



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

**Eficacia sinérgica antimicrobiana de *miel de Apis mellifera* con
vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino
resistente in vitro**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
Médico Cirujano

AUTOR:

Cerna Yupanqui, José Junior (ORCID: 0000-0002-3907-8484)

ASESORES:

Dra. Chian García, Ana María (ORCID: 0000-0003-0907-5482)

Dra. Llaque Sánchez, María Rocío Del Pilar (ORCID: 0000-0002-6764-4068)

Mg. Polo Campos, Jaime Abelardo (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Enfermedades infecciosas y transmisibles

TRUJILLO - PERÚ

2020

DEDICATORIA

A mis padres

Por todo el apoyo y amor incondicional que fueron mi fortaleza para superar cada obstáculo presente en este largo camino, sus enseñanzas fueron y serán esa luz que guía cada paso que me llevó a este momento.

Cualquier lugar adonde vaya o camino que tome, siempre estarán en mi corazón.

Cerna Yupanqui, José Junior

AGRADECIMIENTO

A Dios, nuestro creador por las muchas bendiciones que me ha otorgado y darme la oportunidad de avanzar y poder cumplir mis sueños.

A mis padres, por todo su sacrificio y apoyo en las decisiones que he tomado, así como los valores inculcados para poder ser un buen profesional.

A mis asesores, Dra. Chian y Dr. Polo, por los conocimientos, tiempo y dedicación en el proceso de realización del presente trabajo.

A mis maestros, por todos los conocimientos y experiencias brindados durante los años de mi formación profesional.

De la misma manera manifiesto un especial agradecimiento a los miembros del jurado de tesis.

Cerna Yupanqui, José Junior

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
III. METODOLOGÍA	12
3.1.-TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	12
3.2.-VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN (ANEXO 02)	12
3.3.-POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO	12
3.4.-TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD	13
3.5.-PROCEDIMIENTOS (ANEXO 06)	13
3.6.-MÉTODO DE ANÁLISIS DE DATOS	13
3.7.-ASPECTOS ÉTICOS	13
IV. RESULTADOS	14
V. DISCUSIÓN	18
VI, CONCLUSIONES	22
VII. RECOMENDACIONES	23
REFERENCIAS	24
ANEXOS	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Test de Fisher utilizado para la comparación de la eficacia sinérgica antimicrobiana de miel de *Apis mellífera* y vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Tabla 2. Efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellífera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Tabla 3. Efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellífera* asociado a vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Tabla 4. Efecto antibacteriano de la vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la eficacia sinérgica antimicrobiana de la miel de *Apis mellifera* con vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente in vitro; considerándose 4 grupos de tratamiento: miel de *Apis mellifera*, miel de *Apis mellifera* con vancomicina, vancomicina (control positivo) y solución salina (control negativo), con 7 repeticiones por grupo, de acuerdo a cada concentración. Se empleó el método de macrodilución en tubos, obteniéndose como resultados: La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) obtenida del grupo de miel de *Apis mellifera* fue 50 mg/ml (proporción 2/7, IC:95%,eficacia:28.6%), el grupo de miel de *Apis mellifera* con vancomicina evidenció tener efecto sinérgico con 6.5 mg/ml (proporción 4/7, IC:95%, eficacia: 57.1%) , con valores similares a vancomicina con 6.5 mg/ml (proporción 1/7, IC:95%, eficacia: 14.2%). Al comparar las proporciones por el Test de Fisher, se determinó que existe significancia estadística en cuanto al efecto antimicrobiano entre el grupo de vancomicina sola y el grupo de miel de *Apis mellifera* con vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente in vitro. Conclusión: La miel de *Apis mellifera* demostró tener eficacia sinérgica antimicrobiana con vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, presentando la misma eficacia que la vancomicina a concentración de 6.5 mg/ml.

Palabras claves: *MRSA*, CIM, miel de *Apis mellifera*, Sinergia.

ABSTRACT

In the present study, the synergistic antimicrobial efficacy of *Apis mellifera* honey with vancomycin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was evaluated in vitro; Considering 4 treatment groups: *Apis mellifera* honey, *Apis mellifera* honey with vancomycin, vancomycin (positive control) and saline solution (negative control), with 7 repetitions per group, according to each concentration. The macrodilution method in tubes was used, obtaining the following results: The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) obtained from the *Apis mellifera* honey group was 50 mg / ml (proportion 2/7, CI: 95%, efficacy: 28.6%), The *Apis mellifera* honey group with vancomycin showed a synergistic effect with 6.5 mg / ml (proportion 4/7, CI: 95%, efficacy: 57.1%), with values similar to vancomycin with 6.5 mg / ml (proportion 1/7 , CI: 95%, efficacy: 14.2%). When comparing the proportions by the Fisher test, it was determined that there is statistical significance in terms of the antimicrobial effect between the group of vancomycin alone and the group of *Apis mellifera* honey with vancomycin on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in vitro. Conclusion: *Apis mellifera* honey demonstrated synergistic antimicrobial efficacy with vancomycin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, presenting the same efficacy as vancomycin at a concentration of 6.5 mg / ml.

Keywords: MRSA, CIM, *Apis mellifera* honey, Synergy.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas en tejidos blandos y piel comprenden un importante motivo de consulta a nivel global, estas sumadas a las infecciones respiratorias y urinarias comprenden el 71,8% de las causas de hospitalización en emergencia a nivel de Estados Unidos.¹ La prevalencia de *Staphylococcus aureus* se estima en aproximadamente 2 billones de personas, de los cuales 1% es *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (*MRSA*), ya que la mucosa nasal es el área principal de colonización.²

A nivel de Latinoamérica, existe dificultad en la recolección de datos fidedignos sobre la incidencia de *MRSA*, a causa de déficit de recursos en su adecuada detección, por ello se evidenció por medio de investigación a gran escala que de los casos detectados en hospitales de 11 diferentes países, un 48,3% del total eran *MRSA*, de los cuales de acuerdo a la OMS en países como: Nicaragua, Cuba, Bolivia y Perú se reportan infecciones en un 51%.³

A nivel Nacional, en un estudio realizado en 3 hospitales de Lima entre 2011-2014, se registraron 150 casos de bacteriemia por *Staphylococcus aureus* (S.A), entre cepas resistentes y sensibles, evidenciándose mayor mortalidad en casos expuestos a *MRSA*.⁴ Asimismo en el Hospital Cayetano Heredia, entre 2017-2018, se registraron 211 aislamientos de S.A., encontrándose que los casos de *MRSA* tuvieron mayor estancia hospitalaria, así como mayor número de hospitalizados en UCI con 61,9%(p=0,123).⁵

Afecta predominantemente a jóvenes y niños aislándose en infecciones de áreas de la piel y en partes blandas. Por otro lado con menor incidencia y asociando mayor morbimortalidad se encuentra en infecciones invasivas y profundas como infecciones osteoarticulares, miositis, abscesos o neumonías complicadas con empiema.⁶

En cuanto al manejo de la infección por *MRSA* se hace uso de antibióticos de acuerdo a origen, en casos de origen comunitario se emplea dicloxacilina, clindamicina o cotrimoxazol. En casos de presentar sepsis nosocomiales graves por *MRSA* de origen hospitalario y con resistencia a los fármacos anteriores, se usa vancomicina.⁷

La creciente aparición de mecanismos de resistencia del *Staphylococcus* es considerado un problema cada vez más creciente a nivel mundial, por esta razón para fijar una terapia empírica eficaz es necesario cada vez más realizar un monitoreo de sensibilidad antibacteriana. En casos de *MRSA* son además potentes ante los β -lactámicos, así como diversos fármacos antibacterianos, incluso con reciente aparición de reportes con resistencia a glicopéptidos.⁸

La miel es un alimento producido por abejas (*Apis mellífera*), cuyo uso como medicamento data desde hace 2500 años A.C. en Mesopotamia por la cultura Sumeria, en la medicina moderna se usa por sus propiedades biológicas y físicas.⁵ Destaca su eficiencia como antimicrobiano y antiséptico, la cual es a causa de su osmolaridad y alto contenido de azúcares, así como sus beneficios en la aceleración en el proceso de cicatrización.¹⁰

El problema planteado en la investigación es: **¿Tiene eficacia sinérgica antimicrobiana la miel de *Apis mellífera* con vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente in vitro?**

Actualmente *Staphylococcus aureus* meticilino resistente viene a ser una bacteria con elevada resistencia a los tratamientos, así como el causante de diversas enfermedades a nivel intrahospitalario como de la comunidad, dicha situación es alarmante no solo por la creciente falta de antibióticos para responder el avance de dicha bacteria, sino por los elevados costos en salud crecientes día a día; por tal motivo cobra mayor valor la investigación por hallar nuevos medicamentos naturales, accesibles a la población y de uso común en el consumo humano, como la miel, la misma que ha sido alimento natural desde tiempos ancestrales además de no haber demostrado efectos adversos. Posee diversas propiedades según indican los estudios como antioxidante, suplemento nutricional, antiinflamatorio y el principal como antibacteriano, entre otras.

Es por esto que es una alternativa de solución de origen natural para el manejo preventivo y curativo en infecciones generadas por *MRSA*, sin reacciones adversas y a bajo costo para la población. Además, en miras a su efecto sinérgico con los antimicrobianos en el manejo estándar, puede ser un gran complemento al punto de poder disminuir la dosis y días de tratamiento

necesarios para la erradicación bacteriana completa así como atenuar los efectos adversos de los fármacos implicados.

Las **hipótesis** planteadas en la presente investigación: H1: La miel de *Apis mellifera* tiene eficacia sinérgica antimicrobiana con vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente in vitro y H0: La miel de *Apis mellifera* no tiene eficacia sinérgica antimicrobiana con vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente in vitro.

El **objetivo general** fue evaluar si la miel de *Apis mellifera* tiene eficacia sinérgica antimicrobiana con vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente in vitro.

Asimismo, los **objetivos específicos** tienen como finalidad: Determinar el efecto antibacteriano de miel de *Apis mellifera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente in vitro; Identificar si la miel de *Apis mellifera* asociado a vancomicina tienen eficacia antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente in vitro; Determinar el efecto antibacteriano de la vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente in vitro.

II.MARCO TEÓRICO

Mama et al¹¹ (Etiopía, 2019) Evaluaron la eficacia antibacteriana de la miel frente a *MRSA*. Realizaron un estudio experimental, a través del método de dilución en tubos, para obtener Concentración inhibitoria mínima (CIM) siendo los valores hallados 18.75% v / v con una eficacia de 70%, con valores de significancia de $p < 0.05$. Concluyeron que presenta propiedades bactericidas sobre *MRSA*.

Dela Cruz et al¹² (Malasia, 2018) Determinaron el efecto antimicrobiano entre miel natural en comparación con la miel artificial contra *MRSA*. Aplicaron un estudio experimental, usando el método de dilución en tubos, con valores de CIM de 20 mg/ml, a diferencia de la miel artificial que no mostró ningún tipo de efecto, con valores de significancia de $p < 0,05$. Comprobando la eficacia de la miel sobre *MRSA*.

Mabrouka et al¹³ (Argelia, 2018) Analizaron la miel en el tratamiento de once bacterias multirresistentes del tracto urinario en el embarazo, entre ellas *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Hicieron un estudio experimental, por método de dilución en tubos, para obtener la CIM y la CMB, siendo los valores de 2,5 % (v / v) para ambos, con valores de significancia de $p < 0,05$. Concluyendo que tienen eficacia antimicrobiana tanto en Gram positivas y negativas.

Jayanthi et al¹⁴ (India, 2017) Estudiaron la eficacia antimicrobiana de la miel en cepas de *MRSA*. Aplicaron un estudio experimental, por medio del método de dilución en tubos, para medir su CIM; siendo esta de 6,25 mg/ml; con valores de significancia de $p < 0,05$. Concluyeron, que la miel tiene tanto actividad bacteriostática como bactericida, en especial atribuida a su PH ácido frente a *MRSA*.

Vayas¹⁵ (Ecuador, 2017) Evaluó métodos de sensibilidad sobre la efectividad antimicrobiana de miel de abeja (*Apis mellifera*) en *S. aureus*, realizó un diseño experimental, aplicando el método de dilución en tubos, obteniéndose una CIM 70mg/ml y la CMB con 90 mg/ml; los resultados muestran que existió efecto bactericida atribuidos a su alta osmolaridad y su denominada actividad del agua sobre la cepa de *S. aureus*.

Amuche et al¹⁶ (Nigeria, 2016) Compararon la eficacia antibacterial de miel (*Apis mellifera*) y miel de abejas sin aguijón de Nsukka, contra diversas bacterias

resistentes, entre ellas *MRSA*. Realizaron un estudio experimental, aplicando el método de dilución en tubo; siendo la CIM 12,5 a 50 mg/ml, mostrando efecto antimicrobiano similar a la de las abejas sin aguijón de Nsukka, con valores de significancia de $p < 0,05$, demostrando la eficacia de las mieles sobre *MRSA*.

Wasihun et al¹⁷ (Etiopía, 2016) Determinaron la eficacia antibacteriana de mieles rojas y blancas frente a bacterias resistentes a múltiples fármacos, entre ellas *S. aureus*, usando un estudio experimental, por método de dilución en tubos, para obtener la CIM y la CMB, siendo la CIM media para mieles rojas y blancas para *S. aureus*, 6.25% (v / v) y 12.5% (v / v). En la CMB la media de mieles rojas y blancas fue 50% y 100% (v/v) respectivamente, demostrándose su eficacia antibacteriana, siendo la *miel* roja de mayor eficacia sobre la blanca.

Poovelikunnel et al¹⁸ (Irlanda ,2016) Compararon la eficacia antibacteriana de la *miel* sobre *MRSA* nasal en comparación con mupirocina al 2%, en un estudio experimental, por el método de microdiluciones, obteniendo la CIM y CMB, lográndose la inhibición al 5%, y la CMB para su acción bactericida con 12,5%, con valores superiores a la mupirocina, con valores de significancia de $p < 0,05$, demostrándose su efecto antibacteriano en la erradicación de *S.aureus*.

Eslami et al¹⁹ (Irán, 2016) Determinaron la acción sinérgica antimicrobiana de la miel (*Apis mellifera*) y propóleos Azarian, en microorganismos orales, entre ellas *MRSA*, usando un estudio experimental, aplicando el método de microdilución en tubos; para medir la CIM, siendo 8,52 %, la misma que junto a propóleos fue de 6.00% con valores de significancia de $p < 0,05$, demostrando su eficacia antimicrobiana y sinergia al disminuir dicha CIM en asociación con el propóleo.

Akinkunmi et al²⁰ (Nigeria, 2015) Compararon la eficacia antimicrobiana de la miel contra agentes antisépticos de uso común sobre cepas de *MRSA*, usando un diseño experimental y aplicando el método de microdilución en tubos para hallar la CIM con valores de media entre 70-79 %, superior a los antisépticos, dichos resultados fueron significativos a un valor de significancia de $p < 0,05$, demostrándose su alta eficacia antimicrobiana sobre *MRSA*.

Aamer et al²¹ (Egipto, 2014) Estudiaron la CMB y CIM de miel y propóleos de abeja contra diversas cepas resistentes de *Staphylococcus*, entre ellas *MRSA*. Emplearon un estudio experimental, por método de dilución en tubos,

obteniéndose una CIM=20-33%; las mismas que el agregado de propóleos nos dio una CIM=6.2-7.25%, con diferencias significativas a $p<0,01$, demostrándose la eficacia antimicrobiana y sinérgica, así como la sensibilidad de las cepas, siendo *MRSA* el más sensible de los 4.

Ewnetu et al²² (Etiopía, 2013) Estudiaron la acción antimicrobiana de *mieles de Apis mellifera* en cepas resistentes, entre ellas *MRSA*. En un estudio experimental, por microdilución en tubos, obteniéndose CIM y CMB diluidas, siendo 6,25% (v/v) en todas las mieles sobre *MRSA*, con valor de significancia $p<0,05$. Concluyeron que todas las *mieles* muestran actividad antibacteriana.

Srisayam et al²³ (Tailandia ,2010) Evaluaron las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de *miel (Apis mellifera)* en cepas bacterianas, entre ellas *MRSA*, usando un estudio experimental, por medio del método de dilución en tubos, para obtener la CIM, encontrándose valores que variaron de 6% (v / v) a 22% (v / v), con valores de significancia de $p<0,05$; encontrándose que la miel inhibió todas las bacterias.

Rajeswari et al²⁴ (India,2010) Determinaron la eficacia antimicrobiana de la miel sobre *S. aureus*, usando un estudio experimental, empleando muestras de *miel* de diversas áreas, por el método de dilución en tubos, siendo la CIM diluida al 25 mg/ml con un 80 % de eficacia, con valores de significancia de $p<0,05$. Comprobando su eficacia antibacteriana para fines terapéuticos.

Los cocos Gram-positivos comprenden bacterias con características como: no presentan esporas y su forma es esférica, dentro de los cuales el nombre del género *Staphylococcus* hace referencia a un grupo de cocos Gram-positivos que desarrollan patrón en forma de uvas, de estos el que se relaciona a mayor incidencia de enfermedad en el ser humano es el *Staphylococcus aureus* (más virulencia). A su vez *MRSA*, se encuentra asociado a infecciones graves ya sea en niños o adultos previamente saludables.²⁵

Los estafilococos presentan polisacáridos, proteínas antigénicas, así como otros compuestos en su pared celular, siendo uno de los principales el peptidoglucano (polímero de polisacárido que presenta subunidades ligadas), el cual concede la rigidez en la pared celular, por su parte la proteína A es una proteína de superficie (adhesina), la cual reconoce las moléculas en la matriz adhesiva generando la capacidad de adhesión a las células hospedadoras.²⁶

La capacidad infecciosa de la bacteria se genera por medio de sus factores de virulencia, como la coagulasa que es un factor de aglutinación, que genera un coágulo de fibrina por medio de la activación de protrombina, produciendo agregación bacteriana. En cuanto a sus toxinas citolíticas (α , β , γ), resalta el tipo α , esta es una citotoxina la misma que se inserta a nivel de la bicapa lipídica formando poros transmembranales, que generan la salida de moléculas vitales con posterior muerte celular. A nivel de piel resalta la toxina exfoliativa, la cual genera una división en la epidermis, entre el estrato granuloso y espinoso, por medio de la separación de uniones intercelulares.²⁷

La capacidad de virulencia y resistencia desarrollada por *MRSA*, lo establece como un creciente problema en la salud pública, al momento del abordaje del tratamiento y manejo de infecciones estafilocócicas. El creciente surgimiento de cepas resistentes a meticilina (*MRSA*) y otros antibióticos actualmente ha generado dos tipos de acuerdo al escenario de la infección, el primero cuyo origen es comunitario (CA: Community-acquired) y el segundo con la aparición de cepas hospitalarias (HA: Hospital-acquired) que incrementa la morbimortalidad poblacional.²⁸

Actualmente se conoce la secuencia de varias cepas de *Staphylococcus aureus*, las cuales poseen similitud en la secuencia de nucleótidos, transferencia

horizontal por medio del cual intercambian información genética de otras especies bacterianas, islotes de patogenicidad, los cuales contienen cúmulos de genes de enterotoxinas y exotoxinas que en conjunto participan en la resistencia antimicrobiana. En cuanto a los genes de dichos islotes resalta los que llevan el gen *mec A*, el cual otorga a las bacterias su resistencia a la meticilina, entre estos los tipos 1-3 pertenecen a cepas hospitalarias de *MRSA* y los tipos 4-6 pertenecen a las cepas de *MRSA* extrahospitalarias (*CA-MRSA*).²⁹

Dicho gen *mec A*, está insertado dentro de la isla genómica denominada en español “Cromosoma *mec* de casete estafilocócico”, el cual codifica la PBP2A, al adquirir esta nueva PBP conforma el principal mecanismo de resistencia a meticilina, otorgando al *S.aureus* propiedades fundamentales, como disminuir la afinidad hacia el antibiótico, ya que su centro activo limita el acceso al presentar su hendidura muy angosta, disminuyendo las concentraciones del antibiótico e impidiendo su efectividad, permitiendo que la transpeptidación continúe.³⁰

Los estafilococos presentan un rápido desarrollo de resistencia, como la presencia de la enzima penicilinasasa (betalactamasa específica de penicilinas); cuya función es hidrolizar el anillo β -lactámico de penicilina, dicha problema impulsó la creación de penicilinas semisintéticas con resistencia a la hidrólisis generada por betalactamasas entre ellas meticilina, dicloxacilina, nafcilina y oxacilina; en respuesta a ello la bacteria generó resistencia a las mismas e incluso a todos los antibióticos β lactámicos.²⁵

Dichas penicilinas semisintéticas presentan semejanza farmacológica, las cuales tienen gran estabilidad a nivel del medio ácido, así como resistentes ante las penicilinasas, los cuales son los fármacos de primera línea en tales casos, excepto en aquellas cepas resistentes a meticilina, de la cual resalta la dicloxacilina con mayor actividad contra *S.aureus*, ante el desarrollo de *MRSA*, se debe resaltar, que en muchos casos de infección por *MRSA* de la comunidad aún se retiene la sensibilidad a fármacos como trimetoprim-sulfametoxazol y clindamicina, sin embargo en pacientes con infección hospitalaria severa o en caso se produzca una resistencia a los medicamentos previos, se emplea el uso de vancomicina.³¹

Actualmente en cuanto al manejo de las infecciones causadas por *MRSA* de acuerdo a las guías de tratamiento, el fármaco de elección en infecciones graves de origen hospitalario es la vancomicina, siendo la más usada para una mayor eficacia en infecciones graves, se recomienda iniciar dosis de 15 mg/Kg cada 12h, hasta alcanzar valores de 15 mg/L; cabe resaltar que en pacientes con neumonía, endocarditis y bacteriemia causadas por *MRSA* y tratados con vancomicina presenta tasas elevadas de fracaso y mortalidad, por lo cual en alguno de esos casos se debe considerar a linezolid y daptomicina como fármaco alternativo en dichos casos.³²

En cuanto a la vancomicina, es un antibiótico glucopéptido bastante estable, cuyo mecanismo se fundamenta en impedir la formación de pared bacteriana al unirse al extremo D-ala-D-ala del pentapéptido peptidoglucano, inhibiendo la transglucosilasa, generando debilidad en dicho peptidoglucano y evitando su elongación haciéndolo susceptible a la lisis celular. La vancomicina elimina a los estafilococos de manera lenta, encontrándose entre estos la gran mayoría de estafilococos perjudiciales, incluidos aquellos que presentan resistencia a nafcilina, meticilina o que producen β -lactamasas, se eliminan a concentraciones de 2 mg/ml.³³

La miel se define como un elemento natural dulce generado por abejas en base al néctar de plantas y secreciones de estas, que reúnen, combinan y transforman con sustancias propias específicas; esta no debe contener ningún aditivo, o sustancias extrañas a su composición de lo contrario no podrá ser llamado miel. En base a esto se presentan diversos tipos de mieles, de las cuales se diferencian *miel* en panal (almacén natural); *miel* líquida (retirada de panal y sin cristales) y miel cristalizada (semisólida con presencia de cristales de azúcar).³⁴

Su origen botánico y geográfico es difícil de determinar incluso a la fecha, por esta razón se hace cada vez más necesario plantear protocolos para la verificación de su calidad, debido a que sus propiedades tanto de calidad como físico-químicas, se encuentran dadas de acuerdo al origen botánica, cuyos usos están relacionados a la industria alimentaria, cosmética, así como farmacéutica. En cuanto al aroma de la miel está dada por diversos compuestos volátiles con bajo peso derivadas de las flores cosechadas por las abejas.³⁵

En cuanto a su composición la miel de *Apis mellifera*, presentan diversas variaciones, ya que existen cambios en relación a la humedad, tipo de apicultura, temperatura, etc.; destacan por presenta gran cantidad de azúcares variadas entre las que destacan glucosa y fructosa en concentraciones superiores al 30%, además de agua en un 17%, y el resto de compuestos se presentan en escaso porcentaje, encontrándose sacarosa, maltosa, entre otros azúcares, proteínas, vitaminas y minerales.³⁶

Dichas vitaminas presentes son definidas por los nutricionistas como las más importantes para la buena salud como; grupo B; biotina, tiamina, riboflavina, niacina, así como ácido ascórbico y vitamina C, asimismo, a diferencia de verduras o frutas que al ser cosechadas, almacenadas o preparadas pierden su contenido en vitamina, la *miel* no pierde nunca sus vitaminas (a menos que sea calentada), incluso presenta contenido rico en minerales que van desde hierro, fósforo, aluminio y magnesio. De manera empírica nuestros ancestros descubrieron sus propiedades, siendo usada como medicina desde hace miles de años documentando sus propiedades de curación.³⁷

Usada durante milenios como alimento, así como medicina, posee gran cantidad de efectos beneficiosos como antioxidante, suplemento nutricional ya sea para pacientes sanos, así como con intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus u otras comorbilidades; disminuye los niveles de glucemia generando un efecto normoglicemiante o hipoglucemiante, así como de los niveles de lípidos sanguíneos, además de su actividad sobre el sistema inmune y su actividad antibacteriana.³⁸

La propiedad antibacteriana en la miel se debe al efecto denominado “actividad del agua”, que hace referencia a la concentración mínima requerida por el microorganismo para su proceso de reproducción, generando un medio de elevada osmolaridad (bajo contenido de agua) por su elevada concentración de glucosa, generando la inhibición bacteriana por la misma actividad del agua en el sustrato. Además, posee inhibinas dentro de las cuales se encuentran los flavonoides, entre ellos la piocembrina y la galangina cuyo mecanismo consiste en actuar a nivel de la membrana bacteriana, deteniendo el desarrollo bacteriano. Posee un PH entre 3-4 (ácido) el mismo que disminuye la potencia

necesaria para la interacción proteica transmembrana, en especial a nivel de macrófagos potenciando la quimiotaxis y la actividad fagocítica (en vacuolas).³⁹

Además de manera complementaria presenta eficacia en el manejo de quemaduras y heridas, al ser considerado como un elemento tópico ideal, al no adherirse a la superficie de la herida, ejerciendo actividad antiinflamatoria y de desbridamiento y cicatrización; también crea una barrera, así como un medio húmedo con la finalidad de la eliminación rápida del tejido necrótico y la escara, promoviendo el proceso de epitelización, así como la síntesis colágena y su maduración. Concluyendo que representa una buena alternativa como agente tópico, además de ser bajo costo y efectivo.⁴⁰

III. METODOLOGÍA

3.1.-TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

TIPO DE ESTUDIO: Básica⁴¹

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN: Experimental con repeticiones múltiples con postprueba.⁴⁴ (ANEXO 01)

3.2.-VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN (ANEXO 02)

IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE: Agente antibacteriano.

- **No farmacológico:** Miel de *Apis mellifera*
- **Farmacológico:** Vancomicina

VARIABLE DEPENDIENTE: Efecto antibacteriano según CLSI M100.⁴⁵

- **Si efecto antibacteriano:** CIM \leq 2 mg /ml
- **No efecto antibacteriano:** CIM $>$ 2mg/ml

3.3.-POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

Población: Estuvo conformado por cultivos de *MRSA*.

Criterios de selección:

- **Criterios de inclusión:** cultivos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente donde se evidenció crecimiento bacteriano.
- **Criterios de exclusión:** cultivos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente donde no se evidencio crecimiento.

Muestra: El tamaño muestral se estimó por medio de la fórmula estadística para comparación de dos medias.⁴⁴ (ANEXO 03). Se trabajó con 7 repeticiones.

Muestreo: Se aplicó un muestreo aleatorio simple de cada grupo de cultivo de *MRSA*.

3.4.-TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

Técnica: Observación directa de aparición de turbidez por el método de macrodilución en tubos, por concentración decreciente del agente antimicrobiano, en tubos con caldo de cultivo que mantuvo el crecimiento de los microorganismos.

Instrumento: El instrumento empleado fue la ficha de recolección de datos hecha por el investigador para registrar todos los datos recopilados en el laboratorio de manera codificada (ANEXO 04).

Validación y Confiabilidad del Instrumento: La validación del instrumento se realizó por medio de la opinión de un biólogo y dos médicos, los mismo que evaluaron los ítems y variables contenidos en la ficha de recolección de datos, para garantizar la relevancia del instrumento. (ANEXO 05)

3.5.-PROCEDIMIENTOS (ANEXO 06)

1. Obtención de la miel de *Apis mellifera* a utilizar.
2. Obtención de muestras de *MRSA*.
3. Método de macrodilución en caldo de cultivo.

3.6.-MÉTODO DE ANÁLISIS DE DATOS

A la información obtenida, se registró en la ficha de recolección de datos, al ser tabulada a través del programa Microsoft Excel, realizándose una estadística descriptiva al procesarlo con el software estadístico SSPS versión 25, para posteriormente obtener las tablas de frecuencia absolutas simples y relativas (porcentajes), que implica el porcentaje de eficacia en la dilución.

En la estadística inferencial las muestras tomadas aleatoriamente fueron evaluadas en su efectividad proporcionalmente en cada dilución y por ser la muestra pequeña ($n=7$), se realizó la comparación de proporciones con la estadística de Prueba Test de Fisher (Prueba F de Fisher), a un nivel de confianza de 95%.⁴¹

3.7.-ASPECTOS ÉTICOS

Se emplearon las Normas de bioseguridad de la OMS en cuanto a la disposición y adecuado manejo de los residuos en el laboratorio de ensayo, biomédicos y clínicos del Ministerio de Salud de la Norma Técnica N°18⁴⁶ y la Ley de biodiversidad N°26839.36.⁴⁷

IV. RESULTADOS

Tabla 01. Test de Fisher utilizado para la comparación de la eficacia sinérgica antimicrobiana de miel de *Apis mellífera* y vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Diluciones en (mg/ml)	Tratamientos					
	Miel / Miel+Vanc.		Miel / Vancomicina		Miel+Vanc/Vanc	
	hi	F	hi	F	hi	F
≥ 100	(7 / 7)	–	(7 / 7)	–	(7 / 7)	–
50	(2 / 7)	p = 0.01	(2 / 7)	p = 0.01	(7 / 7)	–
25	(0 / 7)	p = 0.0003	(0 / 7)	p = 0.0003	(7 / 7)	–
12.5	(0 / 7)	p = 0.0003	(0 / 7)	p = 0.0003	(7 / 7)	–
6.5	(0 / 4)	p = 0.035	(0 / 1)	p = 0.5	(4 / 1)	p = 0.13
≤3.3	(0/0)	–	(0/0)	–	(0/0)	–

Fuente: salida del software SPSS 25.0

S/D: Sin Diferencia entre Tratamientos

Interpretación: En la tabla 01, se encontró que La miel +vancomicina vs la vancomicina tiene el mismo efecto en todas sus diluciones, por otro lado, al comparar la miel vs vancomicina ambos resultaron igual de efectivos en diluciones superiores a 100mg; pero a diluciones inferiores a 25 mg/ml solo la vancomicina resulto efectivo. El comportamiento de la miel vs miel+vancomicina es similar a miel vs la vancomicina, solo difiere a diluciones de 6.5mg/ml. Por otro lado, a diluciones de 3.3 mg/ml o menos ninguno de los tratamientos resulto efectivo.

Tabla 02. Efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellifera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Miel de <i>Apis mellifera</i> (mg/ml)	Sin Turbidez	Eficacia
≥ 100 (mg/ml)	7(7)	100%
50 (mg/ml)	2(7)	28.6
≤ 25 (mg/ml)	0(7)	0%

Fuente: Laboratorio de microbiología de la UCV

Interpretación: En la tabla 02, en relación a las diluciones, a 50mg/ml se encontró que en 2 de 7 ensayos presento concentración inhibitoria por ello se considera a esta como la concentración inhibitoria mínima de la miel de *Apis mellifera*.

Tabla 03. Efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellífera* asociado a Vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Miel + Vancomicina (mg/ml)	Sin Turbidez	Eficacia
≥ 12.5 (mg/ml)	7(7)	100
6.5 (mg/ml)	4(7)	57.1
≤3.3 (mg/ml)	0(7)	0%

Fuente: Laboratorio de microbiología de la UCV.

Interpretación: En la tabla 03, se encontró que en la dilución de 6.5mg/ml se encontró efecto inhibitorio en 4 de 7 ensayos (57.1%) considerándose como concentración inhibitoria mínima de la Miel + Vancomicina (mg/ml) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Tabla 04. Efecto antibacteriano de la vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Vancomicina (mg/ml)	Sin Turbidez	Eficacia
≥ 12.5 (mg/ml)	7(7)	100
6.5 (mg/ml)	1(7)	14.2
≤ 3.3 (mg/ml)	0(7)	0%

Fuente: Laboratorio de microbiología de la UCV

Interpretación: En la tabla 04, en la dilución de 6.5mg/ml se encontró efecto inhibitorio de la vancomicina es 1 de 7 ensayos (14.2%) considerándose como concentración inhibitoria mínima de la Vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

V. DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como finalidad evaluar el efecto sinérgico antimicrobiano de la miel de *Apis mellifera* con vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (*MRSA*) in vitro, mostrando respuesta inhibitoria a diversas concentraciones de miel y vancomicina, realizándose un total de 7 repeticiones por grupo, dentro de las cuales estuvo conformado por 10 tubos de acuerdo a su respectiva concentración, generando los siguientes resultados sometidos a discusión y análisis.

En la tabla 01 A dilución de 50mg/ml encontramos que el efecto entre la miel de abeja + vancomicina vs vancomicina mostraron igual efecto s/d(7/7) pero al comparar la vancomicina con la miel de *Apis mellifera* la estadística de prueba test exacto F de Fisher indica que la vancomicina es más efectivo que la miel de *Apis mellifera* con una significancia $p=0.01$; de la misma manera la asociación sinérgica entre la miel de *Apis mellifera* con vancomicina es eficaz como antimicrobiano sobre *MRSA* in vitro. En lo referente a la comparación con otro antiséptico, otros estudios como: Akinkumi et al²⁰, al comparar la eficacia antimicrobiana de la miel con antisépticos de uso común se encuentra CIM= 30 mg/ml con una eficacia de 70 a 90%, demostrando además eficacia antimicrobiana superior al no verse afectada por la resistencia a meticilina.

A Diluciones de 25 y 12.5mg/ml el efecto de la asociación entre la miel y la vancomicina resultaron ser más efectiva que la misma miel de *Apis mellifera* con $p=0.00029$, cuando la dilución es de 6.5mg/ml solo fue efectiva la asociación miel con vancomicina que solo la miel, esta diferencia fue significativa según la estadística F de Fisher con valor $p = 0.035$, mientras que a diluciones menores o iguales a 3.3mg/ml solo encontramos turbidez de las diluciones indicando el crecimiento bacteriano S/D (0/7) siendo más efectiva que la del grupo de la miel de *Apis mellifera* sola, dicho valor contrasta con la investigación de Mabrouka et al¹³ quien en su estudio sobre la miel como medicina alternativa sobre bacterias resistentes, obtuvo valores de CIM= 2.5%, hallando mayor susceptibilidad a la miel de *Apis mellifera* en bacterias gram positivas en especial *MRSA*.

En la tabla 02, en relación a las diluciones inferiores a 25mg/ml presentaron turbidez de la dilución la cual indica que todavía existe crecimiento bacteriano

(0/7), pero ya en 50mg/ml se encontró que en 2 de 7 ensayos presento concentración inhibitoria por tanto, se considera que la CIM de la miel de *Apis mellifera* sobre *MRSA* es 50mg/ml, dichos hallazgos son respaldados con otros autores como Rajeswari et al²⁴ al evaluar la actividad antimicrobiana de miel de *Apis mellifera* sobre *MRSA* de heridas infectadas, encontrando una CIM=25 mg/ml con un 80% de eficacia para fines terapéuticos y en un estudio de Mama et al¹¹, indicó que la CIM de la miel de *Apis Mellifera* sobre *MRSA* fue de 18.75 mg/ml con una eficacia de 70% concluyendo sus propiedades bacteriostáticas y bactericidas.

En investigaciones relacionadas al efecto antibacteriano de la miel de *Apis mellifera* datos similares al presente estudio evalúan y comparan dicho efecto en relación a otras variedades de miel, por ejemplo, Amuche J. et al¹⁶, el mismo que comparó la eficacia antibacteriana de miel (*Apis mellifera*) y miel de abejas sin aguijón de Nsukka, contra diversas bacterias resistentes, con valores de CIM de miel de *Apis mellifera* que oscilaron entre 12,5 a 50 mg/ml, encontrándose además que el efecto antibacteriano en las mieles de abejas sin aguijón era similar a las de *Apis mellifera*. Asimismo, De la Cruz et al¹² comparó el efecto de la miel natural contra la miel artificial, con una CIM=20%, mostró mayor eficacia sobre la miel artificial, así como mayor sensibilidad a esta por parte de *MRSA*.

En la tabla 03, las diluciones inferiores a 3.3mg/ml presentaron turbidez de la dilución indicando crecimiento bacteriano (0/7), pero en la dilución de 6.5mg/ml se encontró efecto inhibitorio en 4 de 7 ensayos (57.1%) considerándose como CIM de la Miel + Vancomicina (mg/ml) sobre *MRSA*, con valor similar al hallado por otros autores en cuanto a la eficacia antibacteriana de miel de *Apis mellifera* sola como: Srisayam et al²³ que evaluó propiedades antimicrobianas de la miel de *Apis mellifera*, con valores de CIM que variaron de 6% a 22% (v / v) que son similares a otros tipos de miel. Ewnetu et al²² en su investigación sobre la miel de *Apis mellifera* sobre cepas resistentes y sensibles encontró valores de CIM=6.25 % para *MRSA* demostrando su potencial como agente terapéutico complementario.

En relación a la sinergia en el presente estudio en la tabla 04 las diluciones de vancomicina inferiores a 3.3mg/ml presentaron turbidez de la dilución, es decir

existiendo crecimiento bacteriano (0/7), pero en la dilución de 6.5mg/ml se encontró efecto inhibitorio de la vancomicina en 1 de 7 ensayos (14.2%) considerándose como CIM de la vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, que pese a ser estadísticamente similar en comparación con la CIM de la Miel + Vancomicina (mg/ml), presenta una disminución considerable en el porcentaje de eficacia en relación a la frecuencia relativa del número de repeticiones donde se inhibió a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, pero presentando el mismo efecto en las diluciones.

Al realizar la comparación de nuestros hallazgos sobre la potencia sinérgica, difiere con la de otros investigadores, que pese a no haber empleado a vancomicina en sus investigaciones pusieron a prueba el efecto antibacteriano de la miel junto a otros compuestos, como Amer et al²⁰ en su investigación sobre cepas resistentes de *MRSA*, obtuvo valores de CIM= 20 a 33%, las mismas que junto a propóleos maximizaron la actividad antimicrobiana (CIM=6.2 a 7.25%). Asimismo, Eslami et al¹⁹ con su estudio de sinergia de miel y propóleos, obtuvo una CIM=8.52% al usar miel sola, siendo potenciada con propóleos hasta una CIM=6.00%, siendo desiguales con nuestros hallazgos en el grupo de sinergia, ya que hubo igualdad en la eficacia con la vancomicina sola, más no superándola como en los estudios donde se logró valores de CIM inferiores.

Algunos autores coinciden sobre los mecanismos de acción de los compuestos activos de la miel de *Apis mellifera*. Vayas¹⁵, atribuye que la miel es una solución saturada de azúcares (alta osmolaridad), la interacción de estas moléculas con las del agua disminuyen la disponibilidad del agua para los microorganismos con el que inhibe completamente su crecimiento, dicha "agua libre" es la denominada actividad del agua, la misma que inhibe el crecimiento bacteriano, además agrega Poovelikunnel et al¹⁸ en su estudio, que la miel actúa como inmunomodulador con propiedades pro inflamatorias y antiinflamatorias capaz de inducir la liberación de TNF- α , interleucina 1B, IL-6 y monocitos de sangre periférica, actuando como un excelente agente curativo.

Asimismo, en su investigación Jayanthi et al¹⁴, menciona además que dicha actividad antibacteriana también es atribuida por su alta naturaleza ácida (PH: 3.2-4.5), lo suficientemente bajo para inhibir el desarrollo de microorganismos.

Wasihun et al¹⁷, establece que, dada su naturaleza osmótica, naturalmente su bajo PH hace a la miel un importante elemento antibacteriano y cicatrizante ya que aumenta el proceso de cicatrización por la epitelización. Asimismo, su capacidad de producir peróxido de hidrógeno juega un papel clave en dicha actividad, esto contribuye al crecimiento de tejidos, reduce el dolor y el olor de manera rápida.

De acuerdo a Ewnetu et al²² el mayor efecto antibacteriano, es por el peróxido de hidrógeno, que es dado en la oxidación de la glucosa por la enzima glucosa-oxidasa, dicha enzima también es mencionada por Mama et al¹¹, que manifiesta convierte dicha glucosa en gluconolactona y peróxido de hidrógeno, cuya liberación es de manera continua para su efecto antibacteriano, ya que elimina los microorganismos sin dañar el tejido del huésped. Además, Aamer et al²¹ manifiesta que, pese a que su actividad antibacteriana es a causa del peróxido de hidrógeno, por sí sola puede no ser suficiente para la actividad completa, ya que actúa junto a otros de sus componentes, entre ellos los polifenoles, contenido lisosomal y flavonoides, que producen un efecto citotóxico bacteriano y la degradación del ADN que finalizan con la destrucción bacteriana.

En cuanto a su efecto sobre la bacteria en estudio, Mabrouka et al¹³ establece que las bacterias Gram-positivas son más sensibles a los biocidas que las Gram-negativas: esto está relacionado con la composición de la envoltura celular. La pared celular de las bacterias Gram positivas tiene una capa gruesa de peptidoglucano, que facilita el acceso de la pared celular a biocidas activos a su sitio de acción.

VI, CONCLUSIONES

- La miel de *Apis mellífera* demostró tener eficacia sinérgica antimicrobiana con vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, presentando la misma eficacia que la vancomicina a concentración de 6.5 mg/ml.
- La miel de *Apis Mellífera* evidencia efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente a partir de 50 mg/ml y con una eficacia del (28.6%) y efecto inhibitorio en 2 de 7 ensayos.
- La miel de *Apis mellifera* asociado a Vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente tienen eficacia antibacteriana a partir de 6.5mg/ml y efecto inhibitorio en 4 de 7 ensayos (57.1%).
- La vancomicina evidencia efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente in vitro a partir de 6.5mg/ml, con efecto inhibitorio de la vancomicina en 1 de 7 ensayos (14.2%).

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar diferentes variedades de miel de *Apis mellifera* para determinar los factores que puedan estar asociados a una potencial actividad antimicrobiana.
- Evaluar si los propóleos de *Apis mellifera* tiene efecto sinérgico al igual que la miel.
- Ampliar estudio del efecto sinérgico antimicrobiano en otros patógenos similares, gram positivas o gram negativas y hongos.
- Realizar una investigación sobre los principios activos que presenta la miel de *Apis mellifera*.
- Evaluar el efecto sinérgico antimicrobiano de la miel de *Apis mellifera* con vancomicina sobre modelos vivos (animales).

REFERENCIAS

1. Valderrama S, Alberto J, Caro M, Cely L, Osorio J, Milena S, et al. Guía de Práctica Clínica para el Diagnóstico y Manejo de las Infecciones de Piel y Tejidos Blandos en Colombia. Asociación Colombiana de Infectología. Infectio. [En Línea].2019. [Citado: 2020 abril 11]; 23(4):318-346. Disponible desde: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v23n4/0123-9392-inf-23-04-00318.pdf>
2. Carmona E, Sandoval S, García C. Frecuencia y susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* proveniente de hisopados nasales en una población urbano marginal de Lima, Perú. Rev Peruana de Medicina Experimental y Salud. 2012. [En Línea] [Citado: 2019 junio 06]; 29(2). Disponible desde: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/342/2507>
3. Mederos J, Morejón M. Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus aureus resistente a meticilina* en el Hospital "Manuel Fajardo Rivero". Rev haban cienc méd. 2014. [En Línea] [Citado: 2019 junio 06]; 13(3): 406-416. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2014000300006&lng=es.
4. Seas C, García C, Cachay R, De la Flor A, Schwalb A. Mortalidad en pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en hospitales de Lima, Perú. [tesis de bachiller] Perú: Universidad Cayetano Heredia; 2018.
5. Verástegui R, Balmaceda M, Guardia C. Bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en el Hospital Cayetano Heredia entre junio 2017 - diciembre 2018 [tesis de bachiller]. Perú: Universidad Cayetano Heredia; 2019.
6. Dall'Orso P, Maurente L, Suarez R, Berazategui B, Pirez C. Abscesos profundos por *Staphylococcus aureus meticilino resistente* adquirido en la comunidad: Reporte de cuatro casos clínicos. Arch Pediatr Urug. 2013. [En Línea] [Citado: 2019 agosto 06]; 84(2): 116-122. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-12492013000200006&lng=en.
7. Pascual K, Turcaz M. Incidencia de *Staphylococcus aureus resistente a meticilina* en pacientes pediátricos hospitalizados. Rev Inf Cient. 2016. [En

- Línea] [Citado: 2019 agosto 06]; 95(1): 64-72. Disponible en: <http://www.revincientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/138/1436>
8. Castro-Orozco R, Villafañe-Ferrer L, Rocha-Jiménez J, Alvis-Guzmán N. Resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*: tendencia temporal (2010-2016) y fenotipos de multirresistencia, Colombia. Revista Biosalud. 2018. [En Línea] [Citado: 2020 mayo 05]; 17(2):25-36. DOI: 10.17151/biosa.2018.17.2.2. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v17n2/1657-9550-biosa-17-02-00025.pdf>.
 9. Schencke C, Vásquez B, Sandoval C, Sol M. El Rol de la Miel en los Procesos Morfofisiológicos de Reparación de Heridas. Int J Morphol. 2016. [En Línea] [Citado: 2019 agosto 06]; 34(1):385-395. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v34n1/art56.pdf>
 10. Fiorilli G, Rosanova T, Hernández C, Taicz M, Laborde S, Lede R. Evaluación del poder bactericida de miel de abeja polifloral sobre gérmenes de pacientes internados en un hospital pediátrico. ResearchGate. 2015. [En Línea] [Citado: 2019 agosto 06]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/294868498_EVALUACION_DE_L_PODER_BACTERICIDA_DE_MIEL_DE_ABEJA_POLIFLORAL SOBRE_GERMENES_DE_PACIENTES_INTERNADOS_EN_UN_HOSPITAL_PEDIATRICO
 11. Mama M, Teshome T, Detamo J. Antibacterial Activity of Honey against *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*: A Laboratory-Based Experimental Study. International Journal of Microbiology. 2019. Octubre. [En Línea] [Citado: 2019 agosto 07]. DOI: 7686130 Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2019/7686130/>
 12. Dela Cruz M, Fahmi S, Charng W, Fattepur S, Chanabasappa K, Khan J, et al. A Comparative Study of the Antimicrobial Activity of Wild (Tualang) Honey and Artificial Honey Against *Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus Pneumoniae* and *Klebsiella Pneumoniae*. ResearchGate 2018. [En Línea] [Citado: 2019 abril 04]. DOI: 10.5220/0008358301110117. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/May_Florence_Bacayo/publication/34177114_A_Comparative_Study_of_the_Antimicrobial_Activity_of_Wild

Tualang Honey and Artificial Honey Against Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus Streptococcus Pneumoniae and Klebsiella Pneumoniae/links/5d1c6a45299bf1547c92dc8e/A-Comparative-Study-of-the-Antimicrobial-Activity-of-Wild-Tualang-Honey-and-Artificial-Honey-Against-Methicillin-resistant-Staphylococcus-Aureus-Streptococcus-Pneumoniae-and-Klebsiella-Pneumoniae.pdf

13. Mabrouka B, Hayette A, Nedjoud G. Honey Bee as Alternative Medicine to Treat Eleven Multidrug-Resistant Bacteria Causing Urinary Tract Infection during Pregnancy. Scientia Pharmaceutica 2018. [En Línea] [Citado: 2019 agosto 08]; 86(2):14. DOI: 10.3390 / scipharm86020014. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/324509516> Honey Bee as Alternative Medicine to Treat Eleven Multidrug-Resistant Bacteria Causing Urinary Tract Infection during Pregnancy
14. Jayanthi N, Asokan S. Antibacterial Activity of Honey Samples on *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA)* Isolated from Human Conjunctiva. Journal Of Pharmacy 2017. [En Línea][Citado: 2019 octubre 04]; 7(1): 39-45. Disponible en: <http://www.iosrphr.org/papers/vol7-issue10/G0710013945.pdf>
15. Vayas B. Evaluación de métodos de sensibilidad en la efectividad antimicrobiana de la miel de abeja sobre cepa certificada de (*Staphylococcus aureus*). [Tesis de Pregrado]. Cevallos: Ecuador; 2017.
16. Amuche J, Okafor J, Innocent E, Eyiuche J. Comparison of Antimicrobial Potential of Honey Samples from *Apis mellifera* and Two Stingless Bees from Nsukka, Nigeria. J Pharmacogn Nat Prod 2016. [En Línea] [Citado: 2019 octubre 06]; 2(4):124. DOI: 10.4172/2472-0992.1000124. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Eyiuche_Nweze/publication/311384624 Comparison of Antimicrobial Potential of Honey Samples from *Apis mellifera* and Two Stingless Bees from Nsukka Nigeria/links/5843b40d08ae61f75dd33836/Comparison-of-Antimicrobial-Potential-of-Honey-Samples-from-Apis-mellifera-and-Two-Stingless-Bees-from-Nsukka-Nigeria.pdf
17. Wasihum AG, Kasa BG. Evaluation of antibacterial activity of honey against multidrug resistant bacteria in Ayder Referral and Teaching

- Hospital, Northern Ethiopia Wasihun and Kasa. National Center for Biotechnology Information 2016. [En Línea] [Citado: 2019 octubre 08]; 5(1):842. DOI: 10.1186/s40064-016-2493-x. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27386291>
18. Poovelikunnel T. Natural Honey to Eradicate Nasal Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) A Randomised Control Trial. Department of Clinical Microbiology Royal Collage of Surgeons in Ireland. [Tesis Doctoral] Irlanda; 2016.
 19. Eslami H, Ariamanesh N, Ariamanesh A, Samadi H. Synergistic Effect of Honey and Azarian Propolis on Oral Microorganisms: An In Vitro Study. Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects 2016. [En Línea] [Citado: 2019 octubre 04]; 7(3): 31-36. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Hossein_Kafil/publication/292986725_Synergistic_effect_of_honey_and_Azarian_propolis_toward_oral_microorganisms_an_in_vitro_study/links/586d43ca08ae6eb871bce21a/Synergistic-effect-of-honey-and-Azarian-propolis-toward-oral-microorganisms-an-in-vitro-study.pdf
 20. Akinkunmi E, Adesunkanmi A, Lamikanra A. Comparative Antibacterial Activity of Some Nigerian Honey and Commonly Used Antiseptic Agents against Strains of MRSA and Other Multidrug Resistant *Staphylococci* Isolates From Surgical Wound Infections. Nigerian Journal of Pharmaceutical Research 2015. [En Línea] [Citado: 2019 octubre 04]; 11(1):32-39. Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/njpr/article/view/162983>
 21. Aamer A, Abdul-Hafeez M, Sayed S. Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC and MBC) of Honey and Bee Propolis against Multi-Drug Resistant (MDR) *Staphylococcus sp.* Isolated from Bovine Clinical Mastitis. Altern Integ Med 2014. [En Línea] [Citado: 2019 octubre 04]; 3(4), 171. doi:10.4172/2327-5162.1000171. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Sreenivasa_Aa/publication/273161928_Minimum_Inhibitory_and_Bactericidal_Concentrations_MIC_and_MB_C_of_Honey_and_Bee_Propolis_against_Multi-Drug_Resistant_MDR_Staphylococcus_sp_Isolated_from_Bovine_Clinical_Mastitis/links/5771163208ae6219474a350a/Minimum-Inhibitory-and-

Bactericidal-Concentrations-MIC-and-MBC-of-Honey-and-Bee-Propolis-against-Multi-Drug-Resistant-MDR-Staphylococcus-sp-Isolated-from-Bovine-Clinical-Mastitis.pdf

22. Ewnetu Y, Lemma W, Birhane N. Antibacterial effects of *Apis mellifera* and stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in Gondar, Northwest Ethiopia. *BCM Complement Altern Med* 2013. [En Línea] [Citado: 2019 agosto 07]; 13:269. DOI: 10.1186 / 1472-6882-13-269. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24138782>
23. Srisayam M, Chantawannakul P. Antimicrobial and antioxidant properties of honeys produced by *Apis mellifera* in Thailand. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 2010. [En Línea] [Citado: 2019 octubre 04]; 2(2):77–83. DOI: 10.3896/IBRA.4.02.2.03. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/250278974_Antimicrobial_and_antioxidant_properties_of_honeys_produced_by_Apis_mellifera_in_Thailand
24. Rajeswari T, Venugopal A, Viswanathan C, Kishmu L, Venil C, kumar S. Antibacterial activity of honey against *staphylococcus aureus* from infected wounds. *Pharmacologyonline* 2010. [En Línea] [Citado: 2019 octubre 04]; 1(1): 537-541. Disponible en: <https://pharmacologyonline.silae.it/files/newsletter/2010/vol1/59.Kumar.pdf>
25. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología médica*. 7 ed. Barcelona: España. Elsevier; 2014.pp.174-187.
26. Brooks G, Carroll K Butel J, Morse S, Mietzner T. *Microbiología médica*. 25ed. México DF. Mc Graw Hill ; 2011.pp185-191
27. Ahmad N, Plorde J, Lawrance W. *Sherris Microbiología Médica*. 5ed. México DF. McGraw Hill; 2011. pp331-341
28. Moncayo J, Corredor L, Luligo J, Álvarez A, Santacruz J. Correlación entre la detección de superantígenos y resistencia a oxacilina en aislamientos hospitalarios de *Staphylococcus aureus*. *Elsevier: Asociación Colombiana de Infectología* 2015. [En Línea] [Citado: 2019 agosto 13]; 19(3): 109-114. DOI: 10.1016/j.infect.2015.02.004. Disponible en:

- http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012393922015000300003&script=sci_abstract&lng=es
29. Kasper D, Hauser S, Jameson J, Fauci A, Longo D, Loscalzo J. Harrison Principios de Medicina Interna. 19ed. México DF. McGraw Hill; 2016. pp: 954-959.
 30. Aguayo A, Quezada M, Mella S, Riedel G, Opazo A, Bello H, et al. Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. Rev. chil. Infectol 2018. [En Línea] [Citado: 2020 mayo 05]; 35(1):7-14. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000100007>. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182018000100007
 31. Brunton L, Chabner B, Knollmann B. Goodman y Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. México DF. Mc Graw Hill; 2012. pp1486-1489
 32. Rozman C. Farreras Rozman Medicina Interna. 18ed. Barcelona: España. Elsevier; 2016. pp 2072-2075
 33. Katzung B, Trevor A. Farmacología Básica y Clínica. 13ed. Mc Graw Hill. México DF; 2016. pp781-781
 34. Coordinación General de Ganadería. Manual de buenas prácticas de producción de miel. 3ed. México:DF. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; 2015.
 35. Salamanca G, Osorio M, Reyes L. Propiedades fisicoquímicas de mieles monoflorales de encenillo de la zona altoandina en boyacá. Colombia. *Química Nova* 2017. [En Línea] [Citado: 2019 agosto 14]; 40(8):854-864. Disponible en : <https://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170084>
 36. Herrero F. Lo que Ud. Debe saber sobre las abejas y la miel. España: Caja España; 2004.
 37. Lavandera I. Curación de heridas sépticas con miel de abejas. Rev Cubana Cir 2011. [En Línea] [Citado: 2019 agosto 14]; 50(2):187-196. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74932011000200006&lng=es.
 38. Cortés M, Vigil P, Montenegro G. The medicinal value of honey: a review on its benefits to human health, with a special focus on its effects on

- glycemic regulation. Ciencia e investigación agraria 2011. [En Línea] [Citado: 2019 agosto14]; 38(2):303-317. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202011000200015>. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-16202011000200015&lng=en&nrm=iso&tlng=en
39. Guillermo L. Cómo cura la miel. España: Barcelona. España: RBA Libros; 2017.
40. Schencke C, Vásquez B, Sandoval C, del Sol M. El Rol de la Miel en los Procesos Morfofisiológicos de Reparación de Heridas. Int. J. Morphol 2016. [En Línea] [Citado: 2019 agosto 13]; 34(1): 385-395. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022016000100056>. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022016000100056
41. Sampieri H, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 6ta ed. México, D.F. McGraw-Hill; 2016. pp45
42. Dorlan Diccionario Médico. 28ed. México DF .McGraw Hill; 2010. pp52
43. Alvo A V1, Téllez V, Sedano C, Fica A. Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello 2016. [En Línea] [Citado: 2019 septiembre 20]; 76: 136-147. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/orl/v76n1/art19.pdf>
44. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
45. CLSI.M100 Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility Testing. 28ed. USA. Clinical and Laboratory Standars Institute; 2018; 38(3): 95-96.
46. Manual de bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. [En línea]. 3ra ed. 42. Perú: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2005. [En Línea] [Citada: 2020 Mayo 03]. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1669.pdf>
47. Ley de biodiversidad. [En Línea] [Citado 15 setiembre 2020]. Disponible en: <https://www.wipo.int/edocs/lexdocs/laws/es/cr/cr082es.pdf>
48. CLSI.M07 A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition. USA. Clinical and Laboratory Standars Institute; 2015; 35(2): 110.

ANEXOS

ANEXO 01

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

RG1 X1 01

RG2 X2 02

RG3 X3 03

RG4 X4 04

Dónde:

•**RG**: Grupo de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, seleccionados aleatoriamente.

•**X1**: Tratamiento con miel de *Apis mellífera* (400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 y 0.78 mg/ml).

•**X2**: Tratamiento con miel de *Apis mellífera* asociada a vancomicina (400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 y 0.78 mg/ml).

•**X3**: Tratamiento con vancomicina (400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 y 0.78 mg/ml) (control positivo).

•**X4**: Tratamiento con solución salina (control negativo).

•**O**: Observación de crecimiento bacteriano

ANEXO 02

MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
Agente antibacteriano	<p>Son sustancias químicas que inhiben o destruyen el desarrollo de otros microorganismos ³⁹</p> <p>Agente no farmacológico: Miel de <i>Apis mellífera</i>.</p> <p>Agente farmacológico: Vancomicina</p>	<p>Se hará la dilución en los siguientes 4 grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Miel de <i>Apis mellífera</i> al 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 y 0.78 mg/ml con Vancomicina a 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 y 0.78 mg/ml ● Miel de <i>Apis mellífera</i> al 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 y 0.78 mg/ml. ● Vancomicina 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 y 0.78 mg/ml ● Solución salina 	<p>Grado de turbidez en grupos:</p> <p>RG1</p> <p>RG2</p> <p>RG3</p> <p>RG4</p>	<p>Cualitativa Nominal</p>
Efecto antibacteriano	<p>Acción directa en la erradicación del agente sin afectar al huésped ^{.43}</p>	<p>Se considera según CLSI M100⁴⁵:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Sensible: ≤ 2 mg/ml ● Intermedio: 4-8 mg/ml ● Resistente: 16 mg/ml 	<p>Si efecto antibacteriano:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Eficaz: CIM ≤ 2 mg/ml ● No eficaz: CIM >2 mg/ml 	<p>Cualitativa nominal</p>

ANEXO 03

TAMAÑO DE MUESTRA

FÓRMULA UTILIZADA: Formula estadística para comparación de dos medias.

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

Dónde:

$Z_{\alpha/2} = 1.96$ Para un nivel de confianza del 95%

$Z_{\beta} = 0.84$ para una potencia de prueba del 80%

$\bar{X}_1 = 8.52$ (19)

$\bar{X}_2 = 2$ (45)

$\sigma^2 = 3.04$ (19)

$n = 3,41 = 4$ repeticiones

Se trabajó con 7 repeticiones, a criterio de autor y sugerencia de los especialistas.

ANEXO 04

INSTRUMENTO: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS: GRADO DE TURBIDEZ EN TUBOS SEGÚN LAS DILUCIONES DE LA MIEL DE APIS MELLÍFERA Y EL FÁRMACO EMPLEADO.

Inhibición del crecimiento de MRSA										
N° repetición	Miel de abejas (mg/ml)									
	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78
1	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
2	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
3	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
4	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
5	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
6	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
7	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
N° repetición	Miel de abejas + Vancomicina (mg/ml)									
	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78
1	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
2	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
3	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
4	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
5	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
6	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
7	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
N° repetición	Vancomicina (mg/ml)									
	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78
1	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
2	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
3	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
4	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
5	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
6	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
7	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—

ANEXO 05

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

VALIDEZ DE TEST: JUICIO DE EXPERTOS

INSTRUCTIVO PARA LOS JUECES

Indicación: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems del cuestionario/ guía de observación o ficha de recolección de datos, el mismo que le mostramos a continuación, indique de acuerdo a su criterio y su experiencia profesional el puntaje de acuerdo a si la pregunta permite capturar las variables de investigación del trabajo.

En la evaluación de cada ítem, utilice la siguiente escala:

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Los rangos de la escala propuesta deben ser utilizados teniendo en consideración los siguientes criterios:

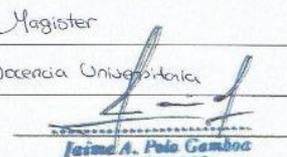
- ⊕ Vocabulario adecuado al nivel académico de los entrevistados.
- ⊕ Claridad en la redacción.
- ⊕ Consistencia Lógica y Metodológica.

Recomendaciones:

.....
.....
.....
.....

Gracias, por su generosa

colaboración

Apellidos y nombres	Polo Gamboa Jaime Abelardo
Grado Académico	Magister
Mención	Docencia Universitaria
Firma	 Jaime A. Polo Gamboa MICROBIOLOGO CIP 0251

FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

ITEM	CALIFICACIÓN DEL JUEZ			OBSERVACIÓN
	1	2	3	
Número de placas de <i>Staphylococcus aureus melittino resistente</i> ATCC 43300				
Tratamiento con miel de <i>Apis Mellifera</i>				
Tratamiento con Vancomicina 2 ug				
Tratamiento con miel de <i>Apis Mellifera</i> + Vancomicina 2ug				
Solución de NaCl al 0,9%				

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Firma y sello:

Jairo A. Pardo Gamboa
 MICROBIOLOGO
 CBF 0951

CBP: 0951

VALIDEZ DE TEST: JUICIO DE EXPERTOS

INSTRUCTIVO PARA LOS JUECES

Indicación: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems del cuestionario/ guía de observación o ficha de recolección de datos, el mismo que le mostramos a continuación, indique de acuerdo a su criterio y su experiencia profesional el puntaje de acuerdo a si la pregunta permite capturar las variables de investigación del trabajo.

En la evaluación de cada ítem, utilice la siguiente escala:

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Los rangos de la escala propuesta deben ser utilizados teniendo en consideración los siguientes criterios:

- ⊕ Vocabulario adecuado al nivel académico de los entrevistados.
- ⊕ Claridad en la redacción.
- ⊕ Consistencia Lógica y Metodológica.

Recomendaciones:

.....
.....
.....
.....

Gracias, por su generosa colaboración

Apellidos y nombres	Zarate Portilla Liz Fiorella
Grado Académico	Médico Cirujano
Mención	Medico Cirujano
Firma	 <small>CONSULTORA EN INVESTIGACIONES ZARATE PORTILLA LIZ FIORELLA C.R. SEP. 2008 C.R. 123456789</small>

VALIDEZ DE TEST: JUICIO DE EXPERTOS

INSTRUCTIVO PARA LOS JUECES

Indicación: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems del cuestionario/ guía de observación o ficha de recolección de datos, el mismo que le mostramos a continuación, indique de acuerdo a su criterio y su experiencia profesional el puntaje de acuerdo a si la pregunta permite capturar las variables de investigación del trabajo.

En la evaluación de cada ítem, utilice la siguiente escala:

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Los rangos de la escala propuesta deben ser utilizados teniendo en consideración los siguientes criterios:

- ⊕ Vocabulario adecuado al nivel académico de los entrevistados.
- ⊕ Claridad en la redacción.
- ⊕ Consistencia Lógica y Metodológica.

Recomendaciones:

.....
.....
.....
.....

Gracias, por su generosa colaboración

Apellidos y nombres	Chávez Rimarachin Manuel
Grado Académico	Maestro
Mención	Medicina
Firma	 Manuel B. Chávez Rimarachin MEDICINA INTERNA CMP. 39634 RNE. 19588

FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

ITEM	CALIFICACIÓN DEL JUEZ			OBSERVACIÓN
	1	2	3	
Número de placas de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente <i>ATCC 43300</i>			X	
Tratamiento con miel de <i>Apis Mellifera</i>			X	
Tratamiento con Vancomicina 2 ug			X	
Tratamiento con miel de <i>Apis Mellifera</i> + Vancomicina 2ug			X	
Solución de NaCl al 0.9%			X	

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

ANEXO 06

A) OBTENCIÓN DE MIEL DE APIS MELLIFERA

Miel recolectada y distribuida a través de botica de alimentos y suplementos naturales Shangri-la.



B) OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO RESISTENTE

Los cultivos del proyecto fueron obtenidos en el laboratorio de la U.N.T.

C) MÉTODO DE DILUCIÓN PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA BACTERIAS QUE CRECEN AERÓBICAMENTE ⁴⁸

MÉTODO DIRECTO DE SUSPENSIÓN DE COLONIAS PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Este procedimiento es el más conveniente para preparar el inóculo, ya que se puede usar con casi todos los organismos; es el método recomendado para probar los organismos exigentes y para analizar la cefoxitina y *estafilococos* para detectar la resistencia a meticilina u oxacilina.

1. Se realiza una suspensión salina o un caldo directo de aislados de colonias selectas de una placa de agar sangre (medio no selectivo) de 18 a 24 horas.
2. Se ajusta la suspensión para obtener una turbidez semejante al estándar de 0.5 Mc Farland.
3. Utilice un dispositivo fotométrico o de hacerse visualmente, se emplea la iluminación apropiada con el fin de contrastar el estándar 0.5 Mc Farland con el inóculo sobre una tarjeta contrastante de líneas negras y fondo blanco.

MÉTODO DE CALDO DE MACRODILUCIÓN (TUBO)

Preparación y almacenamiento de agentes antimicrobianos diluidos

1. Utilice tubos de ensayo estériles de 13 x 100 mm para realizar la prueba.

Si los tubos se van a guardar para más tarde, asegúrese de pueden ser congelados.

2. Cierre los tubos con tapones de rosca sueltos, cierre de plástico o metal gorras, tapones dorados de algodón.
3. Utilice un tubo de control de crecimiento que contenga caldo sin antimicrobiano agente para cada organismo probado.



4. Prepare las diluciones finales dobles (u otras) de agentes antimicrobianos volumétricamente en el caldo. Se necesita un volumen final mínimo de 1 ml de cada dilución para la prueba.

5. Use una pipeta con el objetivo de medir los diluyentes y luego adicionar la solución antimicrobiana original en el primer tubo. Posteriormente en el proceso de dilución posterior, se empleará una nueva pipeta.
6. El día de la preparación use los tubos y seguidamente póngalos al congelador a ≤ -20 °C (preferiblemente a ≤ -60 °C) hasta que sea necesario.

Los agentes antibacterianos permanecen estables durante varios meses puestos en tubos congelados.

Las soluciones antimicrobianas descongeladas no deben volverse a congelar; repetido los ciclos de congelación y descongelación aceleran degradación de algunos antimicrobianos agentes, particularmente betalactamasa.



INCUBACIÓN

Incubar los tubos de macrodilución inoculadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ °C por 16-20 horas a través de la incubadora aire ambiente dentro de 15 minutos de agregar el inóculo.

INOCULACIÓN

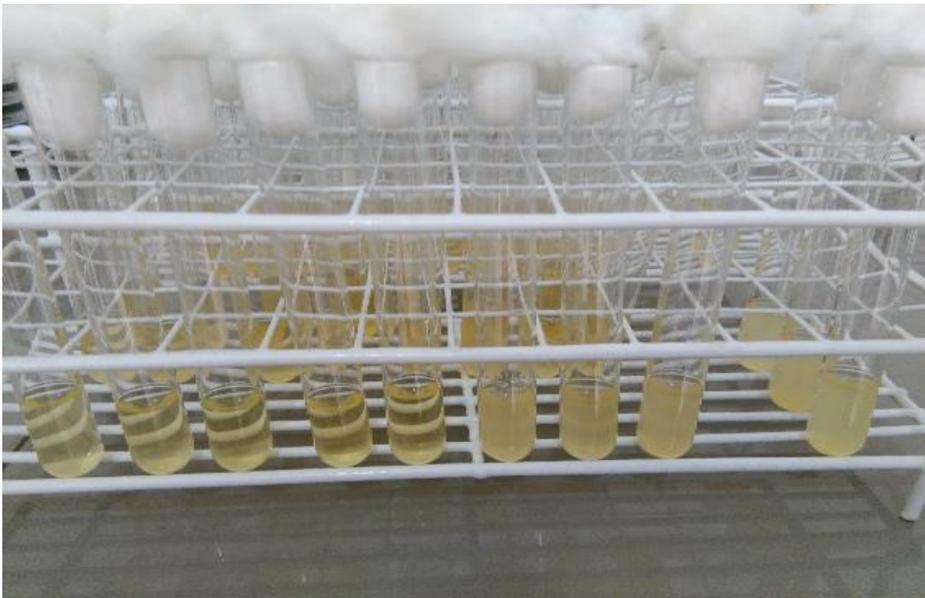
El inóculo final fue de 5 (se tolera de 3 a 7) $\times 10^5$ CFU/ml, o de 5×10^4 CFU/ pocillo en la técnica de macrodilución. En función de ello la suspensión del inicio se diluyó en caldo Mueller- Hinton. En lo que respecta el método de macrodilución se hizo una dilución 1:100 de manera que al añadir 1ml a los tubos con 1ml de medio antimicrobiano queden 10^6 CFU en 2ml, es



decir 5×10^5 CFU/ml. Las placas de microdilución deben taparse o sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben.

Es necesario realizar el control del inóculo ya preparado, por medio del sembrado de alícuotas diluidas en un medio sólido, que una vez incubadas, permitan realizar el recuento del inóculo realmente usado.

Para evitar diferencias de temperatura en la incubación de bloques de tubos de micro titulación no se apilan más de cuatro o cinco tubos. Posterior a la incubación se continúa con la lectura de resultados. La CIM se define como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente el crecimiento del microorganismo en estudio. La interpretación de los resultados, que muchas veces es compleja, se facilita tomando como referencia la observación del crecimiento en los tubos empleados en el control positivo.



Evaluación del grado de turbidez en los tubos de acuerdo a grupo.

ANEXO 07

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Sinergia antimicrobiana de la miel de *Apis mellífera* con vancomicina sobre
Staphylococcus aureus meticilino resistente in vitro

N° repetición	Concentración Inhibitoria Mínima - CIM (mg/ml)			
	Miel	Miel + VAN	VAN	Sol. salina
1	100	12.5	12.5	> 400
2	50	6.25	12.5	> 400
3	100	6.25	12.5	> 400
4	100	6.25	12.5	> 400
5	100	12.5	12.5	> 400
6	100	6.25	6.25	> 400
7	50	12.5	12.5	> 400

ANEXO 08

Manual de Procedimientos de Bioseguridad



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS BIOSEGURIDAD EN LABORATORIOS DE ENSAYO, BIOMÉDICOS Y CLÍNICOS



SERIE DE NORMAS TÉCNICAS Nº 18

ANEXO 09

Ley N° 26839

Ley sobre la conservación y aprovechamiento sostenible de la diversidad biológica

Ley N° 26839

EL PRESIDENTE DE LA REPUBLICA POR CUANTO: El Congreso de la República ha dado la Ley siguiente:

EL CONGRESO DE LA REPUBLICA

Ha dado la Ley siguiente:

LEY SOBRE LA CONSERVACION Y APROVECHAMIENTO SOSTENIBLE DE LA DIVERSIDAD BIOLOGICA

TITULO I: DISPOSICIONES GENERALES

Artículo 1.- La presente ley norma la conservación de la diversidad biológica y la utilización sostenible de sus componentes en concordancia con los artículos 66o. y 68o. de la Constitución Política del Perú.

Los principios y definiciones del Convenio sobre Diversidad Biológica rigen para los efectos de aplicación de la presente ley.

Artículo 2.- Cualquier referencia hecha en la presente Ley a "Convenio" debe entenderse referida al Convenio sobre la Diversidad Biológica, aprobado por Resolución Legislativa No. 26181.

Artículo 3.- En el marco del desarrollo sostenible, la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica implica:

- a) Conservar la diversidad de ecosistemas, especies y genes, así como mantener los procesos ecológicos esenciales de los que dependen la supervivencia de las especies.
- b) Promover la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de la diversidad biológica.
- c) Incentivar la educación, el intercambio de información, el desarrollo de la capacidad de los recursos humanos, la investigación científica y la transferencia tecnológica, referidos a la diversidad biológica y a la utilización sostenible de sus componentes.
- d) Fomentar el desarrollo económico del país en base a la utilización sostenible de los componentes de la diversidad biológica, promoviendo la participación del sector privado para estos fines.

Artículo 4.- El Estado es soberano en la adopción de medidas para la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica.

En ejercicio de dicha soberanía el Estado norma y regula el aprovechamiento sostenible de los componentes de la diversidad biológica.

Artículo 5.- En cumplimiento de la obligación contenida en el artículo 68o. de la Constitución Política del Perú, el Estado promueve:

- a) La priorización de acciones de conservación de ecosistemas, especies, y genes, privilegiando aquellos de alto valor ecológico, económico, social y cultural identificados en la Estrategia Nacional sobre Diversidad Biológica a que se refiere el artículo 7o. de la presente ley.
- b) La adopción de un enfoque integrado para el manejo de tierras y agua, utilizando la cuenca hidrográfica como unidad de manejo y planificación ambiental.
- c) La conservación de los ecosistemas naturales así como las tierras de cultivo, promoviendo el uso de técnicas adecuadas de manejo sostenible.