

COMUNICACIÓN

Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

Evaluation of two methods for measuring the sensitivity of growth inhibition of the certified *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strain

Mayra Montero-Recalde^{1,2}, Lorena Vayas¹, Diana Avilés-Esquivel¹, Pilar Pazmiño¹, Vinicio Erazo-Gutierrez¹

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo evaluar dos métodos de sensibilidad para la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 11632), el método de Kirby-Bauer y el de pozos modificados de agar, mediante la utilización de miel de abeja pura de *Apis mellifera* en una concentración al 100%. El método modificado en pozos de agar formó halos de inhibición de 25.04 mm y el de Kirby-Bauer de 21.15 mm, indicando que el método modificado en pozos de agar es más sensible que el de Kirby-Bauer.

Palabras clave: *Apis mellifera*; Kirby-Bauer; método modificado en pozos de agar; halos de inhibición

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate two methods of sensitivity for the inhibition of the growth of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 11632), the Kirby-Bauer method and the modified agar wells, using honey 100% from *Apis mellifera*. The modified method in agar wells formed inhibition halos of 25.04 mm and that of Kirby-Bauer of 21.15 mm, indicating that the modified method in agar wells is more sensitive than the Kirby-Bauer method.

Key words: *Apis mellifera*; Kirby-Bauer; modified method in agar wells; inhibition halos

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Cevallos, Tungurahua, Ecuador

² E-mail: ma.montero@uta.edu.ec

Recibido: 1 de febrero de 2018

Aceptado para publicación: 4 de julio de 2018

INTRODUCCIÓN

La introducción de elevadas cantidades de antibióticos en el mercado mundial y el abuso irracional de los mismos ha provocado una alteración ecológica de los gérmenes, produciendo que estos agentes desarrollen la capacidad de inactivarlos (Patiño, 2003). Actualmente, su impacto es considerable con los fracasos de tratamiento asociados con bacterias multirresistentes y se ha convertido en una preocupación mundial para la salud pública (Martin *et al.*, 2015).

La emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento del número de publicaciones relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana (Redo *et al.*, 1989; Silver y Bostian, 1993). Por esta razón, los productos naturales siguen siendo una de las principales fuentes de nuevas moléculas de fármacos en la actualidad (Berdy, 2005).

En la actualidad, las investigaciones se centran en terapias alternas mediante la utilización de extractos microbianos, plantas, aceites esenciales, metabolitos secundarios y nuevas moléculas sintetizadas como agentes antimicrobianos potenciales (Nazzaro *et al.*, 2013). Se puede utilizar una variedad de métodos de laboratorio para evaluar o analizar la actividad antimicrobiana *in vitro* de un extracto o un compuesto puro. Varios bioensayos como la difusión en disco, la difusión de pozos y la dilución en caldo o en agar son de uso común, pero otros como los métodos citofluorométricos y bioluminiscentes de flujo no son ampliamente utilizados porque requieren equipo especializado y una evaluación adicional para reproducibilidad y estandarización (Balouri *et al.*, 2016).

Los ensayos de susceptibilidad están indicados para apoyar la terapia antimicrobiana

en procesos infecciosos por bacterias, donde la identidad del microorganismo no es suficiente para predecir en forma confiable su sensibilidad. Los mecanismos de resistencia incluyen la producción de enzimas que inactivan la droga, que alteran el objetivo, o que alteran la acción del agente etiológico (Malbrán, 2012).

Debido a la creciente necesidad de conocer las propiedades de nuevos productos antimicrobianos para el combate a bacterias multirresistentes, es importante desarrollar una mejor comprensión de los métodos actuales que se usan a nivel de laboratorio; por lo tanto, en este estudio se evaluaron dos métodos de sensibilidad sobre una cepa certificada de *Staphylococcus aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, sector Querochaca, Ecuador, ubicado a una altitud de 2865 m, latitud: 1° 22' 2" S, longitud: 78° 36' 20" W.

Material Experimental

Se utilizó la miel de abeja pura de *Apis mellifera*, procedente de la parroquia Santa Rosa Barrio Lomas de Garcés de la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua, Ecuador. El pH de la miel de abeja se determinó con un pHmetro (Bante 900 multi-parameter meter). Así mismo, se obtuvo una cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 11632).

Preparación del Inóculo

Para el aislamiento se activó la cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 11632) en agar sal manitol. Se cultivó mediante el método de estriación escocés y se incubó a 37 °C por 24 h, en posición invertida en la incubadora.

Para la preparación del inóculo se tomaron cinco colonias bien definidas con un hisopo estéril y se inocularon en 5 ml de caldo cerebro corazón, incubándose a 37 °C por 2 h hasta que se observó una turbidez ligeramente visible. Se estandarizó la densidad del inóculo mediante el espectrofotómetro a 620 nm comparándola con la turbidez estándar del tubo número 5 de la escala de McFarland, dando como resultado una suspensión final de $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (CFU) por mililitro (UCF/ml) (NCCLS, 2012).

Discos de Sensibilidad

Se tomaron 0.5 ml de miel de abeja pura homogenizada y se impregnó cada disco con la concentración al 100% de miel de abeja durante 24 h (Becerra *et al.*, 2016).

Cultivo Bacteriano

Difusión en agar

Un hisopo estéril se sumergió en el inóculo estandarizado al 0.5 de la escala de McFarland y se llevó a siembra en agar Mueller Hinton estriándose en forma paralela y compacta abarcando toda la superficie del agar, repitiendo el proceso rotando la placa 60° en dos oportunidades más y dejando secar durante 5 min antes de colocar los discos. Estos se ubicaron en la placa de agar.

Los discos se ubicaron en la placa de agar con una pinza anatómica estéril a 15 mm del borde de la placa, presionando suavemente sobre el agar para permitir su adherencia. Se colocaron cuatro discos impregnados con miel de abeja al 100% en cada placa, sumando un total de 24 repeticiones con cuatro tratamientos. Se incubaron a 37 °C en grupos no mayores a cinco placas durante 24 h, de manera invertida. La lectura de la prueba de sensibilidad se hizo por medio de una regleta de medición y se interpretaron los resultados como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) (NCCLS, 2012).

Pozos modificados de agar

La siembra se hizo siguiendo el procedimiento indicado para la prueba de difusión en agar. Antes de dejar secar el inóculo se hicieron los pozos en las placas con una cuchareta sacabocados de 6 mm. En cada pozo se vertió 50 µl de miel de abeja pura, dejándose reposar por 30 min y se incubó a 37 °C por 24 h. Se realizó la lectura de sensibilidad igual que en el método Kirby-Bauer (Gamboa y Figueroa, 2009).

RESULTADOS

Los resultados de los halos de inhibición (en mm) fueron sometidos a la prueba de Shapiro-Wilk, determinándose que tienen una distribución normal. Es así, que se aplicó la prueba paramétrica de «t» Student para muestras independientes para comparar las medias de los dos métodos de cultivos (Kirby-Bauer y pozos modificados de agar).

Los halos de inhibición fueron de 21.16 ± 3.12 mm para el método Kirby-Bauer y de 25.04 ± 2.71 mm para el método de pozos modificados de agar ($t=-4.59$; $p=0.000$), indicando que el método de pozos modificados de agar mostró mayor sensibilidad para el uso de miel de abeja de *Apis mellifera* contra la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 11632). Así mismo, la prueba de Levene indicó que las varianzas de ambos grupos fueron similares.

DISCUSIÓN

Los resultados concuerdan con los estudios de Gamboa y Figueroa (2009), quienes utilizaron miel de abeja en pozos a volúmenes de 100 µl, y de Zamora y Arias (2011) con el mismo procedimiento, pero en pozos de 120 µl, donde se demuestra la efectividad de la miel de abeja en altas concentraciones sobre *Staphylococcus aureus*.

Rojas *et al.* (2005), con base a su estudio, recomiendan utilizar el método modificado de pozos en agar para realizar ensayos de actividad antimicrobiana debido a su alta sensibilidad; aspecto que fue confirmado en el presente estudio. Los halos de inhibición entre 15 y 28 mm de este estudio obtenidos con el método Kirby-Bauer fueron similares a los obtenidos por Elijah *et al.* (2015) utilizando miel de abeja al 100% a una dosis de 0.2 ml. Es importante mencionar que Rodríguez-Baño *et al.* (2008) observaron que *S. aureus* fue el microorganismo cuyo crecimiento se vio mayormente afectado por la miel de abeja, obteniéndose halos de inhibición de 25 mm. Conclusiones similares fueron reportadas por Cabrera *et al.* (2006) utilizando diferentes concentraciones de miel de abeja, aunque los halos de inhibición para *S. aureus* fueron menores (17 mm).

Se utilizó la máxima concentración (100%) debido a que se quería evaluar los métodos de sensibilidad. En este sentido, Lavandera (2011) menciona que cuanto mayor sea la concentración de miel mayor será su utilidad como agente antibacteriano. De la misma manera, Zamora y Arias (2011) y Efem *et al.* (1992) destacaron que el 90% de las muestras con miel de abeja a una concentración del 100% ejercieron un efecto inhibitorio sobre *S. aureus* y que muestras de miel diluidas al 25% también presentaron actividad contra *S. aureus*. Así mismo, Malika *et al.* (2004) reportan inhibición del crecimiento de *S. aureus* con concentraciones de 25 y 50%.

El efecto bactericida de la miel de abeja de *Apis mellifera* estaría asociado al pH de 3.42 que presentó, el cual es lo suficientemente bajo para inhibir a varios patógenos bacterianos (Koochak *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

El método en pozos modificados de agar presentó mayor sensibilidad que el método Kirby-Bauer para determinar la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

LITERATURA CITADA

1. **[NCCLS] National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2012.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. M02-A11. 11th ed. Wayne, USA: NCCLS. 76 p.
2. **Balouiri, M, Bouhdid S, Harki E, Sadiki M, Ouedrhiri W. 2015.** Antifungal activity of *Bacillus* spp isolated from *Calotropis procera* ait rhizosphere against *Candida albicans*. Asian J Pharm Clin Res 8: 213-217.
3. **Becerra DJ, Cabrera JC, Solano M. 2016.** Efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*. Rev Cient Cienc Méd 19: 38-42.
4. **Bérdy J. 2005.** Bioactive microbial metabolites. Journal Antibiot 58: 1-26. doi: 10.1038/ja.2005.1
5. **Cabrera L, Céspedes E, Nava R, Ojeda G 2006.** Actividad antibacteriana no-peróxido de mieles zulianas. Rev Cient (Maracaibo) 16: 556-553.
6. **Efem SE, Udoh KT, Iwara CI. 1992.** The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. Infection 20: 227-229.
7. **Elijah MI, Imohiosen O, Lamidi BT, Umar MS. 2015.** Biochemical screening of pure honey and its antibacterial activity on some bacterial isolates compared with a common antibiotic. Int J Pharmac Sci Inv 4: 15-20.
8. **Gamboa V, Figueroa J. 2009.** Poder antibacteriano de mieles de *Tetragonisca angustula*, valorada por concentración mínima inhibitoria. Acta Biol Colomb 14: 97-106.
9. **Koochak H, Seyyednejad SM, Motamedi H. 2010.** Preliminary study on the antibacterial activity of some medicinal plants of Khuzestan (Iran). Asian Pac J Trop Med 3: 180-184. 10.1016/S1995-7645(10)60004-1
10. **Lavandera I. 2011.** Curación de heridas sépticas con miel de abejas. Rev Cubana Cirugía 50: 187-196.

11. **Malbrán C. 2012.** Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Microbiol J* 32: 1-43.
12. **Malika M, Mohamed F, Chabik EA. 2015.** Antimicrobial activities of natural honey from aromatic and medicinal plants on antibio- resistant strains of bacteria. *Int J Agric Biol* 6: 289-293.
13. **Martín I, Sawatzky P, Liu G, Mulvey MR. 2015.** Antimicrobial resistance to *Neisseria gonorrhoeae* in Canada: 2009-2013. *Can Commun Dis Rep* 41: 35-41.
14. **Nazzaro F, Fratianni F, de Martino L, Coppola R, de Feo V. 2013.** Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 6: 1451-1474. doi. 10.3390/ph6121451
15. **Patiño D. 2003.** ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos?. *Umbral Científico* 3: 48-56
16. **Redo MC, Rios JL, Villar A. 1989.** A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytother Res* 3: 117-125. doi: 10.1002/ptr.26500-30402
17. **Rodríguez-Baño J, Bischofberger C, Álvarez-Lermac F, Asensio A, Delgado T, García-Arcal D, García-Ortega L, et al. 2008.** Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Documento de consenso GEIH-SEIMC y SEMPSPH. *Enferm Infec Microbiol Clin* 26: 285-298. doi: 10.1016/j.eimc.-2011.09.018
18. **Rojas JJ, García AM, López AJ. 2005.** Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Bol Latinoam Caribe Pl* 4: 28-32.
19. **Silver LL, Bostian KA. 1993.** Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Ch* 37: 377-383.
20. **Zamora LG, Arias M. 2011.** Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Rev Bioméd* 22: 59-66.