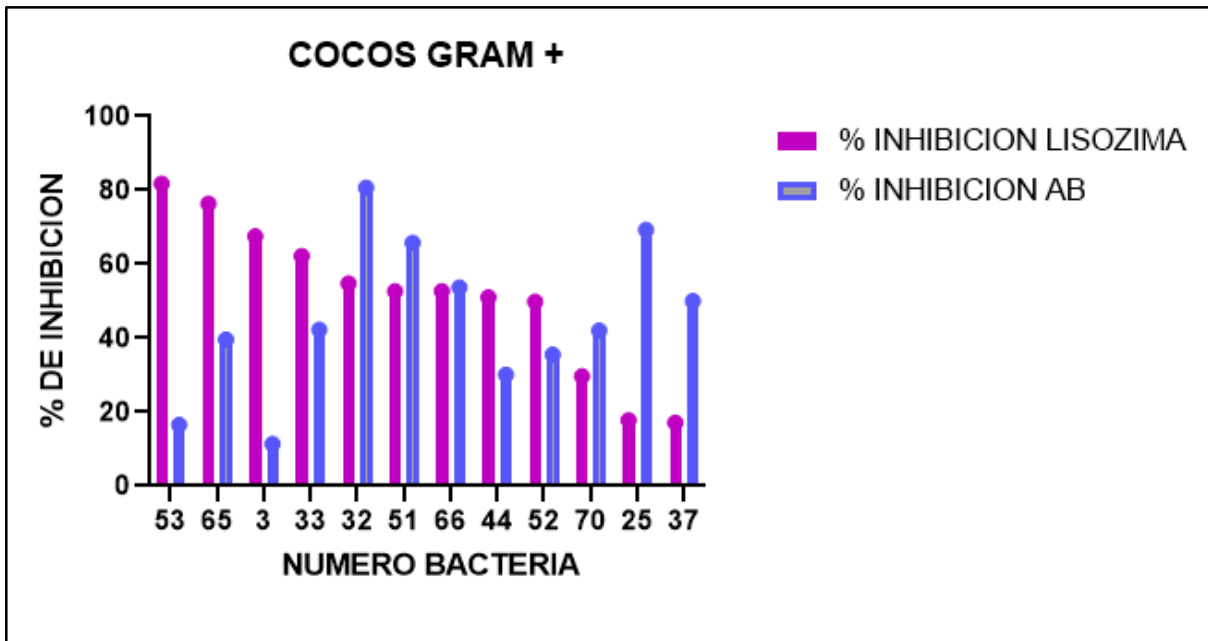
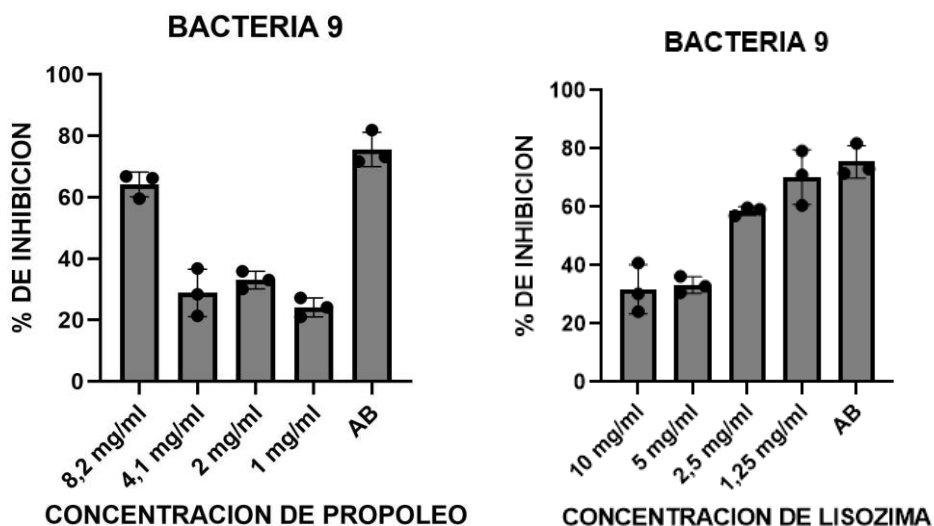


Figura 9. Porcentaje de inhibición lisozima, porcentaje de inhibición de antibiótico de elección (Gentamicina) en 10 bacterias de tipo coco gram positivo.

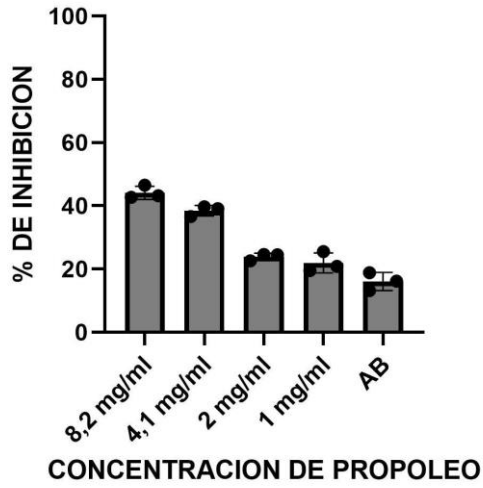
Del total de cocos gram positivos, 10 cepas bacterianas mostraron una inhibición superior al 50% con una o varias concentraciones de ambos tratamientos (Propóleo y Lisozima); 1 cepa mostró inhibición únicamente al ser sometida a tratamiento con propóleo y 5 cepas de igual forma fueron exclusivamente inhibidas por la lisozima. Para las cepas ATCC, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis* mostraron inhibición en el crecimiento para ambos tratamientos; para el control positivo, 8 únicamente cepas mostraron inhibición del crecimiento superior al 50% con el antibiotico de eleccion (Gentamicina), las cepas de ATCC no presentaron esta inhibición.

● **BACILOS GRAM NEGATIVOS**

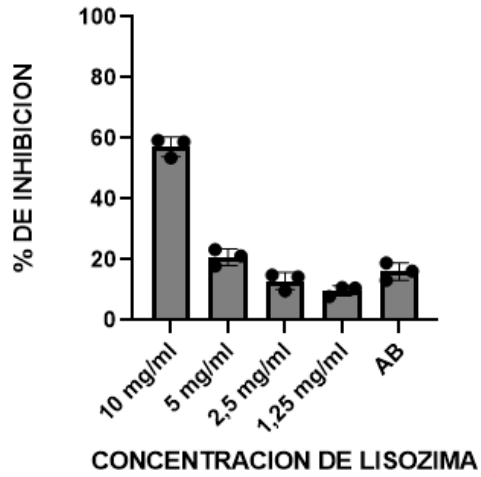




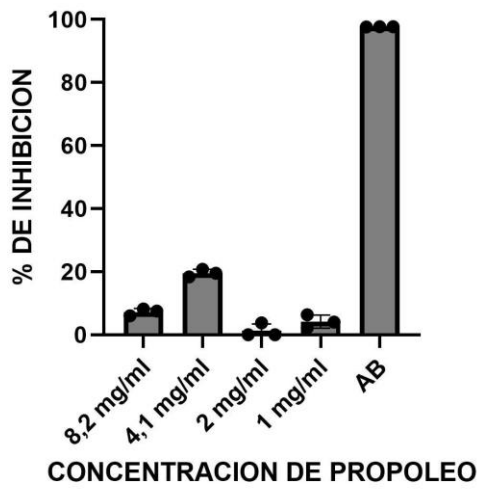
**BACTERIA 16**



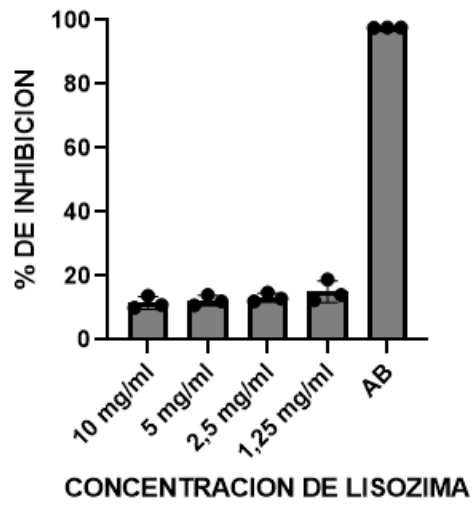
**BACTERIA 16**

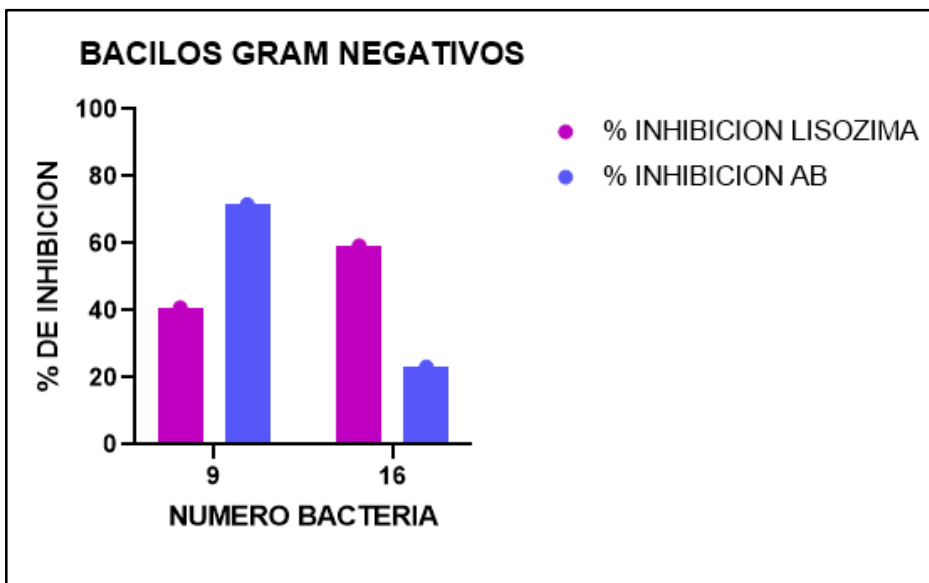
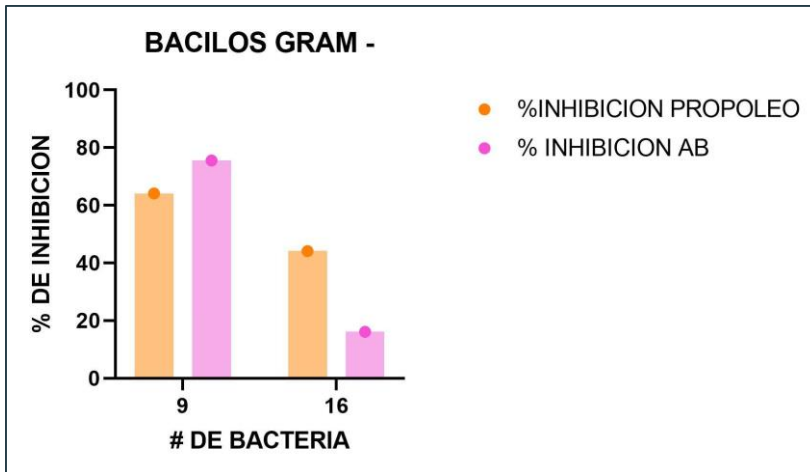
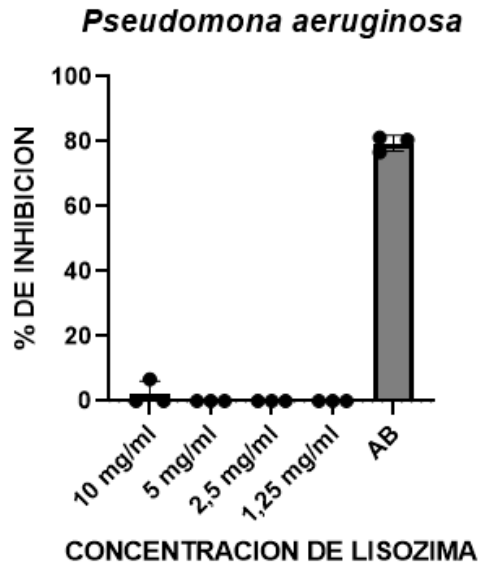
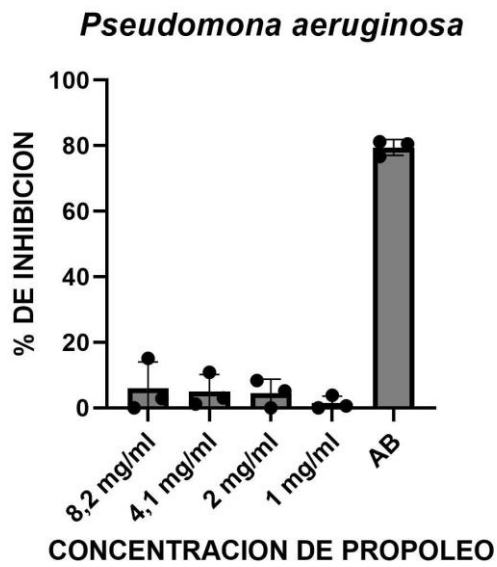


***Escherichia coli***



***Escherichia Coli***

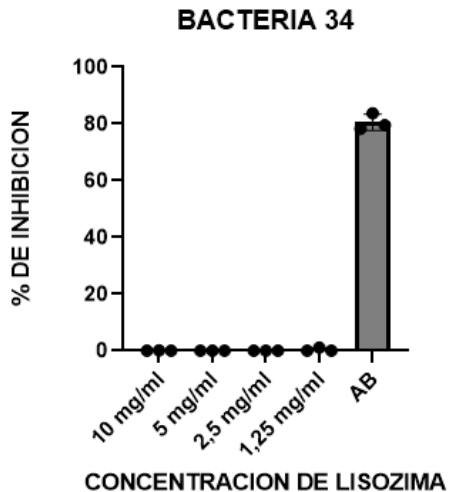
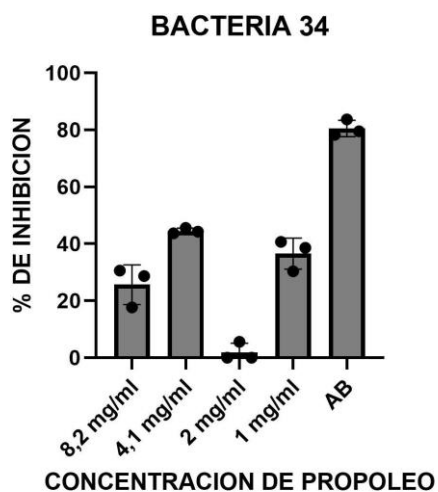
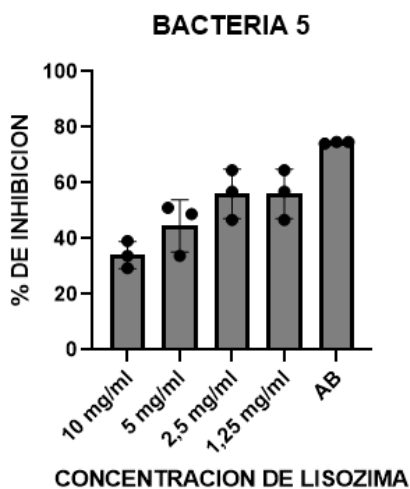
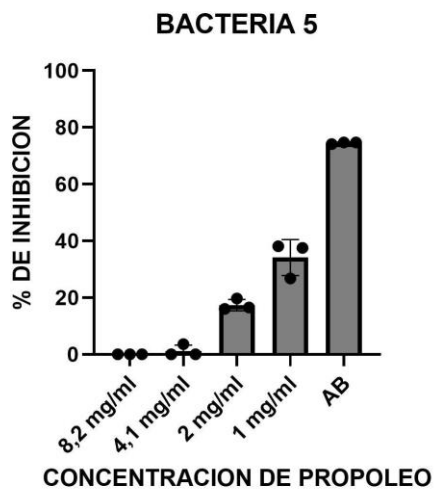


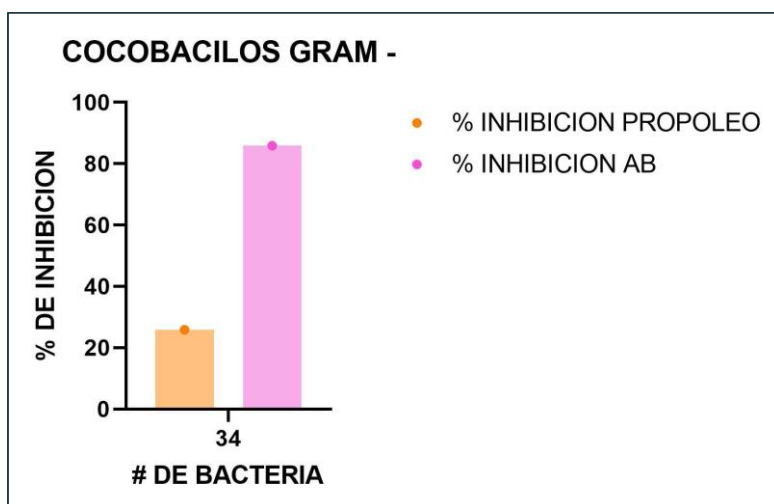
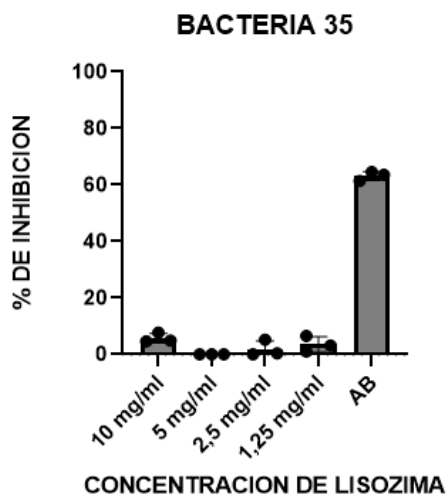
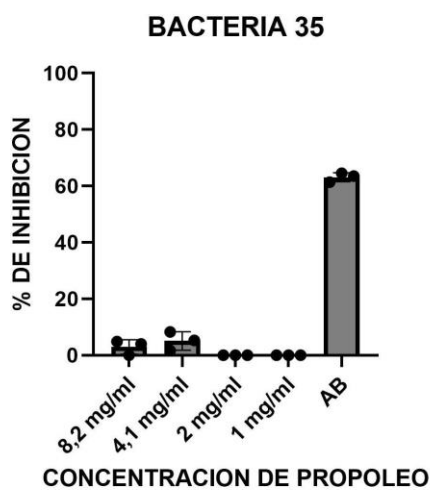


En el grupo de los bacilos gram negativos, una de las cepas mostró inhibición a ambos tratamientos y al antibiótico de control, otra cepa fue inhibida por la Lisozima

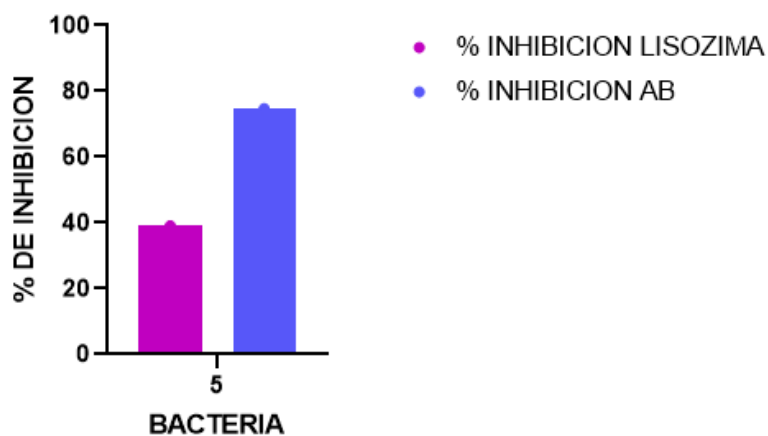
únicamente, y para las cepas ATCC *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, el antibiótico fue el único tratamiento efectivo.

● **COCOBACILOS GRAM NEGATIVOS**





### COCOBACILOS GRAM NEGATIVOS

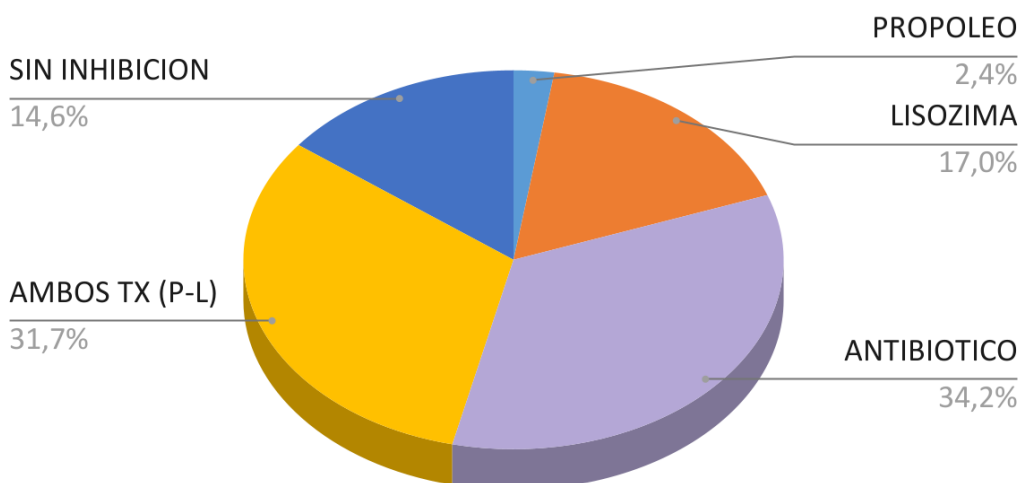


En el grupo de los cocos gram negativos, solo una cepa mostró inhibición de más del 50% únicamente a Lisozima, para propoleo no hubo inhibición en ninguna de las

cepas, y en cuanto al control positivo con el antibiótico, se observó una inhibición de más del 50% en 3 cepas.

Del total de 31 cepas muestreadas, 13 mostraron resultados favorables a ambos tratamientos, 7 fueron inhibidas únicamente por la lisozima, 1 cepa por el extracto de propóleo, y en cuanto al control con antibiótico 14 fueron inhibidas por el mismo; se observó que en las 6 cepas restantes no hubo inhibición para ningún tratamiento.

#### % INHIBICION A TRATAMIENTOS



**Figura 10. Porcentaje de cepas que fueron inhibidas a uno o varios tratamientos.**

Es de resaltar que la inhibición observada varió para cada bacteria en cuanto a la concentración de Propóleo y Lisozima, debido a que se observaron cepas mayormente inhibidas por las concentraciones más bajas, y otras en la que la inhibición se mostró en las concentraciones más altas. En algunos casos, los tratamientos alternativos incluso lograron superar el efecto inhibitorio del antibiótico, mostrando potencial terapéutico beneficioso a futuro.

## 7. DISCUSIÓN

Autores en distintos países como Chile (San Martín et al., 2002), Paraguay (Aponte, 2007), el estado de Zulia en Venezuela (Faría et al., 2005), los departamentos de Antioquia, Córdoba (Donado et al., 1992) y el altiplano cundiboyacense en Colombia (Cruz et al., 2007; Calderón y Rodríguez, 2008); establecen que el *Staphylococcus aureus* es el patógeno más prevalente en los casos de mastitis bovina, por lo que se podría sospechar que en las cepas aisladas del presente estudio más de una corresponda a esta especie, y de igual forma, por esta razón fue importante exponer propóleo de Usme a esta cepa en específico.

Los estudios realizados sobre el propóleo como agente antibacteriano reportan que este suele tener mayor actividad contra las bacterias Gram positivas que las Gram negativas (Mavri et al., 2012; Serra y Lacalle, 2012; Siripatrawan et al., 2013), afirmación que se pudo confirmar, sin embargo en las bacterias Gram negativas se obtuvieron algunos resultados favorables. Se habla también de que los microorganismos más frecuentemente aislados en la mastitis bovina son los cocos Gram positivos, lo que coincide con los resultados hallados ya que este tipo de bacterias fueron las que se presentaron en mayor proporción en el total de las muestras, además de que ya se tienen algunos indicios de que en las cepas aisladas algunas pueden corresponder a especies de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococos*. En cuanto a la CI50 del propóleo, varía según el autor, ya que se han reportado concentraciones mucho más altas que la estipulada en este trabajo, como la reportada por Marcucci de 120 mg/ml, otras más cercanas con propóleos del departamento del Cauca en los municipios de Buenos Aires y Totoró entre 15 y 17 mg/ml, y otras más bajas de hasta 1 mg/ml en el municipio de La Unión, en Antioquia.

La lisozima destruye las paredes celulares de ciertas bacterias Gram- positivas, como es el caso de las bacterias 3,8,32,52,63,26,5, el % de inhibición de la lisozima mayor o igual al 50% , en cepas como ATCC *Staphylococcus aureus* 29213, *Streptococcus uberis* 700403 también género más del 50% de inhibición, en bacterias Gram negativas la lisozima es casi inactiva por la dificultad de acceder al peptidoglicano que se encuentra protegido por la membrana externa (Ibrahim y col.,2002);Las bacterias gram positivas el peptidoglicano representa alrededor del 90% de la pared celular mientras que las gram negativas solo el 10% (Back,1984); La lisozima de huevo cuando es modificada por distintos métodos logra ampliar su espectro antibacteriano frente a ciertas bacterias Gram-positivas, además potencia su actividad frente a los Gram negativos.(touch y col.,2004) la lisozima recombinante incrementa su actividad a cepas de bacterias *Escherichia coli* (Ibrahim y col.,1992;kato y col.,1998) se busca potenciar el espectro antibacteriano de la lisozima de huevo mediante tratamientos térmicos y químicos (cegielska-Radziejewska y col.,2009).

Estudios recientes han demostrado que la lisozima es uno de los principales componentes de los gránulos primarios y secundarios de los neutrófilos y el principal producto secretado por los macrófagos, por ello puede actuar en la activación de estas

células frente a los procesos de inflamación por la presencia de bacterias (Ganz y col., 2003; Cho y col., 2005)

## 8. CONCLUSIÓN

Las cepas aisladas en el total de muestreos analizados coinciden con las reportadas por la literatura, destacando principalmente a los cocos gram positivos. Se obtuvo una CI50 muy cercana a la dosis máxima utilizada, por lo que se sugiere que con concentraciones mayores del extracto de propóleo de Usme se podrían obtener porcentajes de inhibición más altos, sin embargo lo observado en este estudio nos permite inferir que el extracto de propóleo es promisorio para el tratamiento de mastitis, e incluso de otras patologías de origen bacteriano, siendo una alternativa natural que puede ser utilizada en el desarrollo de estrategias terapéuticas para la enfermedad, más aún ante la problemática de resistencia bacteriana a antibióticos usados comercialmente, y además, disminuyendo significativamente los efectos de residualidad al tratarse de un producto de origen natural, sin embargo, es necesario tener en cuenta que los compuestos de cada propóleo varían según la región y su origen vegetal, por lo que es posible que no todos vayan a tener el mismo efecto a una concentración estandarizada y se requiera mayor o menor cantidad del mismo.

Se recomienda profundizar la investigación para cada tipo de propóleo de acuerdo a su origen fitogeográfico, ya que los componentes potencialmente antimicrobianos del propóleo van a variar en su cantidad para cada uno. Se deben continuar con los estudios sobre su efecto en diferentes tipos de cepas bacterianas, no solo causantes de mastitis sino de cualquier patología infecciosa, manejando concentraciones más altas para evaluar si existe un aumento en el porcentaje de inhibición de microorganismos.

La lisozima de clara de huevo es utilizada en la industria farmacéutica, alimentaria, en veterinaria, medicina y en la industria cosmética ya que tiene gran efecto antibacteriano frente a bacterias Gram positivas, La mayoría de las bacterias Gram negativas no son susceptibles a la acción de la lisozima sola porque su membrana externa impide el acceso de la enzima a la capa de peptidoglicano. Sin embargo, algunas lisozimas naturales que han sido modificadas por diversas técnicas, tales como la fermentación bacteriana, son activas contra bacterias Gram negativas al lograr penetrar la capa externa (Ellison III y Giehi, 1991; Sahoo *et al.*, 2012)

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1.
2. Anderson, Cindy (2013). *Great Adventures In The Microbiology Laboratory*
3. Corbellini,(1996).La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche.Carlos N. Corbellini, instituto nacional de tecnología agropecuaria proyecto lechero,E.E.A pergamino.

4. Eschenbach, D.A., Pollock, H.M. and Schachter, J. Laboratory diagnosis of female genital tract infection. CUMITECH 17. Coord. Ed. S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1983. <https://www.agro.uba.ar/sites/default/files/agronomia/la-mastitis-bovina-y-su-impacto-sobre-calidad-de-leche.pdf>
5. Giral, T; Hugues, B.; Soto, C. J.2007 Suspensión oftálmica de propóleos-R: una alternativa en el tratamiento de las oftalmopatías en animales afectivos REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. VIII, núm. 9, pp. 1-6 Veterinaria Organización.Málaga, España. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63612710002.pdf>
6. Hajna, A.A. 1945. Triple-sugar iron agar medium for the identification of the intestinal group of bacteria. J. Bacteriol. 49:516-517.
7. Hutchison, C. A. III, and M. G. Montague. 2002. Mycoplasmas and the minimal genome concept, p. 221-254. In Razin, S., and R. Herrmann (eds.), Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas, Kluwer Academic/Plenum, New York.
8. Kloss WE, Schleifer KH, Goirtz F. The genus Staphylococcus. In: Balows A, Trüper HG, Dwoekin M, eds. The Prokaryotes, 2nd Ed. New York, Springer-Verlag; 1992.
9. López, G. J., (2011). Evaluación del tratamiento local de mastitis clínica en ganado bovino a base de un extracto etanólico de propóleo al 50%. Universidad de san carlos de Guatemala, facultad de medicina veterinaria y zootecnia escuela de medicina veterinaria. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/2879/1/Tesis%20Med%20Vet%20Juan%20M%20Lopez.p>
10. Ochoa Pumaylle, (2012), Actividad terapéutica del propóleo en el tratamiento de mastitis clínica bovina en el establo lechero San Isidro. [https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75563\\_archivo\\_01.pdf](https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75563_archivo_01.pdf).
11. National Committee on Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Approved Standard ASM-2 Villanova, Pa. 1975.
12. OSTERAS, O.; SOLVEROD, L.; REKSEN, O. 2006. Milk culture results in a large Norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. J. Dairy Sci. 89, 1010-1023.
13. Pardo-Mora DP, Santiago KB, Conti BJ, de Oliveira Cardoso E, Conte FL, Oliveira LPG, de Assis Golim M, Uribe JFC, Gutierrez RM, Buitrago MR, Popova M, Trúsheva B, Bankova V, García OT, Sforcin JM. (2019). The chemical composition and events related to the cytotoxic effects of propolis on



osteosarcoma cells: A comparative assessment of Colombian samples. *Phytother Res.* 33(3):591-601. doi: 10.1002/ptr.6246.

14. Ochoa Pumaylle, Isaí. 2012. Actividad terapéutica del propóleo en el tratamiento de mastitis clínica bovina en el establo lechero San Isidro, Cañete 2011-2012. Tesis. Institución: Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac de Perú.  
<http://repositorio.unamba.edu.pe/handle/UNAMBA/428>
15. Sanchez (2015). Síntomas y tratamiento de la mastitis bovina. *Experto animal.*  
<https://www.expertoanimal.com/sintomas-y-tratamiento-de-la-mastitis-bovina-20072.html>
16. Vásquez R, Martínez R, Ortega N, Maldonado W. 2015. Manual técnico de apicultura. Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria, CORPOICA. 1ra ed. Bogota D.C. Colombia.
17. Wolter. W, Castañeda V.H., Kloppert B., y Zschoeck M. (s.f.) La mastitis Bovina. Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse. Universidad de Guadalajara.  
[https://www.researchgate.net/profile/Hugo\\_Vazquez4/publication/30812959\\_La\\_Mastitis\\_bovina/links/547c86f50cf285ad5b071759.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hugo_Vazquez4/publication/30812959_La_Mastitis_bovina/links/547c86f50cf285ad5b071759.pdf)
18. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Guideline M7-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009. <https://www.aebm.org/formacion%20distancia/distancia%202011-2012/Actualizaciones/monografias%202011/5.-%20ANTIMICROBIANOS.pdf>
19. José A. García Rodríguez, Rafael Cantón, J. Elías García Sánchez, M<sup>a</sup> Luisa Gómez-Lus, Luis Martínez Martínez, Carmen Rodríguez-Avial, et al. Métodos básicos para el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos. Capítulo 11. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2000.
20. Murray P, Baron EJ, Jorgensen JH et al. *Manual of Clinical Microbiology.* 9<sup>a</sup> edición. Washington: American Society for Microbiology; 2007.
21. Brugger SD, Baumberger C, Jost M, Jenni W, Brugger U, Mühlemann K. Automated Counting of Bacterial Colony Forming Units on Agar Plates. Bereswill S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Mar 20 [cited 2017 Sep 9];7(3):e33695. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pon.e0033695>
22. Laboratory of Microbiology and Mycotoxins, Department of Food Research and Postgraduate, Universidad de Sonora, Bulevard Luis Encinas y Rosales S/N, Colonia Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México;

23. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, CEPROBI 8, C.P. 62731, San Isidro Yautepec, Morelos, México. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092020000300103&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092020000300103&script=sci_arttext&tlng=es)
24. [http://www.revistasan.org.ar/pdf\\_files/trabajos/vol\\_14/num\\_4/RSAN\\_14\\_4\\_314.pdf](http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_14/num_4/RSAN_14_4_314.pdf)
25. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
26. Farmer III, J.J. 2003. Enterobacteriaceae: introduction and identification. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
27. [https://www.redalyc.org/journal/3613/361370160006/html/#:~:texto=Ensayos%20in%20vitro%20han%20demostrado,bacterias%20gran%20\(%2D\)%20como%20E](https://www.redalyc.org/journal/3613/361370160006/html/#:~:texto=Ensayos%20in%20vitro%20han%20demostrado,bacterias%20gran%20(%2D)%20como%20E).
28. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-71382016000100006](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382016000100006)
29. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/538/1/Tesis.pdf>
30. <https://www.redalyc.org/journal/449/44967852003/html/>
31. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26403/1/Tesis%20104%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20525.pdf>
32. [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1659-13212017000100018](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212017000100018)
33. Diseño, diagramación e impresión Dirección de Difusión, Mercadeo y Cultura Estadística del Departamento Administrativo Nacional de Estadística Septiembre de 2014
34. Boletín mensual insumos y factores asociados a la producción agropecuaria (agosto-2014)  
[https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos\\_factores\\_de\\_produccion\\_ago\\_2014.pdf](https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_ago_2014.pdf)
35. Análisis del comportamiento de los principales géneros bacterianos frente a antimicrobianos, obtenidos a partir de muestras clínicas de origen animal remitidas a un laboratorio veterinario de la ciudad de Cali, Colombia 2013 [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/66364/Documento\\_completo\\_\\_\\_..pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Resistencia%20bacteriana%20en%20veterinaria,-](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/66364/Documento_completo___..pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Resistencia%20bacteriana%20en%20veterinaria,-)

Los%20antibi%C3%B3ticos%20tienen&text=En%20veterinaria%2C%20se%20usan%20como,et%20al.%2C%202009).

36. Dra. D<sup>a</sup>. Ana Haro García *Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Granada* [https://www.lechepuleva.es/nutricion-y-bienestar/el-propoleo-antibiotico-natural#:~:text=El%20prop%C3%B3leo%20es%20activo%20frente,los%20antibi%C3%B3ticos%20\(Streptococcus%20piogenes\).](https://www.lechepuleva.es/nutricion-y-bienestar/el-propoleo-antibiotico-natural#:~:text=El%20prop%C3%B3leo%20es%20activo%20frente,los%20antibi%C3%B3ticos%20(Streptococcus%20piogenes).)
37. Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México *Agronomía Mesoamericana*, vol. 28, núm. 1, pp. 223-227, 2017 Universidad de Costa Rica. <https://www.redalyc.org/journal/437/43748637018/html/>