



Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

“Disminución de la virulencia de bacterias patógenas que causan mastitis bovina con soluciones de apitoxina”

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA EN ZOOTECNIA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Gestión sostenible y aprovechamiento de los recursos naturales

Sublínea: Seguridad y Soberanía alimentaria

AUTOR/A: Johanna Maribel Cueva Narváez

ASESOR/A: Mgs. Vicente Arteaga Cadena

IBARRA, JULIO - 2021



CERTIFICACIÓN DEL ASESOR DE TESIS

Ibarra, 26 de julio del 2021

Mgs. Vicente Arteaga Cadena
ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f.) 


Mgs. Vicente Arteaga Cadena

C.C.: 0400347647



PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f): 

Mgs. Vicente Arteaga Cadena

C.C.: 0400347647

(f): 

Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 1002658399

(f): 

Mgs. Maritza de los Ángeles Mier Quiroz

C.C.: 1002878286



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Johanna Maribel Cueva Narvález, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 26 de julio del 2021

f):

Johanna Maribel Cueva Narvález

C.C.: 1002758975



AUTORÍA

Yo, Johanna Maribel Cueva Narváez, portador de la cédula de ciudadanía N°1002758975, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del (los) autor (es), y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

f): .....
Johanna Maribel Cueva Narváez

C.C.: 1002758975



DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo: Johanna Maribel Cueva Narvález, con CC: 1002758975, autora del trabajo de grado intitulado: “DISMINUCIÓN DE LA VIRULENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS QUE CAUSAN MASTITIS BOVINA CON SOLUCIONES DE APITOXINA”, previo a la obtención del título profesional de Ingeniera en Zootecnia, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA)

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 26 de julio del 2021

(f.)
Johanna Maribel Cueva

C.C. 1002758975



DECLARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ÉTICO DE LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: “DISMINUCIÓN DE LA VIRULENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS QUE CAUSAN MASTITIS BOVINA CON SOLUCIONES DE APITOXINA”, lo propuesto en el Código de ética de la Investigación y el Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha de 15 de enero del 2018.

Para constancia firma:

(f).....

Jhoanna Maribel Cueva Narváz

C.C: 1002758975

Carrera: Ingeniería en Zootecnia



DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico al ser que me dio la vida a esa persona que nunca ha dejado de luchar cada día, cada hora, cada minuto, cada instante por verme convertida en una gran profesional; a ti madre a ti te dedico, a ti que siempre estuviste a mi lado dándome fuerzas para lograr tan grande sueño, gracias mami por ser esa persona que jamás me dio la espalda, aunque pueda haber fracasado miles de veces.

Esto también va por mis hijos Romi y Rafa, quienes son el motor principal para que haya podido culminar mi carrera, por quienes cada día tengo que luchar y salir a delante y que se sientan orgullosos de mí y así poder también llegar a ser un ejemplo para ustedes hijos de mi alma.



AGRADECIMIENTO

Doy gracias primeramente a Dios por siempre estar a mi lado en todo momento sea bueno o malo, he orado, llorado y pedido que siempre llegue este momento y hoy llego gracias a ti mi querido Dios.

Agradezco también a toda mi familia a mis padres, a mis hijos, a mi esposo que siempre estuvieron dándome fuerzas para que no decaiga y pueda seguir en este camino como fue la culminación de mi tesis.

No fue nada fácil, pero si gracias a sus aportes, a su gran amor y sobre todo a su apoyo, lo complicado de todo esto se ha notado menos. Les agradezco de todo corazón mi hermosa y querida familia nunca les fallaré y espero se sientan siempre orgullosos de mí.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTO.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I	
1 INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO II	
2 OBJETIVOS.....	5
CAPÍTULO III	
3 ESTADO DEL ARTE.....	6
3.1 La mastitis.....	6
3.1.1 Tipos de mastitis.....	7
3.2 Agentes Causales de la Mastitis.....	8
3.2.1 <i>Escherichia Coli</i>	10
3.2.2 <i>Streptococcus agalactiae</i>	10
3.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
3.2.4 Diagnósticos de mastitis.....	13
3.2.5 Pruebas de mastitis.....	13
3.3 Mecanismo de defensa de la glándula mamaria.....	19
3.3.1 Mecanismos no inmunológicos.....	19
3.3.2 Mecanismos inmunológicos.....	20

3.4	Cultivos de bacterias a partir de leche	21
3.4.1	Crecimiento de bacterias Gram-Positivas frente a bacterias Gram Negativas	22
3.4.2	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	22
3.4.3	Cultivo de <i>Streptococcus agalactiae</i>	22
3.4.4	Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	23
3.5	Apitoxina	24
3.5.1	Actividad biológica de la apitoxina (<i>Apis mellifera</i>)	24
3.5.2	Composición química.....	25
3.5.3	Conservación.....	27
CAPÍTULO IV		
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4.1	Área de estudio	29
4.2	Equipos, Materiales y Reactivos de laboratorio	29
4.2.1	Equipos.....	29
4.2.2	Materiales	29
4.2.3	Reactivos	30
4.3	Métodos	30
4.3.1	Diseño experimental.....	30
4.3.2	Características del experimento	31
4.4	Recolección de la apitoxina.....	33
4.5	Reactivación de cepas bacterianas.....	33
4.5.1	Aislamiento de cepas.....	33
4.5.2	Antibiograma.....	34
4.5.3	Diluciones sucesivas	35

CAPÍTULO V	
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 37
5.1	RESULTADOS..... 37
5.1.1	UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC)..... 40
5.2	DISCUSIÓN..... 45
5.3	SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS..... 46
CAPÍTULO VI	
6	CONCLUSIONES..... 52
CAPÍTULO VII	
7	RECOMENDACIONES 53
CAPÍTULO VIII	
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54
CAPÍTULO IX	
9	ANEXOS..... 58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Interpretación para prueba de Wisconsin.....	166
Tabla 2. Interpretación de resultados de laprueba de California para Mastitis.....	188
Tabla 3. Relación entre conteo de células somáticas y mastitis.....	19
Tabla 4. Composición química de la apitoxina.....	266
Tabla 5. Propiedades físico químicas de la apitoxina.	277
Tabla 6. Dosis de apitoxina (factor A).....	311
Tabla 7. Bacterias (factor B).....	311
Tabla 8. Tratamientos.....	311
Tabla 9. Esquema del ADEVA.....	32
Tabla 10. Análisis de varianza para la variable halos de inhibición.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Palpación de la ubre	144
Figura 2. Papel indicador de pH.....	155
Figura 3. Procedimiento Wisconsin WMT para el diagnóstico de la mastitis subclínica. .	155
Figura 4. Prueba de CMT.....	177
Figura 5. Prueba Tukey 5% para la variable halos de inhibición (mm).....	8
Figura 6. Prueba de Tukey 5% para la variable halos de inhibición del factor bacterias....	39
Figura 7. Prueba de Tukey 5% para la variable halos de inhibición del factor dosis.....	39
Figura 8. Número de UFC de 3 cepas de bacterias con una dilución 10^{-4} a las 24 horas	40
Figura 9. Número de UFC de 3 cepas de bacterias con una dilución 10^{-4} a las 48 horas	41
Figura 10. Número de UFC de 3 cepas de bacterias con una dilución 10^{-4} a las 72 horas ..	41
Figura 11. Número de UFC de 3 cepas de bacterias con una dilución 10^{-5} a las 24 horas ...	42
Figura 12. Número de UFC de 3 cepas de bacterias con una dilución 10^{-5} a las 24 horas	422
Figura 13. Número de UFC de 3 cepas de bacterias con una dilución 10^{-5} a las 72 horas	433
Figura 14. Número de UFC de 3 cepas de bacterias con una dilución 10^{-6} a las 24 horas	433
Figura 15. Número de UFC de 3 cepas de bacterias con una dilución 10^{-6} a las 48 horas	444
Figura 16. Número de UFC de 3 cepas de bacterias con una dilución 10^{-6} a las 72 horas.	44
Figura 17. ¿Considera usted que la sala se desarrolló este evento brindando las comodidades necesarias?	46
Figura 18. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?.....	47
Figura 19. ¿Considera Usted que el expositor mostro dominio del tema? (la autora)	47
Figura 20. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?	48

Figura 21. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?.....	48
Figura 22. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?	49
Figura 23. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios completamente posteriores?	49
Figura 24. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?	50
Figura 25. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo	58
Anexo 2. Pesaje de nutriente broth para el caldo cultivo (la autora).....	58
Anexo 3. Agar diluido en agua.....	59
Anexo 4. Tubos de ensayo con medio de cultivo.....	59
Anexo 5. Conservación de cepas en caldo nutritivo	60
Anexo 6. Discos de papel filtro con apitoxina en placa con agar	60
Anexo 7. Incubación de bacterias de interés	61
Anexo 8. Medición de halos de inhibición para <i>Streptococcus agalactiae</i> a las 24 horas	61
Anexo 9. Medición de halos de inhibición para <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas	62
Anexo 10. Halos de inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i> a las 24 horas	62
Anexo 11. Colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> a las 24 horas.....	63
Anexo 12. Apitoxina y solución salina	63
Anexo 13. <i>Staphylococcus aureus</i>	64
Anexo 14. Datos de campo, halos de inhibición	65
Anexo 15. Datos de campo, concentración mínima inhibitoria.....	66

RESUMEN

La mastitis, ha sido considerada como el padecimiento de tipo sanitario más importante y costoso del ganado bovino lechero, está considerada como el problema de salud más común, cuyas pérdidas representan la mitad de los costos totales de salud en las unidades de producción agropecuarias.

Esta investigación se desarrolló con el objetivo de disminuir la virulencia de tres cepas de bacterias patógenas Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* con soluciones de apitoxina. Estas cepas bacterianas son las causantes de la mastitis clínica, enfermedad que ha venido causando, desde tiempo memorables, grandes pérdidas económicas en los ganaderos, debido al empleo de medicamentos que tarde o temprano hacen resistencia a dichas bacterias. Por ello se utilizó la apitoxina o veneno de abejas como una alternativa para el control de la mastitis. Se partió con el uso de 3 concentraciones de apitoxina 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml y 0,9 mg/ml en las bacterias ya mencionadas y se realizaron antibiogramas para poder establecer la CMI (concentración mínima inhibitoria) para luego determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) mediante diluciones seriadas, desde 10^1 hasta 10^9 . Se utilizó un Diseño completamente al azar (DCA) con interacción A x B + 1, con tres repeticiones. Las variables de estudio fueron: halos de inhibición y Unidades formadoras de colonia. Los mejores resultados para CMI medidas a través de halos de inhibición fueron de 0,8 mg/ml para *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, mientras que para *Escherichia coli* la CMI que mejores resultados dio fue la de 0,9 mg/ml de apitoxina.

Palabras clave: apitoxina, mastitis, antibiograma, CMI y UFC, bacterias patógenas.

ABSTRACT

Mastitis, which has been considered the most important and costly health disease of dairy cattle, is considered the most common health problem, whose losses represent half of the total health costs in agricultural production units.

This research was developed with the objective of reducing the virulence of three strains of Gram positive pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* with apitoxin solutions. These bacterial strains are the cause of clinical mastitis, a disease that has been causing, for a long time, great economic losses in farmers, due to the use of drugs that sooner or later make resistance to these bacteria. Therefore, apitoxin or bee venom was used as an alternative to control mastitis. It was started with the use of 3 concentrations of apitoxin 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml and 0,9 mg/ml in the aforementioned bacteria and antibiograms were performed to establish the MIC (minimum inhibitory concentration) for later determine the colony forming units (CFU) by serial dilutions, from 10^1 to 10^9 . A completely randomized design (DCA) with A x B + 1 interaction was used, with three repetitions. The study variables were: inhibition halos and colony-forming units. The best results for MIC measured through inhibition halos were 0,8 mg/ml for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, while for *Escherichia coli* the MIC that gave the best results was 0,9 mg/ml of apitoxin.

Key words: apitoxin, mastitis, antibiogram, MIC and CFU, pathogenic bacteria.

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN

La ganadería bovina en el Ecuador se ha venido realizando bajo una gran diversidad de sistemas de producción que se hallan influenciados, entre otros factores, por la variedad de alternativas tecnológicas que se utilizan, los ambientes socio-culturales y las formaciones agroecológicas en los que están inmersos, así como por los objetivos económicos que se establecen. Por estas razones la calidad higiénica y nutricional de la leche producida es muy variable, así como el impacto ambiental que genera la dinámica productiva bovina lechera, de igual manera las relaciones laborales existentes y el tipo de manejo y cuidado que se prodiga a los animales (Escuela de Negocios de la ESPOL - ESPAE, 2016).

La calidad de la leche bovina en el Ecuador tiene muchos cuestionamientos por parte de la industria láctea, ya que, si tomamos en cuenta los estándares internacionales que debe alcanzar la misma, encontramos muchas desventajas frente a otros países sudamericanos. Por lo que es necesario sumar esfuerzos para poder mejorar la calidad de la leche bovina, obteniendo de esta manera una ventaja competitiva para los ganaderos y garantía para el consumidor final (Oñate, 2018).

La leche, al ser un alimento altamente nutritivo, sin embargo, contiene diferentes tipos de bacterias propias de este producto lácteo, el mismo que debe estar exento de otros microorganismos dañinos para la salud tales como *Streptococcus aureus*, *S. agalactiae*, *Corinebacterium bovis*, coliformes y otras bacterias ambientales que pueden estar presentes en animales infectados con mastitis clínica (INEN 2015).

La mastitis bovina es uno de los principales problemas sanitarios que tienen los pequeños y medianos productores en sus hatos lecheros; esto es, debido a las condiciones de manejo y ambientales en las que se desarrolla esta actividad y, además por el desconocimiento en el manejo de los hatos bovinos lecheros (Bonifaz, 2016).

La producción de leche de calidad higiénica, como en todo sistema productivo, resulta sumamente complejo, más aún que otros sistemas agrícolas o pecuarios, ya que el producto a manejar es extremadamente sensible y perecible.

Si la leche es un producto de “cosecha” diaria, es indispensable la sanidad de la ubre del animal, además de ejecutar buenas prácticas de ordeño. De tal manera que el problema de esta investigación radica en la inocuidad del producto lácteo. Por lo dicho se busca en un producto apícola como es la apitoxina la posibilidad de disminuir la virulencia de las bacterias causantes de mastitis bovina, a la vez la opción de controlar a esta enfermedad con alternativas naturales dadas por las abejas (*Apis mellifera*).

CAPÍTULO II

2 OBJETIVOS

Objetivo General

- Disminuir la virulencia de bacterias patógenas que causan mastitis bovina con soluciones de apitoxina mediante pruebas de laboratorio.

Objetivos Específicos

- Ejecutar pruebas de sensibilidad bacteriana de *Escherichia Coli*, *Streptococcus agalactiae*; *Staphylococcus aureus*, con concentraciones de 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml y 0,9 mg/ml de apitoxina.
- Preparar diluciones seriadas con la CMI (concentración mínima inhibitoria) de apitoxina para cada bacteria en estudio (*Escherichia Coli*, *Streptococcus agalactiae*; *Staphylococcus aureus*.)
- Difundir los resultados que se alcancen en esta investigación a personas interesadas en esta problemática, mediante una salida de campo, donde se presentará la información obtenida.

Hipótesis

Ho: Ninguna concentración de apitoxina disminuye la virulencia de bacterias patógenas que causan mastitis bovina.

H1: Al menos una de las tres concentraciones de apitoxina disminuye la virulencia de bacterias patógenas que causan mastitis bovina.

CAPÍTULO III

3 ESTADO DEL ARTE

3.1 La mastitis

La leche bovina y sus derivados poseen incuestionables cualidades nutritivas de la leche y los productos lácteos, no es menos cierto que, desde su síntesis en la glándula mamaria hasta su llegada al consumidor, están sometidos a un gran número de riesgos que hacen peligrar la calidad original. De acuerdo a Chacón (2017), estos riesgos son: la contaminación y multiplicación de microorganismos, contaminación con gérmenes patógenos, alteración físico-química de sus componentes, absorción de olores extraños, generación de malos sabores y contaminación con sustancias químicas tales como pesticidas, antibióticos, metales, detergentes, desinfectantes, partículas de suciedad, etc. Es por ello, que el desafío para quienes trabajan en el sector lechero no sólo es producir mayor cantidad de leche, sino también, de alta calidad higiénica, y para ello deben contemplarse aspectos fundamentales, como lo son, la higiene microbiológica de la misma.

La mastitis bovina es una enfermedad de la glándula mamaria, la cual se produce por la invasión a través del canal del pezón, por diferentes tipos de bacterias, mico plasmas, hongos, levaduras y hasta en ocasiones virus Aguilar y Álvarez, (2019). Sin embargo, las bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corinebacterium* y algunos gérmenes Gram negativos, son responsables de más del 90 % de los casos clínicos y subclínicos.

La mastitis es uno de los principales problemas sanitarios que tienen los pequeños y medianos productores en sus hatos lecheros; esto es debido a las condiciones y el medio en el que se desempeña esta labor y por el desconocimiento en el manejo para esta actividad. La mastitis es una patología de origen multifactorial y provocada por un sin

número de microorganismos que continuamente cambian su dinámica ecológica por las constantes mutaciones que sufren los agentes etiológicos que hace difícil su tratamiento y erradicación, además de la resistencia de los animales por el mal uso de los antibióticos para tratar esta enfermedad (Bonifaz, 2016).

Es una enfermedad altamente prevaleciente en el ganado lechero a nivel mundial y es una de las enfermedades más importantes que afecta a la industria lechera, ya que ocasiona grandes pérdidas a los productores de leche en el mundo. La mastitis es una compleja y singular enfermedad que causa una gran cantidad de pérdidas económicas a nivel mundial, principalmente en las regiones con una intensiva producción lechera (Mendoza, Vera y Peña, 2017).

3.1.1 Tipos de mastitis

3.1.1.1 Mastitis subclínica.

La mastitis subclínica es una inflamación de la ubre sin síntomas externos reconocibles. El contenido de células somáticas esta elevado en dos de tres muestreos (con un intervalo de una semana) y se observa la presencia de patógenos de mastitis, la composición química de la leche esta alterada (Pomaquero, 2016) .

3.1.1.2 Mastitis clínica

La mastitis clínica se observa con síntomas claros de una inflamación de la ubre, hay temperatura elevada, con dolores e inflamación. La leche está muy alterada macroscópicamente y con frecuencia los animales presentan fiebre (Pomaquero, 2016).

De acuerdo al mismo autor la mastitis aguda se observa con síntomas claros de una inflamación de la ubre, hay temperatura elevada, con dolores e inflamación. La leche está muy alterada macroscópicamente y con frecuencia los animales presentan fiebre.

Barrera, et al (2016), indican que la mastitis es una anomalía de la glándula mamaria de la vaca que se la puede observar fácilmente y se caracteriza por la tumoración y dolor, enrojecimiento y la leche presenta una apariencia anormal.

3.1.1.3 Mastitis aguda

De acuerdo a Pomaquero (2016), este tipo de mastitis se caracteriza por un enrojecimiento, endurecimiento e hinchazón solo del cuarto afectado, tornándose más sensible al tacto. La leche tiene un aspecto purulento, seroso, aguachento o en ocasiones presencia de sangre, la producción disminuye notablemente y de forma repentina.

3.1.1.4 Mastitis crónica

Este tipo de mastitis se da por la induración de la glándula producida por la proliferación de tejido fibroso que va remplazando al tejido noble de la misma. En este tipo de mastitis la leche es generalmente acuosa con una coloración café o amarillenta, según lo indica Smith (2017). Además, los mismos autores indican que la mastitis crónica puede manifestarse con eventos agudos y puede volverse crónica presentando síntomas de fiebre, taquicardia, anorexia y atonía ruminal, entre otros.

3.2 Agentes Causales de la Mastitis

Tal como lo menciona Pereyra (2015), citado por Pomaquero (2016), la infección de la glándula mamaria ocurre a través del pezón, una vez las bacterias entran en el conducto proliferan e invaden el tejido mamario causando daño y por ende produciendo una inflamación y más adelante una mastitis clínica.

Entre las bacterias que pueden tener como origen los establecimientos lecheros, y que pueden ser causantes de mastitis, se destacan algunas cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Hernández, et al, 2016).

El mismo autor manifiesta que hay que tomar en cuenta la edad de las vacas, la etapa de lactancia, la estación del año, variación de temperatura ambiental durante el día, variaciones climáticas, condiciones de manejo que generen estrés.

La leche puede servir como un excelente medio de conservación y crecimiento para una gran variedad de microorganismos los cuales pertenecen una gran cantidad de especies de bacterias. Su reproducción depende principalmente de la temperatura y del número de microorganismos presentes así como de sus productos del metabolismo (Pomaquero, 2016).

Se han identificado 138 microorganismos causantes de mastitis, éstos a su vez se clasifican en aquellos que causan mastitis contagiosa es decir, aquellos que se esparcen de los cuartos infectados a otros cuartos y a otros animales; existen aquellos que son habitantes normales de la piel normal del pezón y actúan como oportunistas en la presentación de esta enfermedad, por último, están aquellos microorganismos que se encuentran en el medio ambiente y logran llegar a la glándula mamaria (Romero, 2015).

Las técnicas microbiológicas han permitido la determinación precisa de la identidad de muchos microorganismos patógenos de la mastitis. Clásicamente, estos microorganismos causantes de infección han sido divididos en patógenos contagiosos y ambientales; en base a su asociación epidemiológica con la enfermedad y a su proclividad de causar la infección oportunista, persistente, respectivamente. Dependiendo, además, de su repertorio primario y el ambiente contra el cuarto de la glándula mamaria infectada (Cedeño, 2017).

El mismo autor indica que los microorganismos causantes de mastitis pueden ser agrupados en 3 categorías:

- Los que causan mastitis contagiosa (fundamentalmente *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo y *Mycoplasmas spp*).
- Patógenos comunes del entorno ambiental en que viven las vacas (fundamentalmente coliformes, estreptococos ambientales y estafilococos coagulasa negativos).
- Patógenos no comunes del medio ambiente (*Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, levaduras, *Nocardia asteroides*, el alga incolora *Prototheca spp*, y muchos más).

3.2.1 *Escherichia Coli*

Se halla en cantidades exuberantes en el estiércol de los animales. La frecuencia de presentación agranda al inicio de la lactación y disminuye conforme ésta avanza. La mastitis ocasionada por la *E. coli*, es normalmente esporádica y las señales clínicas varían desde muy severa, incluso formas fatales, a mastitis apacible, donde las vacas tienen sólo señales locales en la ubre (Cedeño, 2017).

Las bacterias Gram negativas *E. Coli*, *Klebsiella spp.*, y *Enterobacter spp.*, son habitantes normales del suelo e intestino de las vacas. Se acumulan y multiplican en la materia fecal y en la cama, pueden causar una variedad de síntomas de la enfermedad, desde una simple inflamación local, hasta severos cuadros de enfermedad y muerte. Una vez que las bacterias pasan el conducto del pezón durante la lactación, los mecanismos de defensa celular y humoral determinan la supervivencia de la bacteria y la duración y severidad de la infección (Actualidad Ganadera, 2020).

A nivel de ganadería bovina es una de las bacterias más conocidas, pues al tratarse de un microorganismo común que forma parte de la microbiota intestinal se lo encuentra como un comensal del intestino. Son bacterias Gram negativas, razón por la cual a tinción Gram se tiñen de rojo. Es un microorganismo que fermenta la glucosa y lactosa, son catalasa positiva, oxidasa negativa y reduce los nitratos a nitritos (Molina, 2015). Incluye siete especies: *E. adecarboxylata*, *E. alberti*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* y *E. Coli*, de acuerdo al mismo autor.

3.2.2 *Streptococcus agalactiae*

El *Streptococcus agalactiae*, es considerado uno de los mayores causantes de infecciones intramamarias en bovinos, es un patógeno contagioso de la glándula mamaria, que puede sobrevivir por largos períodos de tiempo. Este organismo es frecuentemente aislado de la glándula mamaria bovina y de tanques de leche cruda, ya que crece en leche y medios

líquidos. Es una bacteria patógena intramamaria y raramente es encontrado fuera de la glándula según lo menciona Bedolla (2017).

Es una bacteria ubicada en el grupo B (EGB), del género *Streptococcus*, familia *Streptococcaceae*, es Gram positiva, β -hemolítico- catalasa negativa, oxidasa negativa y anaerobio-facultativa, que se caracteriza por presentar en su pared antígenos B y que fortalecen al sistema denominado de Lancefield. Este microorganismo es el agente causal principalmente de la mastitis bovina, enfermedad que produce grandes pérdidas económicas en la industria lechera (Fraile, 2017).

Tal como menciona Zadoks (2020), esta bacteria se caracteriza por su forma esferoidal, con agrupaciones ramificadas en cadenas por lo que se lo clasifica como un estreptococo; así mismo por su forma de teñirse a la coloración Gram se lo ha clasificado por Gram positivo, se lo encuentra localizado en los ductos galactóforos de la glándula mamaria ocasionando mastitis crónica y en ciertos casos mastitis clínica aguda. La forma de contagio de este microorganismo es mediante el ordeño, sea este manual o mecánico. En el manual se trasladan a otras glándulas e incluso pueden hacerlo a otras vacas cuando las condiciones de higiene son precarias. En el caso de ordeño mecánico quien disemina las bacterias es el equipo de ordeño, principalmente si la limpieza del sistema está mal realizada.

Streptococcus agalactiae, no tiene capacidad de invadir a los tejidos internos de la glándula mamaria, sin embargo, colonizan la superficie de los epitelios, por lo que los mecanismos de defensa deben estar presentes a este nivel; cuando logra alcanzar el interior de la glándula se localiza en el seno lactífero del pezón, glándula o ductos galactóforos. Una vez adherido a la pared epitelial, fermenta la lactosa produciendo ácido láctico que irrita a los tejidos, ocasionándose una reacción inflamatoria con leucocitos, fibrina, células epiteliales descamadas y factores plasmáticos, elementos que llegan a ocasionar taponamientos con obstrucción al desplazamiento de la leche (Ruiz, 2015).

Wattiaux (2015), considera que *Streptococcus agalactiae*, es la causa más común de infecciones subclínicas, sin embargo, muy rara vez produce una severa enfermedad, denominada mastitis aguda. Este microorganismo vive en la ubre de la vaca y fuera de la glándula mamaria sobrevive solamente un corto período de tiempo. Además, se caracteriza por su capacidad de infectar también la ubre de una ternera joven si ha sido alimentada con leche contaminada, permanece en forma indefinida en la glándula mamaria de la novilla y es erradicada del hato si se implementa y cumple un tratamiento rigurosamente controlado. Además, *S. agalactiae* se considera un agente patógeno estricto de la ubre bovina, pues puede sobrevivir en ella por largos períodos (Hernández, et al, 2016).

3.2.3 *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria resistente y con tiempo de vida larga, puede permanecer viable en el ambiente de donde llega al ser humano y desde ahí transmitirse a otros individuos (Bachiller y Bachiller, 2018). Es considerado como el principal agente y más importante causante de la mastitis bovina de acuerdo a Zadoks, (2020).

Silva (2014), describe a *Staphylococcus aureus* como cocos Gram positivos de 0,5 a 15 um de diámetro, pueden estar como cocos, diplococos, estreptococos o estafilococos. Anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles y con una formación capsular. En la actualidad en el género *Staphylococcus* se reconocen 32 especies y varias subespecies, pero sólo algunas tienen importancia clínica, así como desde la acción enzimática, según produzcan o no la coagulasa, se dividen en dos grandes grupos:

- *Staphylococcus* coagulasa positivos (ECP).
- *Staphylococcus* coagulasa negativos (ECN).

El mismo autor menciona que este microorganismo es el agente etiológico prevalente de la mastitis a nivel mundial, esta patología inicia con un episodio subclínico o clínico agudo, hasta evolucionar a la cronicidad, pudiendo persistir a lo largo de toda la vida del animal. Además, es necesario tomar en cuenta que el hombre puede infectarse mediante

el consumo de leche que contiene *S. aureus*, bacteria que ocasiona una intoxicación alimentaria debido a las enteró toxinas que produce.

Este patógeno tiene la habilidad de evadir la respuesta inmune del hospedero y sobrevivir dentro de diferentes tipos de células de la glándula mamaria durante un largo periodo sin causar inflamación clínica alguna. El mismo autor manifiesta que *Staphylococcus aureus* puede vivir dentro y fuera de la ubre, de manera que puede causar tanto mastitis clínica como subclínica, esta infección tiende a producir cicatrices que luego se convierten en focos de infección encerrados en la ubre y que son difíciles de alcanzar por los antibióticos (Bachiller y Bachiller, 2018).

S. aureus, se encuentra en la leche y sus derivados, numerosos estudios in vitro han demostrado que esta bacteria puede ingresar y sobrevivir en una línea celular epitelial mamaria bovina pueden estar presentes en las células alveolares y en los macrófagos de la leche de vacas crónicamente infectadas (Hernández, et al, 2016).

3.2.4 Diagnósticos de mastitis

El diagnóstico de la mastitis debe orientarse a la prevalencia de esta en el hato lechero, el tipo de microorganismo y la resistencia bacteriana de los microorganismos involucrados. Los casos de mastitis clínica resultan fáciles de reconocer debido a las evidentes alteraciones que ocurren en la glándula mamaria y su secreción, aunque el diagnóstico del agente causal sólo se logra mediante cultivo microbiológico de la secreción (Zaravia, 2019).

3.2.5 Pruebas de mastitis

El plan de diagnóstico integral de mastitis en un hato requiere de un monitoreo constante con diferentes pruebas, de campo, de laboratorio y en tanque, como, por ejemplo: prueba de palpación, prueba con papel indicador, prueba de Wisconsin, California Mastitis Test (CMT) (Zaravia, 2019).

- **Observación y palpación de la ubre**

Zaravia (2019), manifiesta que la infección puede provocar inflamación de uno, varios o todos los cuartos de la ubre de la vaca, un aumento de la temperatura en el área que está afectada, enrojecimiento de la zona, dolor intenso, todo esto manteniendo la infección únicamente en el área afectada sin alterar otros órganos del animal. El mismo autor, menciona que con la palpación de la ubre y, sobre todo del pezón se aprecian endurecimientos y zonas dolorosas. En la zona de transición de la cisterna mamaria al canal del pezón pueden observarse estrechamientos (aumento del grosor del epitelio) que originan trastornos en la emisión de leche. Si hay una inflamación aguda, el cuarto correspondiente aparece aumentado de tamaño, es doloroso y muestra enrojecimiento con elevación de la temperatura; lo cual se debe comprobar midiendo la temperatura, considerando temperatura elevada a partir de 39°C.



Figura 1. Palpación de la ubre (Aguilar y Álvarez, 2019)

- **Papel indicador de pH**

Con este papel se comprueban las modificaciones del pH de la leche. Según la gravedad de la mastitis, el valor del pH de la leche evoluciona de normal (6,6) a alcalino. El uso de papel indicador se aconseja cuando las alteraciones son muy ostensibles, por lo que, en la actualidad, ha perdido significación (Zaravia, 2019).



Figura 2. Papel indicador de pH (BMeditores, 2018)

- **Prueba de Wisconsin (WMT)**

Se aplica ampliamente para descartar las muestras de leche del rebaño con células somáticas. Los rebaños con una puntuación baja entre 3 y 12, están en condiciones de buena a regular, mientras que los rebaños con puntuaciones superiores a 12, requieren de atención inmediata (Zaravia, 2019).

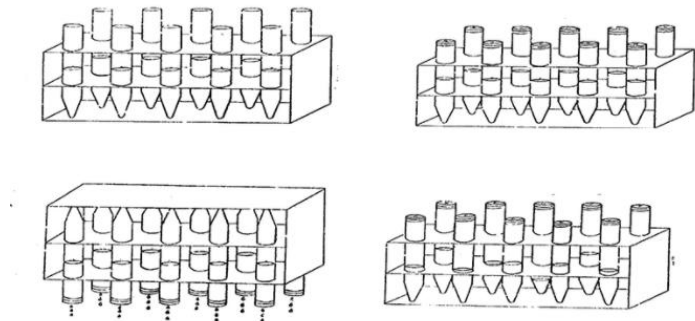


Figura 3. Procedimiento Wisconsin WMT para el diagnóstico de la mastitis subclínica. (BMeditores, 2018)

Tabla 1.

Interpretación para prueba de Wisconsin

Wisconsin (milímetros)	Conteo celular somático	Pérdida de producción
3	140.000	
4	165.000	
5	190.000	5%
6	225.000	
7	260.000	
8	300.000	
9	340.000	
10	380.000	
11	420.000	
12	465.000	
13	515.000	
14	565.000	8%
15	620.000	
16	675.000	
17	730.000	
18	790.000	
19	855.000	
20	920.000	
21	990.000	
22	1'055.000	
23	1'130.000	
24	1'200.000	
25	1'200.000	
26	1'360.000	
27	1'440.000	9 -18%
28	1'525.000	
29	1'610.000	
30	1'700.000	
31	180.000	
32	1'920.000	
33	2'030.000	
34	2'180.000	19 -25%
35	2'280.000	

Fuente: (BMeditores, 2018)

- **California Mastitis Test (CMT)**

La prueba de CMT es una prueba de campo de fácil manejo y buena sensibilidad que se fundamenta en la capacidad que tiene el reactivo Lauril Sulfato de Sodio para reaccionar con el DNA celular produciendo viscosidad directamente proporcional al número de células somáticas presentes en la muestra de leche. Se limpian y secan los pezones, se escurren los 3 o 4 primeros chorros de leche de cada pezón en los compartimentos de la bandeja apropiada. Se inclina la bandeja en un ángulo de 60° para igualar la cantidad de leche en cada uno (deben quedar entre 2 y 4 ml de leche). Se añade una cantidad igual de reactivo y se inicia un proceso suave de agitación por rotación durante 15 a 20 segundos. Se lee e interpreta de la siguiente manera:

- **NEGATIVO:** No existe precipitación por lo tanto no hay infección.
- **TRAZAS:** Ligera precipitación que desaparece al agitar, en este caso es necesario comparar una mama con la otra; si presentan algo de precipitación no se considera infección. Si solamente una mama presenta infección se considera infectada.
- **TIPO 1:** Existe una ligera agitación con algunos filamentos grumosos, al mover la paleta por unos 20 segundos los grumos tienden a desaparecer. No existe la formación de gel.
- **TIPO 2:** Formación de gel apariencia de una clara de huevo.
- **TIPO 3:** Formación de gel rápido, no pierde la forma a pesar de la agitación (Zaravia, 2019)
-



Figura 4. Prueba de CMT (BMeditores, 2018)

Tabla 2.

Interpretación de resultados de la prueba de California para Mastitis

Escala de CMT	Rango relativo del nivel de células somáticas (células/ml)
Negativo	< 200.000
Trazas	150.000 – 500.000
1	400.000 – 1'500.000
2	800.000 – 5'000.000
3	>5'000.000

Fuente: (BMeditores, 2018)

- **Conteo de células somáticas:**

Con el recuento de células somáticas (RCS), como indicador general de la salud de la glándula mamaria, se pueden detectar las vacas que transmitan mayor resistencia a la mastitis; y mejorar año tras año la base genética para reducir la incidencia de mastitis, incrementando al mismo tiempo los beneficios de la ganadería lechera. Todo esto, con base en la heredabilidad, es decir, “el porcentaje del total de variación entre animales, para un rasgo en particular, que se explica debido a los genes que han heredado (Quevedo, 2018).

Luego del parto, el número de células somáticas (CS) es alto, pero desciende rápidamente durante la primera semana de lactancia. El promedio de CS durante la lactancia se encuentra dentro de un número menor a 100.000 CS/ml. Un elevado número éstas CS practicado en leche de tanque es indicio tanto del nivel de mastitis como de la calidad de la leche. En la actualidad, las empresas lácteas realizan los recuentos e informan al productor, ya que los valores son tomados como parámetro para definir la calidad y por ende el precio final de la leche. Los límites de valores aceptables varían en distintos países, sin embargo, se considera que por debajo de las 200000 CS/ml el nivel de infección mastítica, es muy bajo y la leche de muy buena calidad sanitaria (Aldás, 2019).

Tabla 3.

Relación entre conteo de células somáticas y mastitis

Grado CMT*	Rango de Células Somáticas (#células /ml)	Interpretación
N (Negativo)	0 – 200.000	Cuarto normal
T (Trazas)	200.000 – 400.000	Sospechoso de mastitis
1	400.000 – 1´200.000	Mastitis subclínica
2	1´200.000 – 5´000.000	Mastitis Clínica
3	Más de 5´000.000	Mastitis clínica aguda

Fuente: (Aldás, 2019)

3.3 Mecanismo de defensa de la glándula mamaria

Los microorganismos patógenos con capaces de atravesar el canal de la teta, colonizar el sistema de conducción, los alveolos y de causar una respuesta inflamatoria. La inflamación de la glándula o mastitis es en esencia de naturaleza protectora; no obstante, causa un decremento en la producción y calidad de la leche (Díaz y Santiago, 2015).

Los mismos autores mencionan que para reducir la incidencia de infecciones intramamarias en el ganado lechero, se aplican diferentes medidas preventivas durante el ordeño y manejo del ganado. Como por ejemplo el ordeño higiénico, la segregación de vacas con infecciones repetitivas y el uso racional de antimicrobianos reducen notablemente la frecuencia de infecciones en el ganado lechero. Sin embargo, los antibióticos usualmente son poco efectivos contra patógenos ambientales, en particular contra bacterias coliformes y cepas de *Staphylococcus aureus*, que pueden generar una alta proporción de infecciones durante el periodo de lactancia.

3.3.1 Mecanismos no inmunológicos

3.3.1.1 Anatómicos

Los canales del pezón junto con la piel son considerados como la primera barrera de defensa contra los patógenos, cuando la piel se encuentra sana la mayoría de los patógenos tiene limitadas chances de sobrevivir (Aguilar y Álvarez, 2019). El canal

del pezón es la principal puerta de entrada a la ubre de numerosos microorganismos causantes de mastitis. El diámetro del pezón y en menor medida la longitud del mismo, tienen una relación directa con la incidencia de enfermedades intramamarias. A mayor diámetro, mayor tasa de nuevas infecciones (Albeitar, 2018).

3.3.1.2 Solubles

La lactoferrina es una proteína con capacidad para fijar el hierro (Fe), siendo producida por las células epiteliales y fagocitos de la glándula mamaria (Aguilar y Álvarez, 2019). En leche normal, su concentración es baja, pero se incrementa durante la involución de la glándula o durante algún proceso inflamatorio debido a su capacidad de fijar Fe en presencia de bicarbonato, la lactoferrina inhibe el crecimiento de bacterias dependientes de este mineral, limitando significativamente el crecimiento de bacterias productoras de mastitis tales como, Estafilococos y Coliformes (Meglia y Mata, 2017).

De acuerdo a investigaciones de los autores anteriores la lactoperoxidasa requiere de tiocianatos (SCN⁻) y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como substratos para actuar. La lactoperoxidasa, se encuentra siempre presente en leche, y es probablemente producida por el epitelio mamario, mientras que la concentración láctea de SCN⁻ está en relación directa con la concentración de glucósidos de la dieta. No obstante, el accionar de dicho sistema depende de la concentración SCN⁻ y de H₂O₂ en la leche. En la glándula mamaria existe baja tensión de oxígeno, por lo cual la formación de H₂O₂ es muy reducida, limitando así la capacidad de este sistema antibacteriano.

3.3.2 Mecanismos inmunológicos

3.3.2.1 Solubles

El complemento consiste en una serie de proteínas que, una vez activadas, ejercen funciones inmunológicas diversas, tales como opsonización de microorganismos, quimiotaxis de neutrófilos, lisis de bacterias, el complemento llega desde la sangre en respuesta a un proceso inflamatorio. La concentración de complemento en la glándula

mamaria varía dependiendo del momento de la lactancia y del grado de infección de la glándula. Su concentración se halla elevada en calostro, leche mastítica y durante el último tercio de la lactancia (Díaz y Santiago, 2015).

3.3.2.2 Celulares

La secreción láctea posee un componente celular constituido básicamente por macrófagos, polimorfo nucleares neutrófilos (PMN), linfocitos (L) y, en menor medida, células epiteliales, conocido en su conjunto como Células Somáticas (CS). Las CS son un componente normal de la secreción láctea, cuyo número y proporción variará dependiendo del estado fisiológico en que se halle la glándula, como así también de su grado de infección. Durante una infección bacteriana de la glándula las CS se incrementan considerablemente en un periodo de 12 - 24 horas, siendo los PMN el principal componente de este incremento (Díaz y Santiago, 2015).

3.3.2.3 Citokinas

A las citokinas se las define como un grupo de proteínas, sintetizadas naturalmente por una amplia variedad de células que componen o no el sistema inmunitario, tienen varias funciones relacionadas con la respuesta inmunitaria y procesos inflamatorios. Numerosos factores influyen sobre el patrón de secreción de las citokinas y, dependiendo del tipo actuante, predominará una respuesta inmunitaria de base celular o humoral (Meglia y Mata, 2017).

3.4 Cultivos de bacterias a partir de leche

Los cultivos de bacterias tienen, gran importancia, ya que es a través de estos que se puede cuantificar bacterias e identificar los microorganismos causantes de mastitis. La presencia o ausencia de microorganismos específicos ayuda a formular recomendación para prevenir la difusión de agentes infecto contagiosos que se encuentran en el hato lechero (Mera, et al.,2017).

3.4.1 Crecimiento de bacterias Gram-Positivas frente a bacterias Gram Negativas

Para poder determinar frente a qué tipo de bacteria estamos, es decir si son Gram positivas o Gram negativas se utiliza la técnica de Tinción Gram, este tipo de tinción es muy útil ya que de ello depende el tipo de terapia a utilizar.

3.4.2 Cultivo de *Staphylococcus aureus*

Para la identificación de *S. aureus*, es necesario utilizar algunas pruebas bioquímicas y medios de cultivo especiales que permitan la determinación e identificación, fundamentalmente en base a las enzimas y toxinas que produce.

3.4.2.1 Medios específicos

S. aureus crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, cerebro corazón infusión agar (BHI, por sus siglas en inglés) y medios líquidos para hemocultivo donde se recupera fácilmente (Cervantes, 2014).

El mismo autor menciona que el medio recomendable y usado por la mayoría de los laboratorios es el agar sal manitol o medio de Chapman por su elevado contenido de sal que inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas. Este medio permite realizar la identificación presuntiva de *S. aureus* por la pigmentación amarilla característica de este microorganismo. Debido a que esta bacteria fermenta el manitol se genera un cambio de color en el medio que vira de rojo pálido a amarillo. Los *Staphylococcus* coagulasa negativos no fermentan el manitol y crecen en el medio formando colonias pequeñas de color que varía de blanco a rosado.

3.4.3 Cultivo de *Streptococcus agalactiae*

Al igual que para la identificación de otros microorganismos ya sean patógenos o no es necesario realizar varias pruebas bioquímicas y con medios de cultivo especiales las cuales podrán determinar e identificar a este tipo de bacterias.

3.4.3.1 Medios específicos

Este tipo de patógeno puede crecer en medios simples, aunque los medios suplementados con sangre o suero favorecen su crecimiento. Luego de 18-24 h de incubación en agar sangre, las colonias son de unos 2 mm de diámetro, lisas y rodeadas por un halo de β -hemólisis, aunque existen algunas cepas no hemolíticas; en conclusión, el empleo de medios selectivos favorece la recuperación del EGB (Fraile y López, 2017).

Las pruebas bioquímicas más utilizadas con el CANP-test, la hidrólisis del hipurato y la resistencia a discos de bacitracina y cotrimoxazol, aunque ninguna de ellas es específica. En medios de cultivo especiales, el EGB produce un pigmento de color rojo naranja, que es característico, y que permite su identificación directa, sin necesidad de otras pruebas. Las cepas no hemolíticas no producen pigmento.

3.4.4 Cultivo de *Escherichia coli*

La mayoría de microorganismos pueden cultivarse sobre sustratos nutritivos para el estudio de sus propiedades o para la utilización de ciertas propiedades en condiciones controladas.

3.4.4.1 Medios específicos

Al momento de tener una muestra en donde se desee identificar la presencia de *E coli*, hay que definir qué medios son selectivos para entero bacterias (Cervantes, 2014). Los medios selectivos son muy utilizados cuando se trabaja con muestras que provienen de áreas que poseen una flora abundante como: Agar tergitol 7: que permite diferencias especies fermentadoras de lactosa de las especies no fermentadoras, presentando colonias de color amarillo. Agar mackonkey separa las bacterias fermentadoras de la lactosa, produce colonias rosadas (Fraile y López, 2017).

3.5 Apitoxina

La apitoxina como producto apícola es utilizada desde hace miles de años. Cadena (2019), considera que su aplicación de manera general ha sido mediante picaduras directas de abejas en la piel, que es factible al momento a través de administración parenteral con agua y jeringas hipodérmicas; de igual manera, enteral a través del agua de bebida de preferencia vía sublingual.

Yarleque y Wong (2018), mencionan que la apitoxina es una mezcla compleja de compuestos químicos, conocida como veneno de abejas, es secretada por obreras de varias especies de abejas, utilizada como medio de defensa contra predadores y en el combate entre ellas mismas, mediante un ovopositor modificado, conocido como agujón barbado de 2 mm de largo, puntiagudo y 0,1 mm de diámetro, en el estilete existen varios dientes de 0,03 mm de longitud. En estado líquido, recién extraído, tiene naturaleza ácida y alcalina.

3.5.1 Actividad biológica de la apitoxina (*Apis mellifera*)

Las propiedades terapéuticas de la apitoxina, son el resultado de la suma de propiedades de las fracciones que la componen, de la interacción de todas y cada una de ellas, y del equilibrio biomolecular que existe entre sus componentes.

La apitoxina posee, según estudios realizados, varias acciones terapéuticas:

- Antiinflamatoria
- Analgésica
- Anti arrítmica
- Cardiotónica
- Vasomotora
- Hipotensora
- Inmunoactivante
- Radio protector

- Antibiótica
- Antiviral
- Antitumoral (Yarleque y Wong, 2018).

El veneno de abeja o apitoxina se le atribuye diversas actividades tanto biológicas como farmacológicas. Su eficacia ha demostrado en muchas enfermedades infecciosas, neurológicas, reumatoides y como estimulante del sistema inmunológico, de manera especial se destaca la ausencia de anticuerpos para este producto destacándose que el organismo no se acostumbra al mismo (Arteaga, Jáuregui, y Mafla, 2019).

3.5.2 Composición química

La apitoxina, o veneno de abejas que producen las obreras, es extremadamente complejo; tiene tres características: una inflamatoria, otra convulsionante y una tercera paralizadora. Tiene una densidad de 1,131/3, de reacción ácida con un 88% de su peso en agua. También tiene: Acido fórmico, ácido clorhídrico, ácido orto fosfórico, colina, triptófano. Microelementos: Hierro, iodo, potasio, azufre, cloro, calcio, magnesio, manganeso, cobre y zinc, entre otros. Acido gama aminobutírico, glucosa, fructosa, fosfolípidos, aminoácidos y feromonas. El veneno seco presenta hasta un 0,4% de fosfato de magnesio, al cual se le atribuyen muchas de las propiedades de la apitoxina. Es muy rico en sustancias nitrogenadas, ácidos volátiles y diastasas, aparte de las ya nombradas (Díaz, 2020).

Tabla 4.

Composición química de la apitoxina

Compuesto	Fracciones	% de peso
Enzimas	Fosfolipasa A2	10 – 12
	Fosfolipasa B	1
	Hialuronidasa	1 – 2
	Fosfomonoesterasa	1
	alfa – D – Glucosidasa	0,6
	Melitina	40 – 50
	Melitina F	0,01
	Apamina	2 - 3
	Péptido 401 (MCDP)	2 - 3
	Adolapin	1
	Secapin	0,5
	Tertiapin	0,1
	Polipéptidos	Cardiopep
Minimina		2
Inhibidor de proteasa		0,01 – 0,8
Procamina A y B		1,4
Histamina		0,7 – 1,5
Componentes no Péptidos de bajo peso molecular	Dopamina	0,13 – 1
	Noradrenalina	0,1 – 0,7
	5 hidroxitriptamina	0,0005
Otros componentes	Ácido vanilmandelico	0,0005
	Isoamvlacetato	0,0005

Fuente: (Díaz J. , 2020)

De acuerdo al estudio realizado por Arteaga, Jáuregui, y Mafla (2019), la gama de componentes que posee la apitoxina la convierte en un potencial para su uso tal es el caso de alergias, quemaduras de piel, cicatrizante de heridas, infecciones bacterianas, control de tumores cancerígenos, considerándola un excelente estimulante del sistema inmune de seres humanos y animales.

Tabla 5.

Propiedades físico químicas de la apitoxina

Parámetro	Característica
Gravedad específica	<ul style="list-style-type: none"> • 1,1316
Ph	<ul style="list-style-type: none"> • Reacción ácida • En agua • Insoluble en alcohol
Solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> • Soluciones acuosas inestables de marcada descomposición bacteriana • Se ha probado su estabilidad en glicerina. • Unidades de rápido secamiento a la temperatura ambiente. Soporta 100°C durante 1 hora o unidades durante 10 días sin perder su poder.
Efectos térmicos	<ul style="list-style-type: none"> • Presenta unidades de actividad reductora frente al permanganato de potasio, bicromato de potasio, bromo, cloro y peróxido de hidrógeno. Desnaturalizada por amoníaco, ácido pícrico y dicromato de potasio.
Estabilidad química	<ul style="list-style-type: none"> • Las pepsinas, pancreatina, renina y vegetales papaína, papayotina reducen su actividad.
Estabilidad enzimática	<ul style="list-style-type: none"> • Una abeja soporta en la aguijoneada unos 0,0010 mg de Apitoxina seco (0,25 – 0,35 apitoxina líquida). A esto se le llama unidad convencional

(Yarleque y Wong, 2018)

3.5.3 Conservación

Una vez terminado el trabajo de extracción, se colocan las placas que conforman las trampas extractoras en una caja y se los lleva a una habitación seca y oscura donde se evaporará la humedad del veneno a través de los orificios dejados en el látex por la picadura del aguijón, cabe indicar que la muerte de la abeja en una picadura tradicional es por perdida de su aguijón en cambio en este proceso es muy raro la pérdida del mismo y por ende se asegura la vida de tan valioso ser. Al cabo de 24 a 48 horas se puede

proceder a raspar los vidrios para ser después almacenado en condiciones óptimas en frascos ámbar llamados freezer18 y de 3 a 4°C (Díaz , 2020).

Durante todo el proceso productivo se deben extremar los cuidados de manera que:

- No mueran las abejas. Esto es tan importante como la calidad del veneno.
- El veneno, una vez eyectado, no entre en contacto con la abeja. (De otra manera, puede contaminarse con heces de la abeja, polen, miel que regurgite, o elementos que permanecen en el aire). Esto se logra por medio de un filtro.
- El veneno extraído no entre en contacto con el oxígeno. Eso produciría la oxidación y consecuente pérdida de propiedades del veneno.

La calidad de la apitoxina depende de los controles rigurosos que realicen los laboratorios farmacéuticos, como lo son los análisis cuantitativos (HPLC) y cualitativos (químicos y biológicos). Luego de realizada esta verificación, que nos da la tranquilidad de pureza y homogeneidad, es llevado al laboratorio, donde se preparan las soluciones de distintas concentraciones, para luego preparar los productos terminados, que pasan nuevamente por un control de calidad, antes de salir al mercado (Yarleque y Wong, 2018).

CAPÍTULO IV

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

Esta investigación fue desarrollada en las instalaciones de los laboratorios de Microbiología, Biología y Biotecnología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra (PUCESI), Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), los mismos que se encuentran ubicados en el barrio La Victoria, parroquia San Francisco, cantón Ibarra, provincia Imbabura, de acuerdo a las siguientes coordenadas:

- latitud N 0°21'50"
- longitud W 78°15'40"
- altitud 2220 m.s.n.m.

4.2 Equipos, Materiales y Reactivos de laboratorio

4.2.1 Equipos

- Autoclave
- Estufa
- Refrigeradora
- Microscopio
- Cámara de flujo Laminar
- Balanza analítica
- Vortex
- Micro pipeta

4.2.2 Materiales

- Frascos de esterilización
- Placas Petri
- Tubos de ensayo de 10 ml

- Aza de cultivo
- Mechero Bunsen
- Placas porta y cubre objetos
- Gradilla para tubos de ensayo
- Vasos de precipitación
- Pipetas volumétricas
- Pipetas graduadas
- Puntas para micro pipeta

4.2.3 Reactivos

- Agua destilada
- Alcohol potable
- Agar sangre
- Caldo de cultivo Broth

4.3 Métodos

4.3.1 Diseño experimental

Para la investigación, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial $A \times B + 1$, con un total de 10 tratamientos con 3 repeticiones, para un total de 30 unidades experimentales.

4.3.2 Características del experimento

Tabla 6.

Dosis de apitoxina (factor A)

Símbolo	Dosis de apitoxina (mg/ml)
A1	0,7
A2	0,8
A3	0,9

Fuente: La autora

Tabla 7.

Bacterias (factor B)

Descripción	Bacterias
B1	<i>Escherichia coli</i>
B2	<i>Streptococcus agalactiae</i>
B3	<i>Staphylococcus aureus</i>

Fuente: La autora

Tabla 8.

Tratamientos

A1B1	A2B1	A3B1
A1 B2	A2B2	A3B2
A1B3	A2B3	A3B3
Testigo		

Fuente: La autora

Tabla 9.

Esquema del ADEVA

Fuente de variación	G.L.
Total	29
Tratamientos	9
Factor A	2
Factor B	2
INTERACCIÓN A x B	4
Testigo vs resto	1
Error experimental	20

Fuente: la autora

Variables

Variables independientes

- Dosis de apitoxina
 - 0,7 mg/ml
 - 0,8 mg/ml
 - 0,9 mg/ml
- Bacterias
 - *Escherichia Coli*
 - *Streptococcus agalactiae*
 - *Staphylococcus aureus*

Variables dependientes

- UFC (número/ml)
 - Se evalúa contando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) que se forman en la placa Petri mediante un contador de colonias.
- Halos inhibitorios (mm)

- Se mide el diámetro de la zona de inhibición desde el exterior de la placa, sin quitar la tapa, procedimiento que se lo realiza con el uso de un pie de rey.

4.4 Recolección de la apitoxina

El veneno de abejas (*Apis mellifera*) conocido como apitoxina que se utilizó para este ensayo, se la obtuvo comercialmente en el laboratorio LA MELIFERA, laboratorio que se encuentra ubicado en la ciudad de Quito y se encarga de elaborar productos naturales con base en la apiterapia.

4.5 Reactivación de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas, se las obtuvo del cepario del laboratorio de Biotecnología de la escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra, las cuales se encontraban en estado de latencia y se procedió a reactivarlas mediante siembra el caldo de cultivo Broth, el cual se colocó 39 g en 1000 ml de agua destilada, se procedió a autoclavar a 121°C y 1,5 atm de presión por un lapso de 30 minutos.

Una vez esterilizado el medio y los materiales necesarios, se procedió a llevar todo a la cabina de flujo laminar para luego proceder a la siembra de las bacterias y su posterior reactivación, teniendo mucho cuidado para evitar contaminaciones. Una vez realizada la siembra se llevó a la estufa por un lapso de 24 horas a una temperatura de 37°C., al cabo de ese tiempo se observó con facilidad que el caldo de cultivo se encuentra turbio debido a la proliferación de las bacterias

4.5.1 Aislamiento de cepas

Se procedió al traslape de cultivo en cajas Petri y con agar específico, esto es agar sangre, mediante el método de siembra por estrías, así como para su conservación se sembraron en caldo nutritivo, procedimientos realizados con las tres cepas de bacterias objeto de esta investigación.

Todas las cajas Petri en las que se realizaron los cultivos bacterianos fueron llevadas a incubación durante 24 horas y a una temperatura de 37,5°C. Posteriormente se verificó la formación de colonias a través de observación directa.

4.5.2 Antibiograma

El antibiograma se lo realizó con la finalidad de medir la sensibilidad de cada una de las bacterias frente a tres concentraciones de apitoxina para determinar la cantidad mínima inhibitoria para cada una de las bacterias en estudio. En este proceso se utilizó concentraciones de 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml y 0,9 mg/ml de apitoxina por cada mililitro de agua destilada y un testigo absoluto (0,0 mg/ml apitoxina.). Se tomaron cultivos de cepas puras de bacterias cultivadas durante 24 horas sin tratamiento alguno; estas fueron sembradas con aza de Neuwaski estéril en cajas Petri y en agar nutritivo, de manera simultánea se colocaron los discos de papel filtro embebido en cada una de las concentraciones de apitoxina, se colocaron 3 discos por cada caja Petri y con distanciamiento de 30 mm entre cada uno de ellos. Los halos de inhibición formados por la apitoxina fueron medidos en milímetros mediante un pie de rey a las 24 horas de iniciado el proceso.

El protocolo desarrollado para la realización de los antibiogramas es el que se utiliza en los laboratorios de la PUCESI, tal como se detalla a continuación:

- Se autoclava el medio de cultivo a 121°C por un lapso de tiempo de 30 minutos.
- Se deja enfriar el agar sangre hasta llegar a una temperatura de 37°C.
- Se vierte en condiciones asépticas y en cantidad suficiente el medio de cultivo en la placa Petri, hasta lograr una capa de 4 mm de espesor, (para una placa Petri de 10 cm de diámetro se necesita 30 ml de medio de cultivo, mientras que para una placa de 15 cm de diámetro se necesita 70 ml de medio).
- Se deja solidificar el medio de cultivo y se deja secar las cajas Petri por 30 minutos dentro de la cámara de flujo laminar antes de proceder a su inoculación.
- Se inocula la placa con 1 ml de suspensión microbiana y se lleva a incubación a 37°C por un tiempo de 24 horas.
- Se coloca la tapa a cada una de las cajas Petri, se deja secar el inóculo por 3 a 5 minutos.

- Se ubica los discos con las diferentes concentraciones de apitoxina sobre el agar totalmente condensado y frío, mediante el uso de una pinza.
- Se oprime suavemente los discos con una pinza para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo. Los discos se colocan espaciados de manera que su distancia a la pared de la placa sea de 15 mm, en cambio entre ellos a 30 mm.
- Se incuba a 35 – 37°C hasta el siguiente día, (aproximadamente 24 horas).
- Los resultados se leen y confirman a las 24 y 48 horas después de la incubación.
- Se toma como referencia para la medida del diámetro de la zona de inhibición desde el exterior de la placa, sin quitar la tapa, procedimiento que se lo realiza con el uso de un pie de rey.
- Los resultados se analizan de acuerdo con el halo o anillo inhibitorio que presenta cada uno de los discos utilizados, determinándose que en ausencia de halo inhibitorio hay crecimiento bacteriano, calificándose al microorganismo como resistente a la apitoxina.
- El disco que presenta el halo o anillo con mayor diámetro es considerado el más efectivo, en relación a la concentración de apitoxina; es decir el microorganismo analizado es sensible a la CMI de la sustancia en estudio.

4.5.3 Diluciones sucesivas

Para este procedimiento se realizaron las diluciones seriadas con las concentraciones que más inhibieron a cada una de las cepas bacterianas que en este caso fueron las de 0,8 mg/l y 0,9 mg/ml de apitoxina. Para ello se preparó nuevamente agar sangre, se autoclavó el material a utilizar juntamente con el medio de cultivo y se procedió a realizar las diluciones de la siguiente manera: se comenzó con una solución madre en la cual tenemos el caldo de cultivo con la bacteria a analizar, se repartió 9 ml de solución salina en cada uno de los tubos de ensayo. Luego se realizó los pases del tubo madre, tomamos 1 ml de esta solución y lo pasamos al tubo 1 que contiene 9 ml de solución salina dando un total de 10 ml con lo cual obtuvimos una dilución 10^1 ; del tubo 1 tomamos 1 ml de solución y lo llevamos al tubo 2 que de igual manera contiene 9 de solución salina obteniendo la dilución 10^2 , y así continuamos sucesivamente hasta llegar al tubo 9 en donde obtuvimos una dilución 10^9 . Una vez terminado este procedimiento se sembró

en las cajas Petri que previamente se colocó agar sangre tomando 1 ml de cada una de las diluciones, previamente se procedió a pasar los tubos por el vortex para que la agitación sea homogénea, se llevó a la incubadora por 24 horas a 37°C y se procedió a contar las UFC formadas en cada caja Petri.

CAPÍTULO V

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 RESULTADOS

Una vez concluida la fase experimental se procedió a realizar el diseño experimental y los datos obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 10.

Análisis de varianza para la variable halos de inhibición (mm).

FV	GL	SC	CM	F. cal	F.Tab		Signifi- cancia	C.V.
					0.05	0.01		
Total	29	287,382						10,88%
Tratamientos	9	280,049	31,117	84,863	2,393	3,457	ns	
Bacterias	2	128,103	64,052	174,686	3,493	5,849	ns	
Dosis	2	7,802	3,901	10,639	3,493	5,849	ns	
AxB	4	6,416	1,604	4,375	2,866	4,431	ns	
Testigo vs resto	1	137,728	137,728	375,620	4,351	8,096	ns	
E. exp	20	7,333	0,367					

Nota: *=significativo; ns= no significativo

Fuente: la autora

De acuerdo a la tabla 10, se validó la normalidad a través de la prueba Shapiro Wilk y se determinó un p-value de 1,00, es decir mayor a 1 con lo que se acepta la hipótesis nula de normalidad de datos. También se valida la homogeneidad de varianzas ya que el p-value es de 0,02214 por lo tanto no existe homogeneidad de las mismas. El coeficiente de variación de 10,88% lo cual nos indica que la variación de datos es muy dispersa y existe mucha variabilidad de estos en la muestra, esto se debe a que al tener un testigo en el cual no se utilizó ningún antibiótico pues no hubo control ni tampoco se crearon los halos de inhibición por lo que las bacterias crecieron desmesuradamente. Además, se aprecia el análisis de varianza que no existen diferencias significativas.

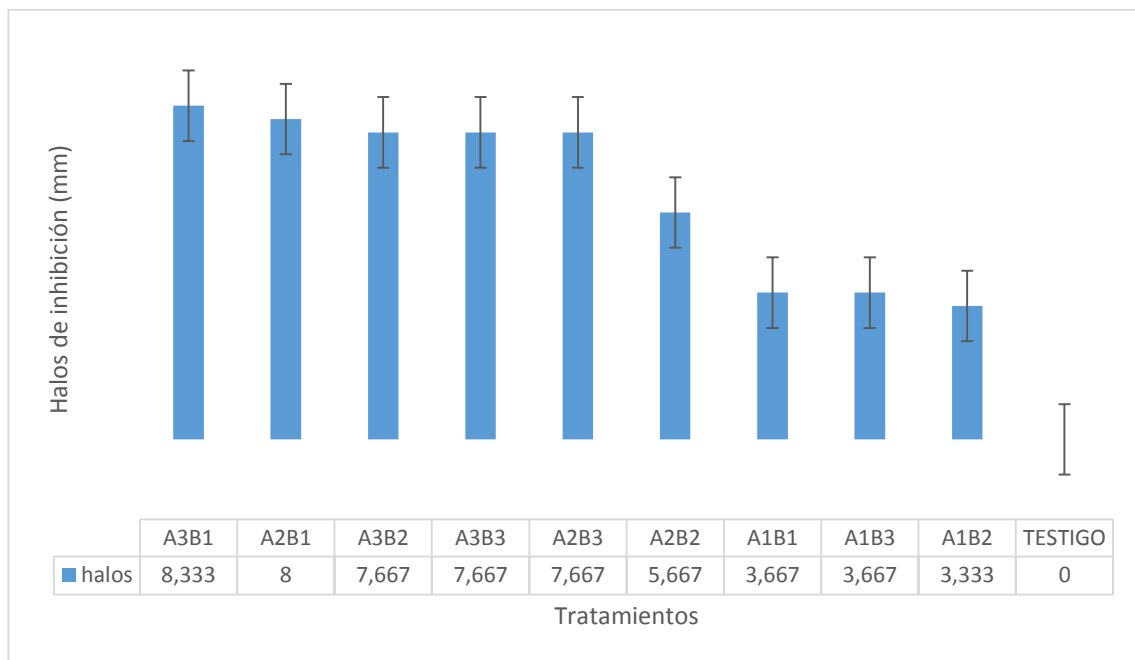


Figura 5. Promedios de tratamientos para la variable halos de inhibición (mm).

Fuente: La autora

De acuerdo a la figura 5, podemos observar los promedios de los tratamientos para la variable halos de inhibición, donde se determinó que el tratamiento con una dosis de 0,9 mg/ml de apitoxina en la bacteria *Escherichia coli* (A3B1), permitió el crecimiento de un halo de inhibición de 8,33 mm, mientras que el testigo al no poseer ningún bactericida no permitió el crecimiento de ningún halo de inhibición, demostrándose el efecto bactericida de la apitoxina.

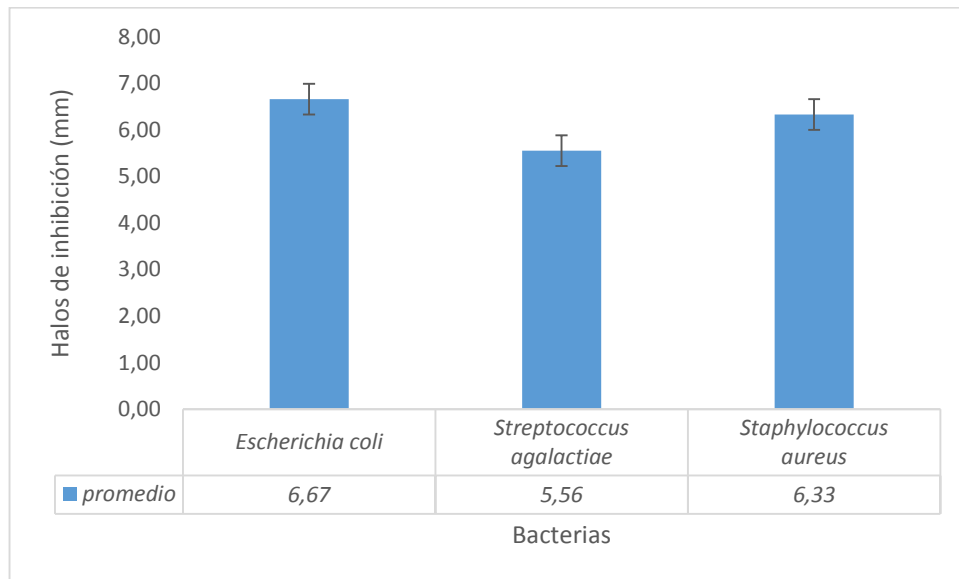


Figura 6. Promedios para la variable halos de inhibición del factor Bacterias

Fuente: La autora

De acuerdo a la figura 6, se determinó los promedios de los halos de inhibición del factor Bacterias, se observa que, *Escherichia coli* es la bacteria que mayor halo de inhibición produjo con un promedio de 6,67 mm.

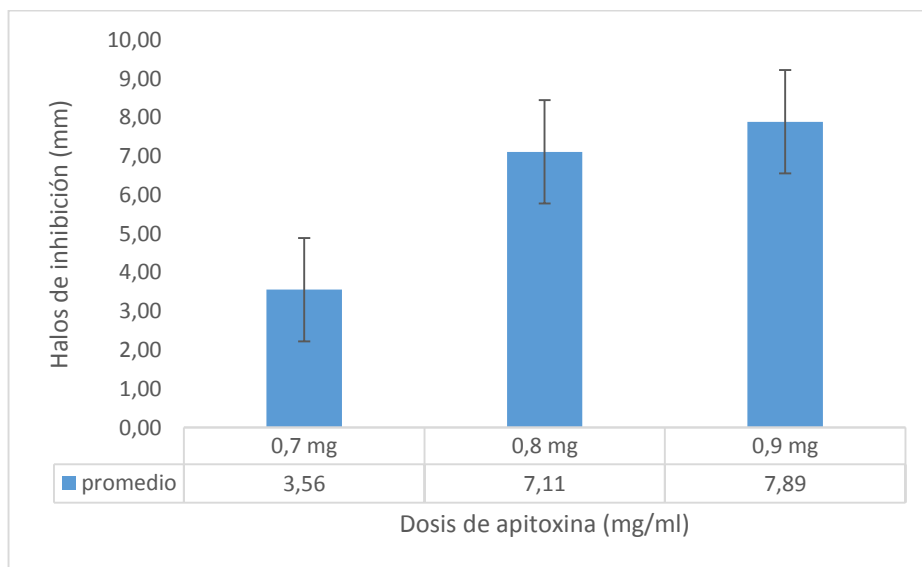


Figura 7. Promedios para la variable Halos de inhibición del factor Dosis

Fuente: La autora

De acuerdo a la figura 7, se determinó los promedios del factor dosis de apitoxina, se puede observar que la dosis de 0,9 mg /ml fue la que mayor efecto tuvo sobre las tres cepas bacterianas en estudio, dando un halo de inhibición de 7,89 mm.

5.1.1 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC)

Una vez determinadas las unidades formadoras de colonia (UFC) para cada una de las bacterias, se procedió a realizar las gráficas para analizar la forma de crecimiento de las bacterias a las 24 horas, 48 horas y 72 horas, con diluciones de siembra de los tres tipos de bacterias de 10^4 , 10^5 y 10^6 . Estas diluciones se las tomó en cuenta ya que las otras diluciones, es decir 10^1 , 10^2 y 10^3 , se hizo imposible contar por la cantidad de bacterias que crecieron en los medios de cultivo pues contenían mayor cantidad de bacterias, mientras que las diluciones 10^7 , 10^8 y 10^9 ya no se apreciaba el crecimiento bacteriano debido a la escasa cantidad de bacterias diluidas y la acción que ejerció la apitoxina sobre estas, por lo que no crecieron.

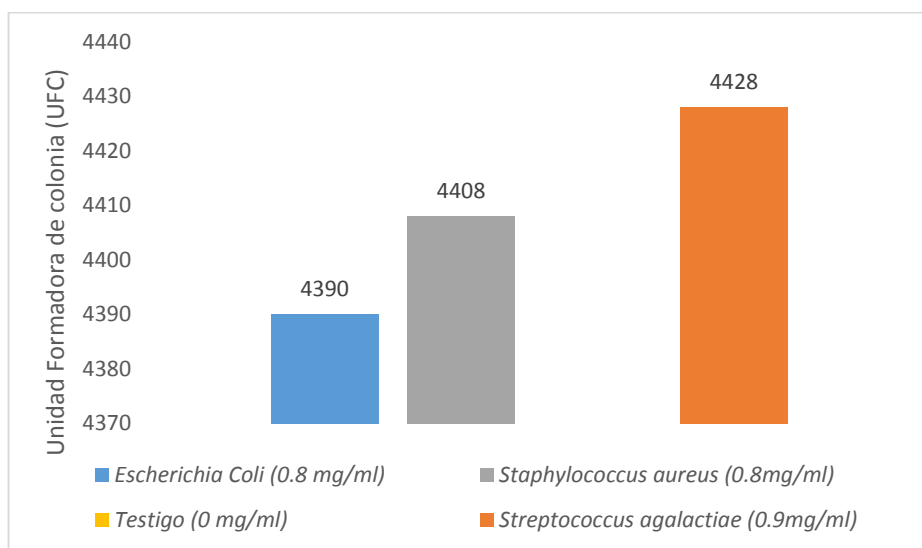


Figura 8. Número de UFC de tres bacterias con una dilución 10^4 a las 24 horas.

Fuente: La autora

Como se observa en la figura 8, se comparó y analizó las tres bacterias a las 24 horas de incubación con una dilución de apitoxina 10^4 mg/ml, obteniéndose una media de 4390 UFC para *E. Coli*, 4408 UFC para *S. Aureus* y 4428 UFC para *S. agalactiae*. Si bien es cierto no se puede establecer una cantidad exacta de la cual de partió en la dilución 10^1 para cada una de las bacterias, pero podemos comprobar que la cantidad de bacterias que se proliferan es muy grande. En la figura el testigo aparece como cero debido a que las unidades formadoras de colonias fueron muy numerosas para contar (MNPC).

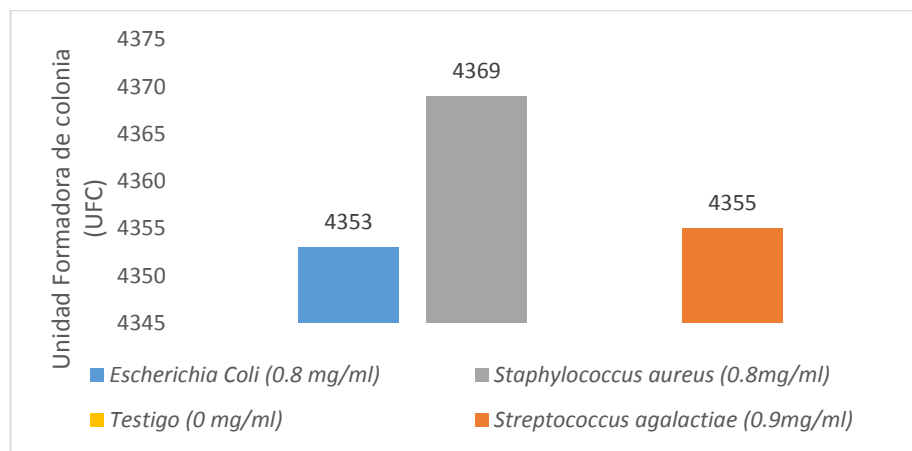


Figura 9. Número de UFC de 3 bacterias con una dilución 10^4 a las 48 horas.

Fuente: La autora

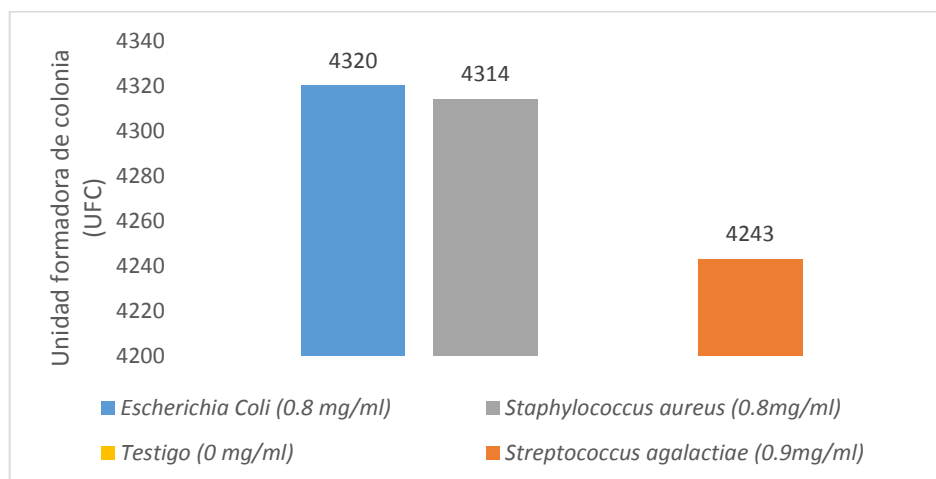


Figura 10. Número de UFC de tres bacterias con una dilución 10^4 a las 72 horas.

Fuente: La autora

En las figuras 8, 9 y 10, podemos observar que el número unidades formadoras de colonia que se obtuvo en la dilución 10^4 transcurrido un lapso de 24 horas entre cada toma de datos existe un decrecimiento de UFC para cada una de las cepas bacterianas, esto es debido a la acción anti bactericida que ejerce la apitoxina, la cual actúa las membranas celulares por ende destruyendo las bacterias. En las tres figuras el testigo aparece como cero debido a que las unidades formadoras de colonias fueron muy numerosas para contar (MNPC).

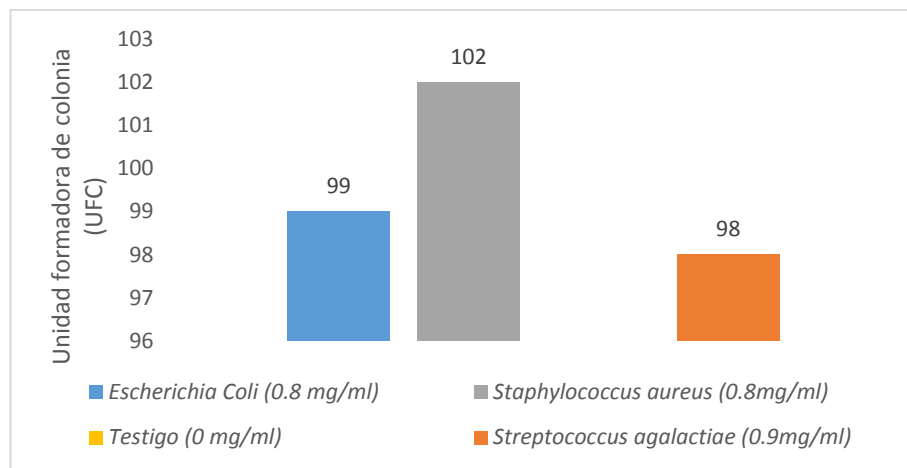


Figura 11. Número de UFC de tres bacterias con una dilución 10^5 a las 24 horas.

Fuente: La autora

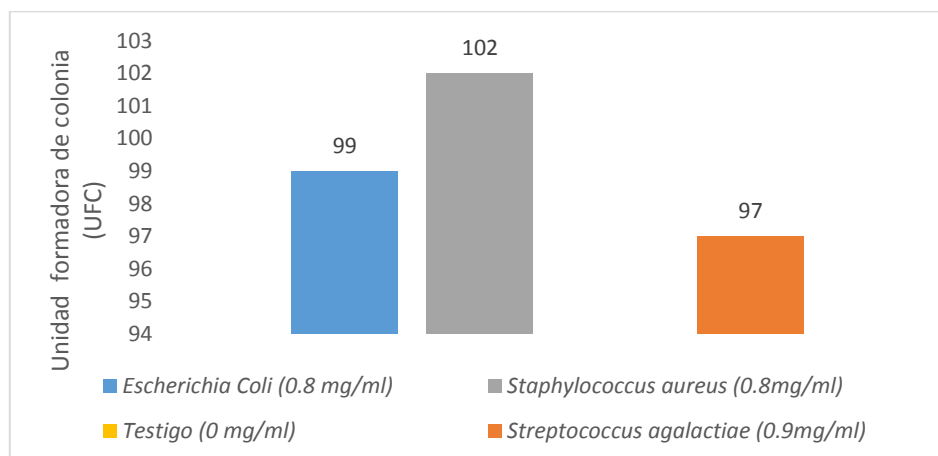


Figura 12. Número de UFC de tres bacterias con una dilución 10^5 a las 48 horas.

Fuente: La autora

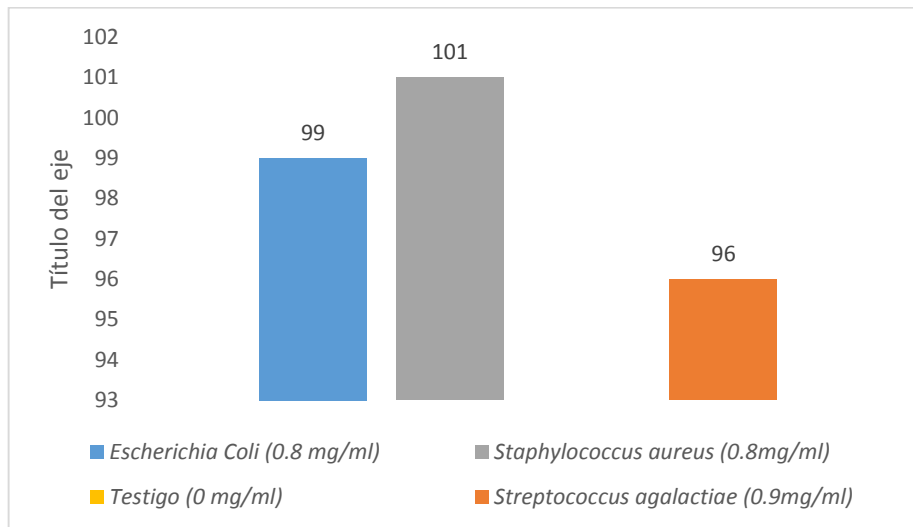


Figura 13. Número de UFC de tres bacterias con una dilución 10^5 a las 72 horas.

Fuente: La autora

Analizando las figuras 11, 12 y 13 respecto a la siembra de 3 cepas bacterianas con una dilución 10^5 , podemos observar que respecto a la dilución 10^4 , hay un decrecimiento notable en cuanto a UFC. Sin embargo, también se puede apreciar que el crecimiento bacteriano cada 24 horas que se tomó los datos se mantiene y en algunos casos decrece, pues la apitoxina hace que las bacterias mueran debido a la acción citotóxica que posee el veneno de las abejas. En las figuras el testigo aparece como cero debido a que las unidades formadoras de colonias fueron muy numerosas para contar (MNPC).

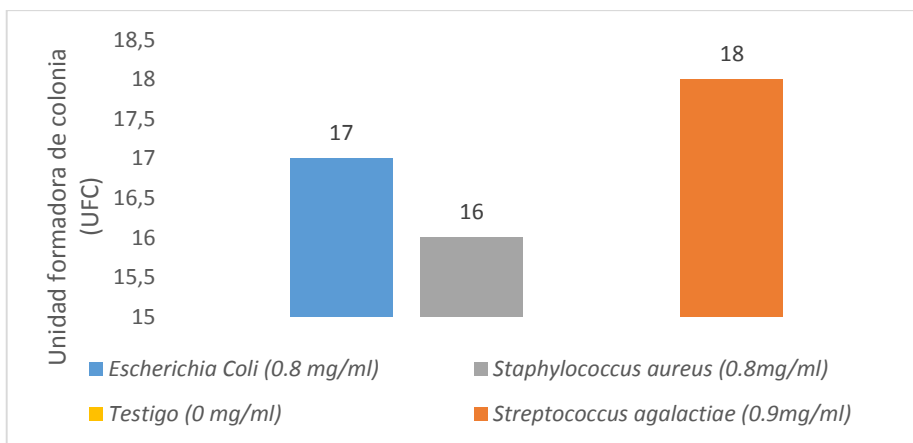


Figura 14. Número de UFC de tres bacterias con una dilución 10^6 a las 24 horas.

Fuente: La autora

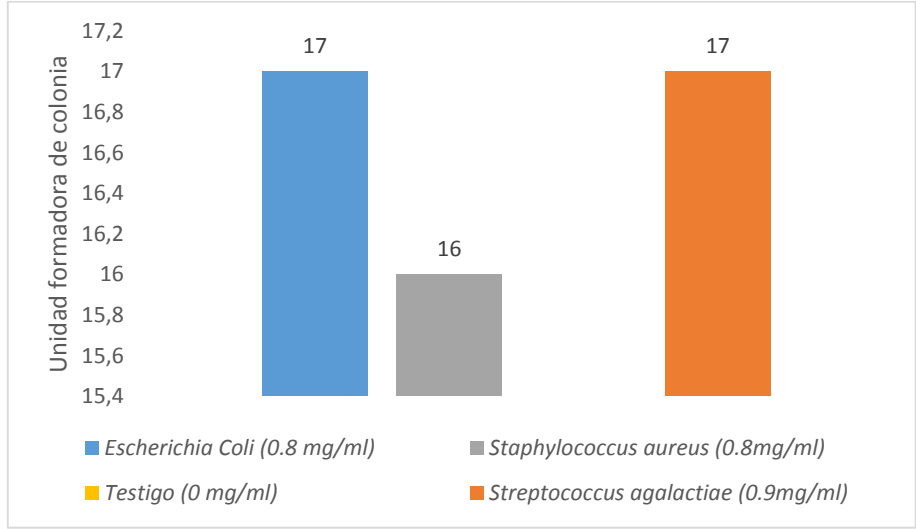


Figura 15. Número de UFC de tres bacterias con una dilución 10^6 a las 48 horas.

Fuente: La autora

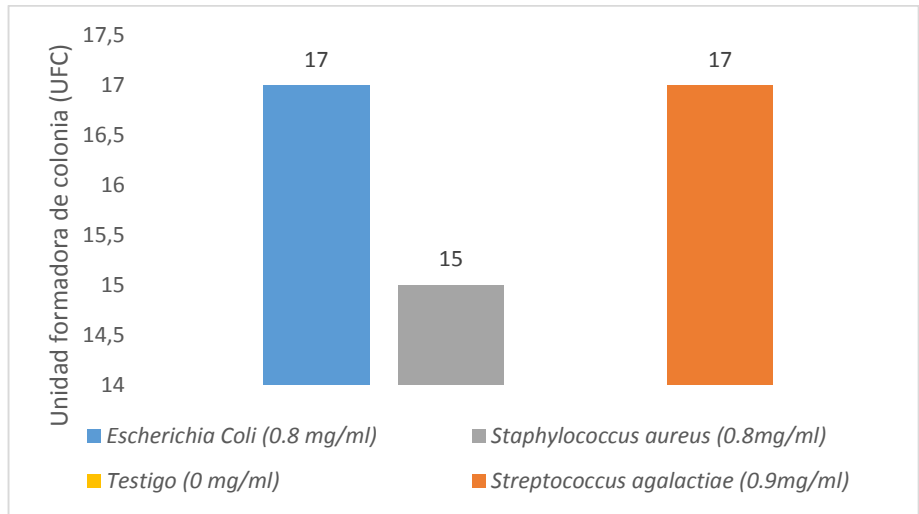


Figura 16. Número de UFC de tres bacterias con una dilución 10^6 a las 72 horas.

Fuente: La autora

Analizando las figuras 14, 15 y 16 respecto a la siembra de 3 cepas bacterianas con una dilución 10^6 , podemos observar que respecto a la dilución 10^4 y 10^5 , nuevamente tenemos que el crecimiento bacteriano es muy limitado, pues existen escasas UFC de cada una de las cepas bacterianas. Sin embargo, también se puede apreciar que el crecimiento bacteriano cada 24 horas

que se tomó los datos se mantiene y en algunos casos decrece. En las figuras el testigo aparece como cero debido a que las unidades formadoras de colonias fueron muy numerosas para contar (MNPC).

5.2 DISCUSIÓN

Los halos de inhibición que se logró en esta investigación en la lectura realizada a las 24 horas de iniciada la fase de incubación, dieron una media general de 6,2 mm, valores que se encuentran por debajo de los encontrados por Aldás (2019); Jáuregui y Mafla (2019), esto pudo ser debido que las lecturas se realizaron a 24 horas de incubación y con apitoxina adquirida en el laboratorio LA MELIFERA, mientras que los investigadores citados trabajaron con apitoxina de cosecha ECAA y a 48 horas de incubación, diferencias que podrían explicar la diferencia de halos en los antibiogramas.

La apitoxina tiene un efecto antibacteriano en las 3 cepas de bacterias, debido a que esta posee péptidos, enzimas, aminos, de manera que estos compuestos interactúan con moléculas específicas de las bacterias investigadas, tal y como lo afirma Monk (2016), quien menciona que la apitoxina es activa frente a bacterias específicas *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* son sensibles al veneno de abejas, en especial atribuida esta cualidad a la melitina, principal componente de esta secreción glandular de insectos como las abejas (*Apis mellifera*); además, se debe tener en cuenta que los microorganismos Gram negativos son más sensibles que los Gram positivos.

Las diluciones seriadas demostraron que hay una acción microbiana de la apitoxina frente a las tres bacterias de interés, de manera que las UFC se vieron disminuidas en cada dilución, incluso se mantuvieron dichas UFC en población la 10^4 , pese al paso de las horas de 24, 48 y 72 horas, demostrándose de esta manera una posible acción bactericida tal como lo demostraron Arteaga, Jáuregui y Mafla (2019) en un estudio de enterobacterias de cuyas controladas con soluciones acuosas de apitoxina, de igual manera Aldás (2019), realizó controles de antibiogramas en bacterias patógenas para bovinos y con soluciones hídricas de apitoxina.

5.3 SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS

En esta investigación como tercer objetivo se planteó la difusión de los resultados que se alcancen a personas interesadas en esta problemática, mediante una salida de campo, para lo cual se realizó una reunión en la cual se contó con la participación de 15 pequeños productores de la comunidad La Rinconada de la parroquia La Esperanza del Cantón Ibarra, provincia de Imbabura. Se repartieron encuestas a los participantes al evento, lo cual busca implementar mejoras en los procesos de socialización de los trabajos de investigación con los siguientes resultados:

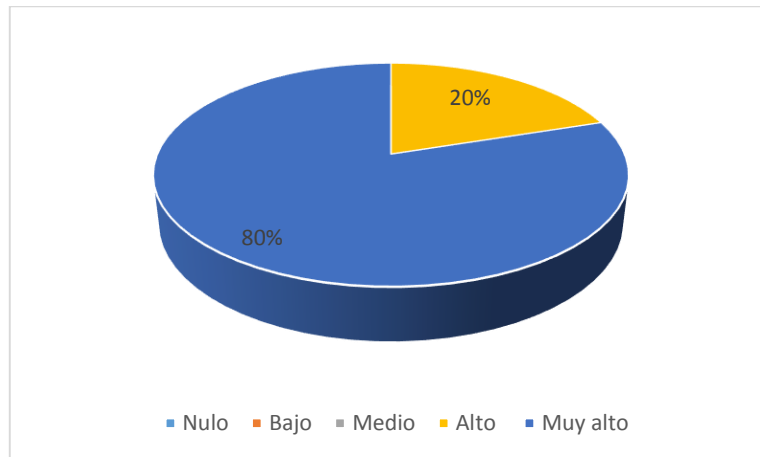


Figura 17. ¿Considera usted que la sala se desarrolló este evento brindando las comodidades necesarias?

Fuente: La autora

En la figura 17, se puede apreciar que el 80% de los participantes se inclinaron por la opción de muy alto nivel de satisfacción respecto a la sala en la que desarrolló la exposición para la socialización del proyecto y el 20% por la opción alto nivel, lo cual nos indica que todo se realizó muy bien y los participantes estuvieron bien.

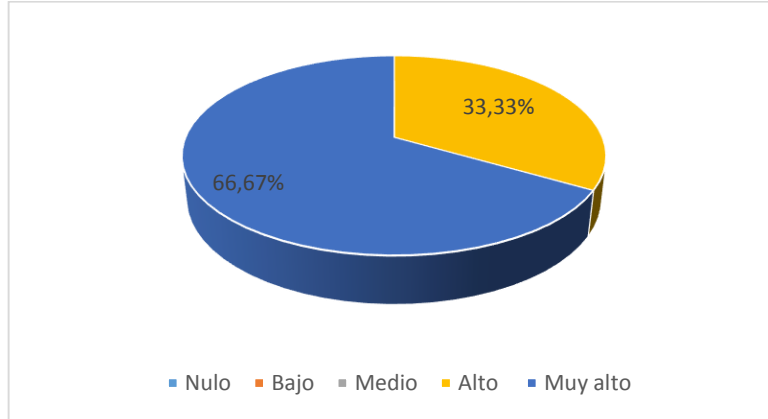


Figura 18. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?

Fuente: La autora

En la figura 18, se puede apreciar que el 33,33% de los participantes se inclinaron por la opción de muy alto nivel, mientras que el 66,67% indicaron un alto nivel de satisfacción respecto al material audiovisual que se utilizó para la socialización del proyecto de investigación.

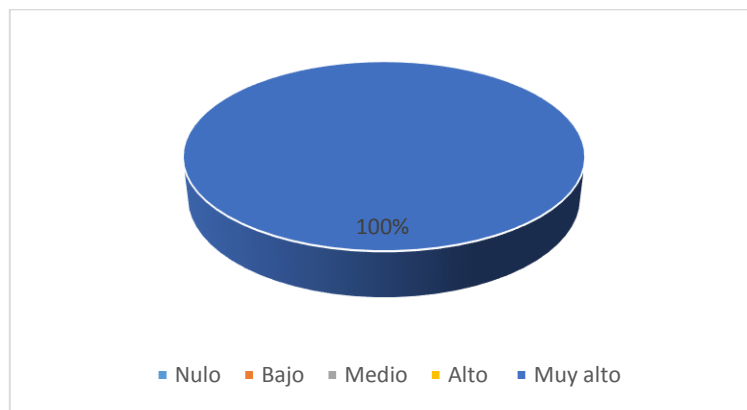


Figura 19. ¿Considera Usted que el expositor mostro dominio del tema?

Fuente: La autora

En la figura 19, se aprecia que el 100% de los participantes indican que el expositor tuvo un muy alto nivel referente al dominio del tema tratado en la socialización del proyecto de investigación.

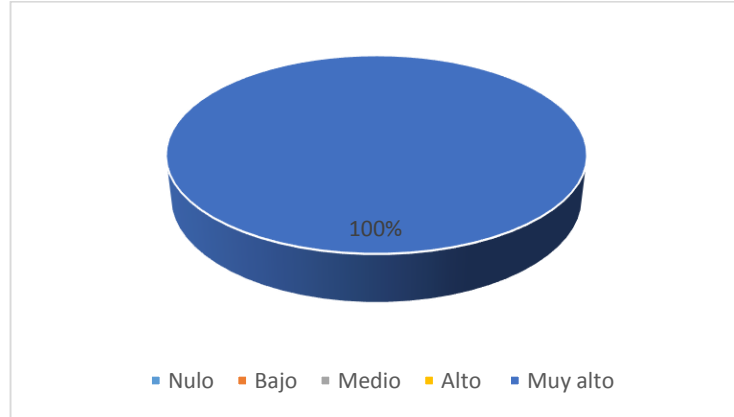


Figura 20. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?

Fuente: La autora

En la figura 20, se puede apreciar que el 100% de los participantes se inclinaron por la opción de alto nivel de satisfacción respecto al dominio que demostró el expositor para manejar el auditorio en la socialización del proyecto de investigación.

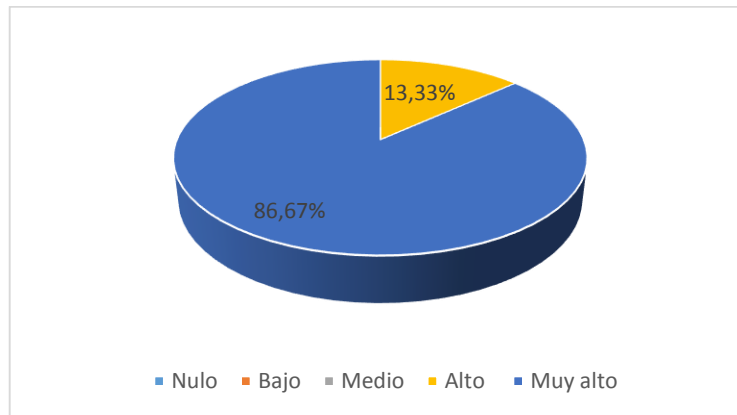


Figura 21. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?

Fuente: La autora

En la figura 21, se puede apreciar que el 100% de los participantes se inclinaron por la opción de alto nivel de satisfacción respecto a la facilidad de expresión demostrada por el expositor para exponer el tema en la socialización del proyecto de investigación.

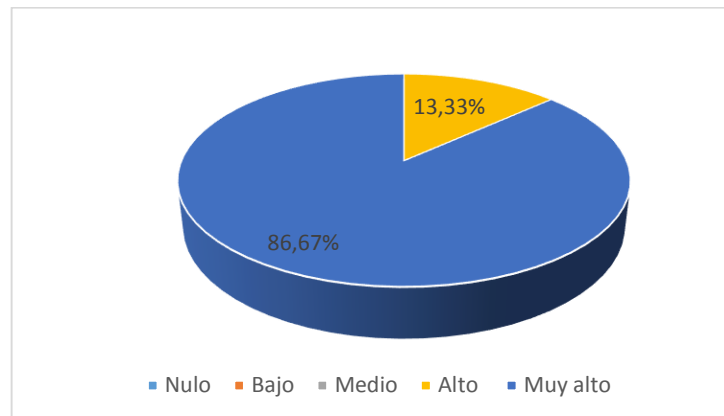


Figura 22. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?

Fuente: La autora

En la figura 22, se puede apreciar que los participantes escogieron el 86,67% la opción de muy alto nivel y un 13,33% la opción de alto nivel de satisfacción referente a la relevancia que presenta el tema investigado, motivo de socialización.

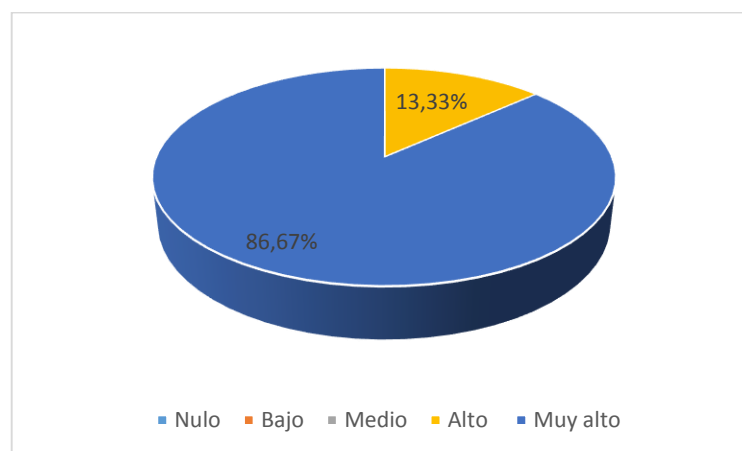


Figura 23. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios completamente posteriores?

Fuente: La autora

En la figura 23, se puede apreciar que el 86,67% de los participantes optaron por la opción de muy alto nivel y un 13,33% del auditorio escogieron la opción de alto nivel de satisfacción

referente a las perspectivas que el tema presenta frente a estudios posteriores que pudieran suscitarse.

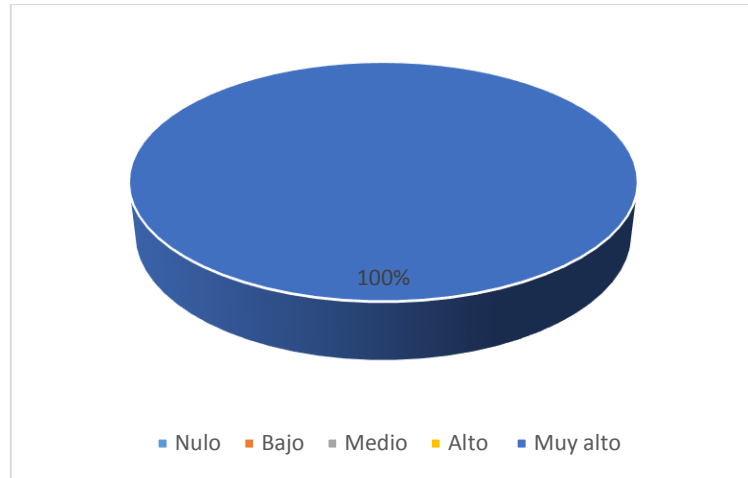


Figura 24 ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?

Fuente: La autora

En la figura 24, se puede apreciar que el 100% de los participantes optaron por la opción de muy alto nivel de satisfacción referente a los beneficios a futuro que esta investigación podría brindar a los dueños de fincas que deseen trabajar con hidrolatos en sustitutos de los productos químicos.

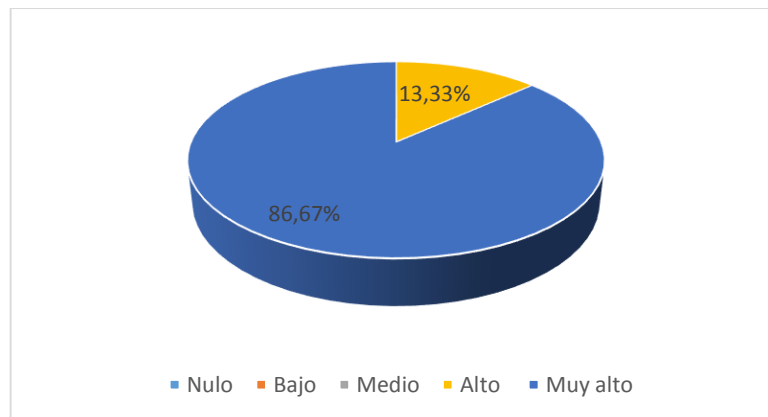


Figura 25. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?

Fuente: La autora

En la figura 25, se puede apreciar que el 86,67% de los participantes optaron por la opción de muy alto nivel y un 13,33% del auditorio escogieron la opción de alto nivel de satisfacción referente al cumplimiento de los objetivos planteados en esta investigación.

CAPÍTULO VI

6 CONCLUSIONES

- Realizada la fase experimental se determinó que las concentraciones mínimas inhibitorias para cada una de las bacterias son: para *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* 0,8 mg/ml de apitoxina, mientras que *Escherichia coli* 0,9 mg/ml. Los promedios de los halos inhibitorios para cada una de las bacterias fueron de 7,9 mm para *Escherichia coli*, 7,5 mm para *Staphylococcus aureus* y 7,86 mm para *Streptococcus agalactiae*, estos diámetros se encuentran dentro de los parámetros aceptables de conformidad con la literatura referente al uso de la apitoxina, con lo cual podemos concluir que la apitoxina si tiene un control antibacteriano sobre las 3 bacterias en estudio.
- En la segunda fase correspondiente a las unidades formadoras de colonias, se logró determinar que la apitoxina si tiene un efecto bactericida en las tres bacterias en estudio, incluso se logró detener el crecimiento de las UFC y hasta disminuirlas en el transcurso de las horas, esto es a las 72 horas de incubación.
- En la socialización de la investigación se logró el objetivo propuesto en donde los participantes mostraron interés por el trabajo realizado y se comprometieron a implementar el uso de la apitoxina como anti bactericida en el tratamiento de la mastitis bovina que les causa muchas pérdidas económicas.

CAPÍTULO VII

7 RECOMENDACIONES

- Considerando que la apitoxina tiene cualidades antibacterianas, se recomienda su uso rigurosamente dosificado para no causar resistencia bacteriana, de manera especial frente al flagelo que constituye la mastitis bovina a nivel mundial.
- Realizar investigaciones en otro tipo de bacterias causantes de otras enfermedades para poder respaldar las cualidades terapéuticas y bactericidas de la apitoxina.
- Si bien es cierto que, a nivel de laboratorio el resultado de esta investigación fue positivo, sería conveniente que esto se lo traslade al campo y se trate a los diferentes tipos de mastitis para corroborar lo realizado en este ensayo.
- Buscar en los productos apícolas una alternativa natural y factible de utilizarse para diferentes dolencias y patologías de los bovinos en especial y de todos los animales en general.

CAPÍTULO VIII

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Actualidad Ganadera. (2020). *Daño en el tejido mamario durante la mastitis bovina*. Obtenido de <https://actualidadganadera.com/dano-en-el-tejido-mamario-durante-la-mastitis-bovina-parte-iii/> .
- Aguilar, F., y Alvarez, C. (2019). *Mastitis Bovina*. (UTMACH, Ed.) Recuperado de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/15205/1/MASTITIS-BOVINA.pdf>
- Albeitar. (2018). Bienestar en el ordeño. *Albeitar*(216). Obtenido de https://issuu.com/editorialservet/docs/albeitar_216_mr .
- Aldás, B. S. (2019). *“Potencial bactericida o bacteriostático del veneno de abejas (Apis mellifera) para*. Ibarra.
- Arteaga, V., Jáuregui, D., y Mafla, S. (2019). La apitoxina, un atenuante de la Inteligencia de enterobacterias patógenas para cuyes (*Cavia porcellus*). *Axioma*, 8.
- Bachiller, M., y Bachiller, J. (2018). *Efecto antibacteriano in vitro de apitoxina comercial de Apis mellifera frente a cepas de Staphylococcus aureus ATCC 25923, y su comparación con ceftriaxona, meropenem y penicilina benzatínica*. Tesis de grado, Universidad María Auxiliadora, Lima. Recuperado de <http://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/UMA/166/2018-7%20FYB.pdf?sequence=1&isAllowed=y> .
- Bedolla, C. (2017). Etiología de la mastitis bovina. *Sito Argentino de Producción Animal*. Obtenido de https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/128-Etiologia.pdf
- BMeditores. (2018). *Oruebas y métodos para el diagnóstico de mastitis*. Obtenido de <https://bmeditores.mx/ganaderia/pruebas-y-metodos-para-el-diagnostico-de-mastitis-ii-1705/> .
- Bonifaz, N. y. (2016). Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba de California Mastitis Test con identificación del agente etiológico, en Paquiestancia, Ecuador. . *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 24(2):43-52. IS, 16.

- Cedeño, C. (2017). Etiología de la mastitis bovina. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1-7.
- Cervantes, E. ,.-G.-S. (2014). Características generales del Staphylococcus. *Revista latinoamericana de Patología clínica*, 13.
- Chacón, F. (2017). *Evaluacion de los análisis físico químicos de la leche bovina*. Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca. Recuperado el 18 de 03 de 2021, de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13538/1/UPS-CT006912.pdf> .
- Díaz, F., y Santiago, J. (2015). Mecanismos de defensa de la glándula mamaria bovina en las fases de involución y lactación. *Redvet* 4.
- Díaz, J. (2020). *La Apitoxina*. Obtenido de <https://apiterapiadoctordiaz.com.ar/wp-content/uploads/2020/07/Librato-Apitoxina.pdf> .
- ESPAE. (2016). *Estudios industriales. orientación estratégica para la toma de decisiones, Industria de ganadería de carne*. Obtenido de <https://www.espae.espol.edu.ec/wp-content/uploads/2016/12/industriaganaderia.pdf>.
- Gálvez, F. y Alvarez, C. (2018). *Mastitis Bovina*. (UTMACH, Ed.) Recuperado el 18 de 03 de 2021, de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/15205/1/MASTITIS-BOVINA.pdf> .
- Frailé, R., y López, M. (2017). Streptococcus agalactiae. Obtenido de www.seimcorg/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriología/agalac.pdf .
- Hernandez, J., Merchán, M., Benavidez, D., y Prado, C. (2016). Agentes etiológicos de mastitis bovina en municipios con importante producción lechera del departamento de Boyacá. *Investigación en salud Universidad de Boyacá*, 2. Recuperado de <http://200.21.15.145/index.php/rs/article/view/135/131> .
- Meglia, G., y Mata, H. (2017). Mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche. *Ciencia Veterinaria*. Obtenido de <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1990/1946> .
- Mendoza, J., Vera, Y., y Peña, L. (2017). Prevalencia de Mastitis subclínica, microorganismos asociados y factores de riesgo identificados en hatos de la provincia de Pamplona Norte de Santander. *Revista Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 64(2), 15. Recuperado el 0216 de 2021, de <https://www.redalyc.org/pdf/4076/407653893002.pdf> .

- Mera, R., Esponiza, M., Artieda, J., Ortíz, p., González, R., y Vega, V. (2017). mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche. *REDVET*, 17. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/636/63653574004.pdf> .
- Molina, J. y. (2015). *Escherichia coli* *diarrogénica*. Obtenido de www.facmed.unam.mx/deptos/microbiología/bacteriología/escherichia-coli.html .
- Monk, J., y Bechaut, L. y. (2016). Inhibitory effects of sucrose monolaurate, alone and in combination with organic acids, on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*.
- Oñate, J. (2018). *Cadena agroalimentaria de la leche vacuna en Ecuador y sus potencialidades exportadoras. Periodo 2008-2015*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Economía, Quito. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14641/Disertaci%C3%B3n%20Jos%C3%A9%20Miguel%20O%C3%B1ate%20Haro.pdf?sequence=1&isAllowed=y> .
- Pereyra, E. D. (2014). Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. 363 - 375. Obtenido de <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v46n4/v46n4a14.pdf> .
- Pomaquero, M. (2016). *Estudio integral de la mastitis bovina para controlar su incidencia en la comunidad de San Pedro de Iguazo*. Tesis de grado, Riobamba. Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7075/1/17T1450.pdf> .
- Quevedo, W. (2018). Recuento de células somáticas (RSC) como indicador en la resistencia de la mastitis bovina. *Ciencia y Tecnología e Innovación*, 16(17), 12. Obtenido de http://www.scielo.org.bo/pdf/rcti/v16n17/v16n17_a05.pdf .
- Romero, R. A. (2015). *Etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio. Mastitis Bacteriana en ganado bovino*.
- Ruiz, A. (2015). *Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio*. Obtenido de www.ammvEb.net/articulos/mastitis_bacteriana.pdf .
- Silva, S. G. (2014). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus of lineage ST398 as cause of mastitis in cows*. Obtenido de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus of lineage ST398 as cause of mastitis in cows*: www.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/lam.12329 .

- Smith, L. y. (2017). Environmental Mastitis. *Veterinary Clinics of North América: Food Animal Practice*, volumen 9, Issue 3,, 489 - 498. Obtenido de www.sciencedirect.com/article/pii/S0749072015306172 .
- Wattiaux, M. (2015). *Mastitis: la enfermedad y su transmision. Instituto Babcock*. Obtenido de Mastitis: la enfermedad y su transmision. Instituto Babcock: <https://federated.kb.wisc.edu/images/group226/52749/19-25/23mastitistaenfermedadysutransmision.pdf> .
- Yarleque, M. E., y Wong, J. D. (2018). *Efecto antibacteriano in vitro de apitoxina comercial de Apis mellifera frente a cepas de Staphylococcus aureus ATCC 25923, y su comparación con ceftriaxona, meropenem y penicilina benzatínica*. Obtenido de <http://repositorio.uma.edu.pe/handle/UMA/166> .
- Zadoks, R. N. (2020). *Molecular and mathematical epidemiology of Staphylococcus aureus and Streptococcus uberis mastitis in dairy herds*. Obtenido de Staphylococcus aureus: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infeciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf .
- Zaravia, J. (2019). *Microorganismos ausales de mastitis en el centro de producción y fomento vacuno de Callqui (CEPROFOVAC)*. Tesis de grado, Perú. Recuperado el 24 de 03 de 2021, de <http://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/2983/TESIS-2019-ZOOTECNIA-ZARAVIA%20VALLADOLID.pdf?sequence=1&isAllowed=y> .

9 ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo



Fuente: la autora

Anexo 2. Pesaje de nutriente broth para el caldo cultivo (la autora)



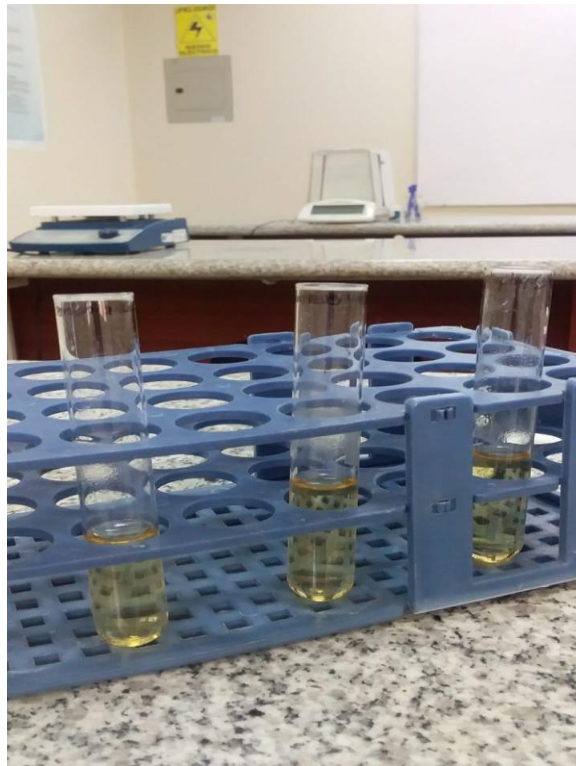
Fuente: la autora

Anexo 3. Agar diluido en agua



Fuente: la autora

Anexo 4. Tubos de ensayo con medio de cultivo



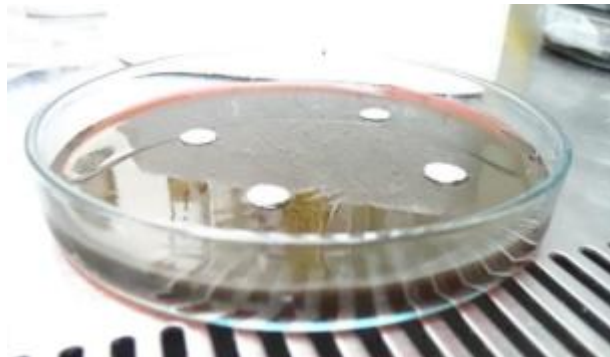
Fuente: la autora

Anexo 5. Conservación de cepas en caldo nutritivo



Fuente: la autora

Anexo 6. Discos de papel filtro con apitoxina en placa con agar



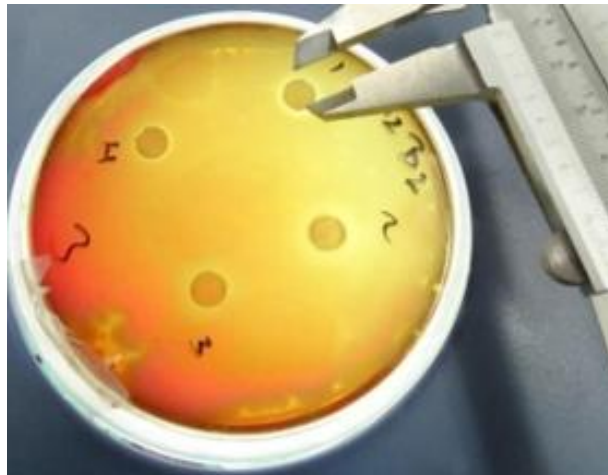
Fuente: la autora

Anexo 7. Incubación de bacterias de interés



Fuente: la autora

Anexo 8. Medición de halos de inhibición para *Streptococcus agalactiae* a las 24 horas



Fuente: la autora

Anexo 9. Medición de halos de inhibición para *Escherichia coli* a las 24 horas



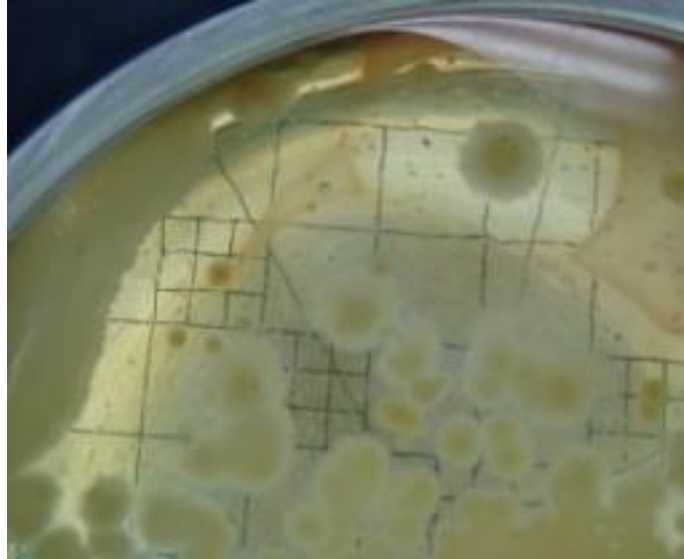
Fuente: la autora

Anexo 10. Halos de inhibición para *Staphylococcus aureus* a las 24 horas



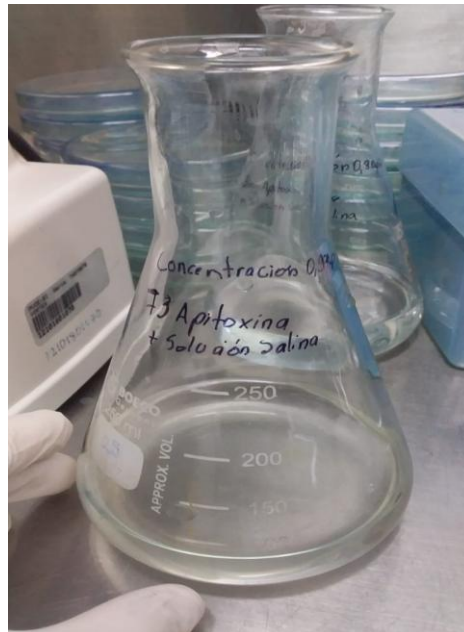
Fuente: la autora

Anexo 11. Colonias de Staphylococcus aureus a las 24 horas



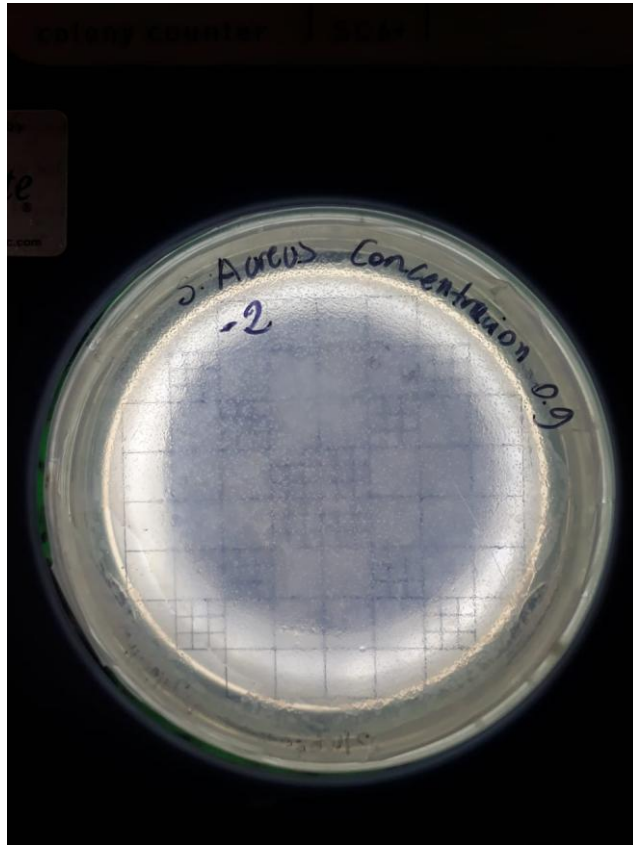
Fuente: la autora

Anexo 12. Apitoxina y solución salina



Fuente: la autora

Anexo 13. *Staphylococcus aureus*



Fuente: la autora

Anexo 15. Datos de campo, concentración mínima inhibitoria

Dilución ⁻⁴ /24horas/37°C			
<i>Escherichia</i>	<i>C Streptococcu</i>	<i>Staphylococci</i>	Testigo (0 mg/ml)
4265	4445	4380	MNPC
4470	4545	4665	
4435	4295	4180	
Dilución ⁻⁴ /48horas/37°C			
<i>Escherichia</i>	<i>C Streptococcu</i>	<i>Staphylococci</i>	Testigo (0 mg/ml)
4210	4350	4300	MNPC
4418	4535	4635	
4431	4180	4171	
Dilución ⁻⁴ /72horas/37°C			
<i>Escherichia</i>	<i>C Streptococcu</i>	<i>Staphylococci</i>	Testigo (0 mg/ml)
4181	4324	4201	MNPC
4408	4265	4590	
4370	4140	4150	

Dilución ⁻⁵ /24horas/37°C			
<i>Escherichia</i>	<i>C Streptococcu</i>	<i>Staphylococci</i>	Testigo (0 mg/ml)
99	100	107	MNPC
105	100	99	
92	95	99	
Dilución ⁻⁵ /48horas/37°C			
<i>Escherichia</i>	<i>C Streptococcu</i>	<i>Staphylococci</i>	Testigo (0 mg/ml)
98	97	107	MNPC
105	100	99	
94	95	99	
Dilución ⁻⁵ /72horas/37°C			
<i>Escherichia</i>	<i>C Streptococcu</i>	<i>Staphylococci</i>	Testigo (0 mg/ml)
98	97	106	MNPC
105	96	98	
93	94	99	

Dilución ⁻⁶ /24horas/37°C			
Escherichia C	Streptococcu	Staphylococc	Testigo (0 mg)
19	17	16	
15	17	17	MNPC
18	21	15	
Dilución ⁻⁶ /48horas/37°C			
Escherichia C	Streptococcu	Staphylococc	Testigo (0 mg)
19	16	16	
15	16	16	MNPC
17	19	15	
Dilución ⁻⁶ /72horas/37°C			
Escherichia C	Streptococcu	Staphylococc	Testigo (0 mg)
19	16	15	
15	16	15	MNPC
17	18	14	

Nota. MNPC = Muy numeroso para contar