

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**  
**PROGRAMA DOCTORAL EN MICROBIOLOGÍA**



**Efecto de diferentes concentraciones de la miel de abeja  
sobre el crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico  
grupo A de Lancefield.**

**TESIS**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
**DOCTORA EN MICROBIOLOGÍA**

**AUTORA : Ms. C. LIZZIE KAREN BECERRA GUTIÉRREZ**

**ASESOR : Dr. MILCIADES CHÁVEZ CASTILLO**

**TRUJILLO - PERÚ**  
**2011**

No. de Registro: \_\_\_\_\_

## DEDICATORIA

A toda mi familia por su incondicional  
apoyo, confianza y comprensión

## JURADO DICTAMINADOR

---

Dr. CÉSAR JARA CAMPOS

PRESIDENTE

---

Dr. ROGER ALVA CALDERÓN

SECRETARIO

---

Dr. MILCIADES CHÁVEZ CASTILLO

MIEMBRO

## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos:

Al Dr. Milciades Chávez Castillo docente de la Cátedra de Bacteriología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo, asesor de la presente tesis, por sus consejos y dedicación para llevar a cabo el presente trabajo de tesis.

A la Dra. Manuela Luján Velásquez, por sus orientaciones y contribuciones desinteresadas en el desarrollo del presente trabajo de tesis.

A la Ms.C. Carmen Lora de Robles por su apoyo desinteresado y contribuciones desinteresadas en el desarrollo del presente trabajo de tesis.

Al Ms. C. Hans Rodríguez García y a todas aquellas personas y entidades que contribuyeron desinteresadamente en el desarrollo del presente trabajo de tesis.

## INDICE

	Pág.
RESUMEN .....	vii
ABSTRACT .....	viii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS .....	12
III. RESULTADOS .....	17
IV. DISCUSIÓN .....	21
V. CONCLUSIONES .....	27
VI. PROPUESTA .....	28
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29

### ANEXOS:

ANEXO 1. COLONIAS DE ***STREPTOCOCCUS*** B –HEMOLÍTICO GRUPO A DE LANCEFIELD AISLADAS DE PACIENTES SOSPECHOSOS DE FARINGITIS ATENDIDOS EN EL HOSPITAL IV VÍCTOR LAZARTE ECHEGARAY, DESDE OCTUBRE DEL 2009 A AGOSTO DEL 2010.

- ANEXO 2. OBSERVACIÓN DE STREPTOCOCCUS B –HEMOLÍTICO GRUPO A DE LANCEFIELD MEDIANTE LA TINCIÓN GRAM.
- ANEXO 3. SUSCEPTIBILIDAD DE **STREPTOCOCCUS** B –HEMOLÍTICO GRUPO A DE LANCEFIELD A LA BACITRACINA.
- ANEXO 4. PRUEBA BIOQUÍMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE **STREPTOCOCCUS** B –HEMOLÍTICO GRUPO A DE LANCEFIELD.
- ANEXO 5. CULTIVO DE STREPTOCOCCUS B –HEMOLÍTICO GRUPO A DE LANCEFIELD SENSIBLE A LA PENICILINA Y BACITRACINA.
- ANEXO 6. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA MIEL DE ABEJA SOBRE EL CRECIMIENTO “*IN VITRO*” DE **STREPTOCOCCUS** B –HEMOLÍTICO GRUPO A DE LANCEFIELD
- ANEXO 7. RESUMEN ESTADÍSTICO PARA DIAM HALO
- ANEXO 8. PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS PARA DIAM HALO POR MIEL

## RESUMEN

El efecto de diferentes concentraciones de la miel de abeja, procedente del distrito de Shirac, provincia de San Marcos, departamento de Cajamarca, fueron evaluados en 10 cultivos de ***Streptococcus***  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield aislados e identificados a partir de muestras clínicas de hisopados faríngeos procedentes de pacientes sospechosos de faringitis atendidos en el Hospital IV Víctor Lazarte Echegaray de Trujillo durante Octubre del 2009 a Marzo del 2010. Se evaluaron las concentraciones de: 0%, 25%, 50%, 75% y 100% correspondientes a la miel de abeja y se empleó la Técnica de difusión en agar. Los resultados obtenidos revelan que la miel de abeja inhibe el crecimiento de ***Streptococcus***  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield a partir del 25%, siendo mayor el halo de inhibición a una concentración del 100%. Sin embargo, los rangos mayores de inhibición correspondieron al de la penicilina. Se concluye que la miel de abeja tiene efecto inhibitorio "*in vitro*" en el crecimiento de ***Streptococcus***  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield, constituyéndose por lo tanto una buena alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo.

**Palabras clave:** Miel de abeja, ***Streptococcus***  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield, concentraciones,

## ABSTRACT

The effect of different concentrations of the honey of bee, proceeding from district of Shirac, province of San Marcos, department of Cajamarca, they were evaluated in 10 cultures of ***Streptococcus***  $\beta$ -hemolítico group A of Lancefield isolated and identified from clinical samples of hisopados faríngeos proceeding from suspicious patients of pharyngitis attended in the Hospital IV Víctor Lazarte Echegaray of Trujillo during October, 2009 to March, 2010. The concentrations were evaluated of: 0 %, 25 %, 50 %, 75 % and 100 % corresponding to the honey of bee and I use the Technology of diffusion in agar. The obtained results reveal that the honey of bee disables growth of ***Streptococcus***  $\beta$ -hemolítico group A of Lancefield from 25 %, being bigger the halo of inhibition than a concentration of 100 %. Nevertheless, the major ranges of inhibition corresponded to that of the penicillin. One concludes that the honey of bee has inhibitory "*in vitro*" effect in growth of ***Streptococcus***  $\beta$ -hemolítico group A of Lancefield, a good alternative being constituted therefore for the treatment of infections caused by this microorganism.

**Key words:** Honey of bee, ***Streptococcus***  $\beta$ -hemolítico group A of Lancefield, concentrations,

## I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Streptococcus*, son cocos grampositivos inmóviles, miden de 1 a 2 µm de diámetro y normalmente se disponen en parejas o en cadenas debido a que poseen un solo plano de división. La mayoría de éste género son anaerobios facultativos, y algunos crecen solo en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono y negativos a la prueba de catalasa y oxidasa<sup>1,2,3</sup>.

El género *Streptococcus* está ampliamente distribuido en la naturaleza, algunos de ellos forman parte de la flora normal tanto del hombre (pueden vivir en las vías respiratorias, el intestino, la vagina o cualquier otra parte del cuerpo sin causar problemas) como de animales, mientras que otros se relacionan con importantes enfermedades atribuibles en parte a su infección y en parte a una sensibilización hacia ellos<sup>3,4,5</sup>.

Los estreptococos pueden desencadenar tres tipos de complicaciones: supurativas, no supurativas y mediadas por toxinas, en los cuales la sensibilización del paciente y el estado de autoalergia explican la patogenia del padecimiento. Se les relaciona con diversos procesos patológicos como faringitis aguda, escarlatina, erisipela y complicaciones potencialmente serias como fiebre reumática, endocarditis, valvulitis reumática y glomerulonefritis aguda o crónica<sup>4,6,7</sup>.

El género *Streptococcus* es un grupo heterogéneo de bacterias y no hay un sistema apropiado para clasificarlos. Sin embargo, Rebeca Lancefield, estableció un sistema, en base a la serología, clasificándolos en cinco grupos antigénicos, entre los cuales destacan: *Streptococcus pyogenes* del grupo A,

*Streptococcus agalactiae* del grupo B, *Enterococcus* del grupo D, *S. pneumoniae* y el grupo *viridans*<sup>3,7,8</sup>.

Las diversas variedades de estreptococos tienden a producir tipos específicos de infecciones y síntomas. Así tenemos que los estreptococos del grupo A constituyen la especie más virulenta y frecuente para los humanos, que son sus huéspedes naturales. Estos estreptococos pueden causar faringitis estreptocócica (una infección estreptocócica de la faringe), amigdalitis, infecciones de heridas y de piel, infecciones de la sangre (septicemia), escarlatina, neumonía, fiebre reumática, corea de Sydenham (mal de San Vito) e inflamación renal (glomerulonefritis)<sup>4,6</sup>.

Otros estreptococos como los del grupo B por lo general causan infecciones peligrosas en los recién nacidos (sepsis neonatal) e infecciones en las articulaciones (artritis séptica) y el corazón (endocarditis); Los estreptococos de los grupos C y G presente en los animales pero también pueden crecer en la garganta humana, el intestino, la vagina y la piel. y enterococos del grupo D crecen normalmente en el tracto digestivo inferior, en la vagina y en la piel circundante. También pueden causar infecciones en las heridas y en las válvulas del corazón, la vejiga, el abdomen y la sangre<sup>7,8</sup>.

El *Streptococcus*  $\beta$  - hemolítico del grupo A de Lancefield, es uno de los patógenos bacterianos más importante de los seres humanos. Históricamente, su descubrimiento data de 1874, cuando Billroth lo describe en casos de erisipela y de infecciones de heridas. cutáneas y sistémicas. En 1879, Pasteur lo aísla de la sangre de una paciente con sepsis puerperal. La primera vez que se habló de este microorganismo fue en 1884 (Rosenbach) y, luego hasta 1903 (Schötmuller) no

existían clasificaciones de los estreptococos que se basan en la producción de hemólisis. Finalmente, en 1933, Lancefield los agrupó en la categoría A de su clasificación<sup>5,7,9</sup>

El *Streptococcus*  $\beta$  - hemolítico grupo A de Lancefield se caracteriza porque atacan glóbulos rojos provocando lisis total (beta hemólisis). Su principal factor de virulencia es la proteína M, que hace posible la multiplicación en el huésped. La pared celular, especialmente el complejo de peptidoglicanos y polisacáridos C, produce toxicidad tisular incluso en los estreptococos muertos. Además forman numerosas exotoxinas. Las hemolisinas, estreptolisinas O y S, destruyen las membranas de los eritrocitos y otras células<sup>7,9</sup>.

Por otro lado se sabe que la estreptolisina O del *Streptococcus*  $\beta$  - hemolítico grupo A de Lancefield actúa como antígeno que puede demostrarse midiendo los anticuerpos desarrollados frente a esta toxina. Las exotoxinas estreptocócicas pirogénicas son las responsables de la fiebre, exantema y enantema en la escarlatina, así como de la sepsis y del síndrome de shock tóxico. Las enzimas estreptoquinasa, ADNasa y hialuronidasa favorecen la proliferación tisular de la infección<sup>7,10</sup>.

Los *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield dan lugar a colonias blancas o grises, de 1 a 2 mm de diámetro, rodeadas de zonas de lisis completa de los eritrocitos presentes en el medio de cultivo (hemólisis tipo  $\beta$ ), además producen leucina-aminopeptidasa (LAP) y pirrolidonil-arilamidasa (PYR). Esta última característica rara vez es compartida por otros miembros de su mismo género. Además, es uniformemente sensible a la bacitracina<sup>3,6,7,10</sup>.

Las infecciones por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield son las enfermedades infecciosas más frecuentes. En general, suelen presentarse en niños, con una frecuencia máxima entre los 4 y los 7 años. El periodo de incubación es de uno a tres días. Los gérmenes entran a través de lesiones cutáneas o mucosas y causan infecciones locales que pueden evolucionar a una sepsis<sup>6,7</sup>.

La mayor parte de las infecciones por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield afectan al tracto respiratorio superior. Primero se produce una faringitis estreptocócica que, en general, se presenta como una amigdalitis exudativa acompañada de fiebre alta. Posteriormente puede pasar a abscesos periamigdalares, sinusitis u otras complicaciones. La escarlatina es una forma especial de faringitis estreptocócica que, además de la amigdalitis, provoca un exantema miliar (y un enantema)<sup>6,10</sup>.

Otro grupo de enfermedades causadas por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield son las infecciones cutáneas (pioderma, impétigo, erisipela). Una importante secuela tardía es la fiebre reumática aguda, una enfermedad sistémica inflamatoria que se presenta después de una infección estreptocócica respiratoria. Puede tener manifestaciones cardíacas, articulares, neurológicas, cutáneas y de partes blandas. Otra enfermedad secundaria es la glomerulonefritis<sup>4,5,7,9</sup>.

La importancia de las infecciones por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield ha variado en varios países del mundo; así por ejemplo en países como Estados Unidos las infecciones por este microorganismo tienen mayor importancia a partir de 1980 debido a la implicación de ésta bacteria en la

epidemia de “Bacterias comedoras de carne”<sup>12</sup>. Así mismo, en países como Argentina, revivió el interés por el incremento observado en las infecciones invasivas productoras del llamado “shock tóxico estreptocócico”, de elevada mortalidad<sup>12,13</sup>.

Recientemente en Chile, se han descrito algunos brotes de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield en centros geriátricos y en la comunidad. El riesgo de muerte aumenta en los adultos mayores y en las infecciones bacteriémicas. En los últimos 15 años han resurgido formas graves de la enfermedad, se ha comunicado un aumento de la prevalencia de neumonía y fasciitis necrotizante, ocasionalmente asociado a síndrome de shock tóxico<sup>14</sup>.

En nuestro país la frecuencia de infecciones por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield varía entre 15-20%, así lo reporta Guevara<sup>11</sup> en un trabajo realizado en Chachapoyas en el 2008, en el cual se presentó un elevado número de pacientes por faringoamigdalitis y pacientes que manifiestan signos y síntomas de infecciones secundarias no supurativas a causa de esa bacteria<sup>11</sup>.

En cualquiera de las manifestaciones clínicas que se puedan desarrollar, es imprescindible realizar el aislamiento e identificación de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield para que de esta manera poder instaurar un tratamiento que evite el riesgo de aparición de las secuelas supuradas y, especialmente, de las no supuradas. El tratamiento de primera elección es la penicilina. Su eficacia clínica se basa en la excelente sensibilidad que presentan a este antibiótico todas las cepas del agente causal<sup>10,12,13</sup>

Pese a que en los últimos 60 años se han usado en todo el mundo grandes cantidades de penicilina y de otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos, no se ha constatado

la aparición de cepas resistentes o con sensibilidad disminuida a ese antibiótico. El bajo costo, el estrecho espectro antimicrobiano y su conocida seguridad hacen que la penicilina sea considerada como el tratamiento de primera elección para la faringitis estreptocócica<sup>13,15</sup>.

Los estudios iniciales, en los que se demostró que el manejo con penicilina podría prevenir el primer ataque de fiebre reumática datan de la década de 1950 y se realizaron con penicilina G procaínica, luego fue reemplazada por penicilina benzatínica. Sin embargo, a pesar de que existen pruebas de su papel en la prevención de esta complicación no supurativa de la faringitis estreptocócica, estas evidencias son insuficientes para asegurar que previene la glomerulonefritis postinfecciosa<sup>13,15</sup>.

Por otro lado, la alergia a la penicilina, confirmada o supuesta, hace que, en un buen número de casos, los clínicos la descarten para el tratamiento, y por precaución, también a los otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Además, desde 1958, se han publicado numerosos estudios que constatan un cierto porcentaje de fracasos terapéuticos en los tratamientos con penicilina, que oscilan entre el 8 y el 20%. Como la causa no es la resistencia de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield, se han buscado explicaciones alternativas<sup>10</sup>

El tratamiento antibiótico alternativo en la faringoamigdalitis estreptocócica que empezó a considerarse a parte de la Penicilina fueron los macrólidos, los cuales inicialmente demostraron ser tan eficaces y seguros como las penicilinas, debido a que presentan mejores propiedades farmacocinéticas, mejor tolerancia gastrointestinal y menor número de interacciones con otras

drogas comúnmente utilizadas. Por ello figuran en las guías actuales de terapéutica antimicrobiana y se usan ampliamente <sup>17</sup>.

En un reciente estudio realizado en España, se constata que más del 15% de las faringitis en general, no sólo las estreptocócicas, se tratan con macrólidos. Entre los macrólidos existían escasas diferencias de actividad “*in vitro*” frente a *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield y en los estudios clínicos de tratamiento de la faringitis estreptocócica realizados mostraron una eficacia similar <sup>17,18</sup>.

Los macrólidos se clasifican, según el número de átomos de su núcleo en. eritromicina, claritromicina, roxitromicina, diritromicina, azitromicina, miocamicina, josamicina y espiramicina<sup>13</sup>. Sin embargo, en los últimos años se han publicado datos muy variables en cuanto a la resistencia del *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield a la eritromicina y otros macrólidos. Estos niveles de resistencia varían significativamente en función a la zona geográfica<sup>18</sup>.

Actualmente, la resistencia a macrólidos de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield a llegado a superar cifras del 10% en varios países de distintos continentes<sup>13</sup>. El origen de este aumento en la resistencia parece haber estado relacionado al incremento en la utilización de estos antibióticos y, precisamente, ese problema pudo ser superado en Finlandia apelando a la reducción de su consumo. Posteriormente, en ese país se retornó a los niveles de resistencia iniciales por la misma causa<sup>13,19</sup>.

Se ha descubierto que el mecanismo más conocido que interviene en la resistencia a los macrólidos es la alteración del sitio de acción mediante la enzima metilasa, la cual confiere resistencia tanto a los macrólidos, lincosamidas

(clindamicina, lincosamina) y estreptogramina B (fenotipo MLS). Sin embargo, recientemente se ha descrito otro mecanismo mediado por una bomba de eflujo activo que solo afecta a los macrólidos pero no a la clindamicina (fenotipo M)<sup>20</sup>

En los últimos años, se ha empezado la búsqueda de tratamientos alternativos, según la Organización Mundial de la Salud<sup>21</sup> proyecta que cerca del 80% de la población mundial emplean la medicina tradicional. En nuestro país además, el difícil acceso a los medicamentos, o el abuso de los mismos, impulsa al mayor uso de recursos como la fitoterapia, apiterapia, acupuntura, aromaterapia, etc. La apiterapia es la disciplina médica que emplea los productos de la colmena para el tratamiento y la prevención de enfermedades.

Los tratamientos alternativos para las infecciones causadas por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield han cobrado mucho interés, así tenemos que se han realizado estudios donde emplean extractos naturales como por ejemplo, el extracto de la “taya” con actividad antimicrobiana frente al *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield<sup>22</sup>. Sin embargo, dentro de la medicina natural podemos resaltar a otras sustancias como por ejemplo la “miel de abeja”.

La miel de abeja ha sido utilizada como medicina desde tiempos antiguos, principalmente para el tratamiento de heridas de piel, quemaduras, úlceras, infecciones oculares, dolor de garganta, así como otras afecciones. Este uso de la miel de abeja se inició de manera empírica, simplemente porque se conocía como un remedio efectivo y no por el conocimiento de sus propiedades antimicrobianas; aún en la actualidad, la miel de abeja sigue siendo ampliamente utilizada como medicina natural en el tratamiento de algunas infecciones<sup>21,23,24</sup>.

Las virtudes terapéuticas de la miel descansan en la absoluta inocuidad de este alimento y su perfecta tolerabilidad, incluso en dosis muy elevadas. Su composición química es agua (15% a 20%), glúcidos: la glucosa y fructosa; ácidos orgánicos, sustancias nitrogenadas, lípidos, oligoelementos, enzimas, vitaminas (tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico)<sup>13</sup>.

La miel de abeja tiene un pH ácido (3.5 - 4.5); esta acidez se debe a la presencia de ácidos orgánicos (ácidos glucónico, acético, cítrico, láctico, succínico) y representa un importante factor antimicrobiano. El principal ácido orgánico presente en la miel de abeja es el ácido glucónico, producto de la acción de la glucosa-oxidasa<sup>21,25</sup>.

Se han identificado varias sustancias en la miel de abeja con propiedades antimicrobianas. Diversos estudios han encontrado que la principal actividad antimicrobiana se debe a la presencia de peróxido de hidrógeno producido por la enzima glucosa-oxidasa. También, los fitoquímicos, especialmente los flavonoides y ácidos aromáticos y los antioxidantes fenólicos son reconocidos por inhibir un amplio rango de bacterias grampositivas y gramnegativas<sup>21,26,27</sup>.

Desde hace algunos años, diversos investigadores han empezado a evaluar la actividad antimicrobiana de la miel de abeja, así podemos citar que en el 2001, Ceyhan<sup>28</sup> comprobó la actividad antimicrobiana “*in vitro*” de la miel de abeja frente a bacterias y hongos. Posteriormente en el 2003, Moirin<sup>29</sup>, comprobó que tanto la miel de abeja como el propóleo inhiben el crecimiento de *S. aureus*.

Así mismo en el año 2005 en Costa Rica, Estrada et al<sup>30</sup>, evaluaron diferentes concentraciones de la miel de abeja contra microorganismos como: *S.*

*aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas. aureginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Aspergillus niger*, determinando que un 92% de las mieles inhibían el crecimiento de las bacterias evaluadas, además se encontró que a una concentración de 25% v/v, se lograba inhibir el crecimiento de microorganismos grampositivos como el *S. aureus*.

Posteriormente cabe resaltar que otra investigación realizada en el año 2007 en el Perú por Cruzado et al<sup>21</sup>, reveló que la miel de abeja procedente de las diferentes zonas de Cajamarca tienen actividad antibiosis “*in vitro*” contra microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

Conociendo las diferentes patologías que causa *Streptococcus β*-hemolítico grupo A de Lancefield y sabiendo que la penicilina es el tratamiento de primera elección seguido de los macrólidos para combatir este microorganismo y teniendo en cuenta los reportes de trabajos sobre los problemas de resistencia bacteriana así como reacciones alérgicas a la penicilina, intolerancia, incumplimiento y/o abuso del tratamiento y adherencia. Por otro lado, considerando que en nuestro país hay una gran comercialización de la miel de abeja y conociendo sus propiedades terapéuticas; además viendo la necesidad de aplicar un tratamiento alternativo contra las infecciones producidas por *Streptococcus β*-hemolítico grupo A de Lancefield, fue necesario investigar si la miel de abeja tiene efecto sobre el crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus β*-hemolítico grupo A de Lancefield.

Los resultados de la presente investigación, están orientados a responder los siguientes problemas: ¿Es posible utilizar a la miel de abeja como un

tratamiento alternativo para las infecciones causadas por *Streptococcus*  $\beta$  – hemolítico grupo A de Lancefield?, ¿Qué concentración sería la más eficaz para inhibir el crecimiento de *Streptococcus*  $\beta$  –hemolítico grupo A de Lancefield?, ¿Qué constituyentes de la miel de abeja serían los responsables de inhibir el crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus*  $\beta$  –hemolítico grupo A de Lancefield?

Se asume que la miel de abeja por su pH bajo y constituyentes inhibe el crecimiento de *Streptococcus*  $\beta$  –hemolítico grupo A de Lancefield y que a mayor concentración mayor inhibición del microorganismo.

Los objetivos de la presente investigación fueron los siguientes:

- Determinar el efecto de la miel de abeja sobre el crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus*  $\beta$  –hemolítico grupo A de Lancefield
- Determinar que constituyentes de la miel de abeja inhiben el crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus*  $\beta$  –hemolítico grupo A de Lancefield
- Determinar la concentración de la miel de abeja más eficaz para inhibir el crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus*  $\beta$  –hemolítico grupo A de Lancefield

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1.- MATERIAL DE ESTUDIO:

- Miel de abeja, procedente del distrito de Shirac, provincia de San Marcos, Departamento de Cajamarca
- 10 Cultivos de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield, aislados a partir de muestras clínicas de hisopados faríngeos procedentes de pacientes sospechosos de faringitis atendidos en el Hospital IV Víctor Lazarte Echegaray de Trujillo, desde Octubre del 2009 a Agosto del 2010.

### 2.2.- MÉTODOS:

#### 2.2.1.- PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LA MIEL DE ABEJA:

- **Recolección de la miel de abeja e identificación de metabolitos:**

Se recolectó la miel de abeja del distrito de Shirac, provincia de San Marcos, Departamento de Cajamarca. Posteriormente una parte fue transportada a la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT) para la respectiva identificación de sus metabolitos y otra parte al Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la UNT, donde se realizaran los ensayos “*in vitro*”

- **Preparación de las concentraciones de miel de abeja:**

Para la preparación de las concentraciones de miel de abeja se utilizó como diluyente agua destilada estéril <sup>31</sup>. Las concentraciones evaluadas fueron: 0%, 25%, 50%, 75% y 100% (p/v) respectivamente. Estas soluciones

se realizaron en el mismo momento del ensayo para evitar la pérdida de peróxido de hidrógeno.

## **2.2.2.- AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO (*Streptococcus* $\beta$ -HEMOLÍTICO GRUPO A DE LANCEFIELD)**

### **a) Recolección y transporte de la muestra:**

Se procedió a recolectar muestras de hisopados faríngeos procedentes de pacientes sospechosos de faringitis, atendidos en el Hospital IV Víctor Lazarte Echegaray de Trujillo desde Octubre del 2009 a Agosto del 2010. Posteriormente fueron trasladadas las muestras al laboratorio de Bacteriología de la U.N.T en donde se procedió a realizar el aislamiento e identificación de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield.

### **b) Aislamiento, Identificación y mantenimiento de *Streptococcus* $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield**

Para el aislamiento de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield se procedió a sembrar las muestras contenidas en los hisopos, en placas con agar sangre de carnero al 5% mediante la técnica de estría en cuatro cuadrantes, con la finalidad de aumentar la recuperación de la bacteria. Dichas placas fueron incubadas a 35 °C por 24-48 horas con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5-10%<sup>32,33,34</sup>.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar la lectura: en agar sangre de carnero la aparición de colonias  $\beta$  hemolíticas, con un borde completo, de 0,5-2 mm de diámetro y con aspecto: mucoide, mate o brillante<sup>3</sup>, se consideraron compatibles con el género *Streptococcus*. Estas colonias se

repicaron en agar soya tripticasa (TSA) suplementado con agar sangre con la finalidad de obtener cultivos puros <sup>3,7</sup> (ANEXO 01).

A partir de los cultivos puros se procedió a realizar las diferentes pruebas para una identificación definitiva de la bacteria, las cuales se presentan a continuación:

- **Coloración Gram:**

Luego de realizar la coloración Gram a cada cultivo puro, la observación de cocos grampositivos dispuestos en pares o cadenas nos indicó una característica del género *Streptococcus* <sup>3</sup> (ANEXO 2)

- **Prueba de sensibilidad a la bacitracina:**

A partir de los cultivos puros aislados cocos grampositivos dispuestos en pares o cadenas, se procedió a realizar la prueba de sensibilidad a la bacitracina, para lo cual se sembraron en placas con agar sangre de carnero al 5% el microorganismo, se colocó el disco de bacitracina (0,1 UI) y se llevó a incubar a 35°C por 18-24 horas. Los cultivos de *Streptococcus*  $\beta$  – hemolítico grupo A de Lancefield presentaron una zona de inhibición alrededor del disco de bacitracina <sup>3,5</sup> (ANEXO 3)

- **Prueba de PYR-A:**

A partir de los cultivos sensibles a la bacitracina, se procedió a realizar la prueba de PYR, para lo cual se realizó una suspensión densa de la bacteria y luego se colocaron el disco de PYR-A y se incubaron a 35°C por 2 horas, se agregó una gota del reactivo revelador y se espero 5 minutos a temperatura ambiente. Los cultivos de *Streptococcus*  $\beta$  –hemolítico grupo A de Lancefield presentaron una zona de color rosa-rojo en el disco de PYR <sup>36</sup> (ANEXO 4)

- **Prueba serológica para la determinación del grupo A de Lancefield:**

A los cultivos sensibles a la bacitracina se les realizó la prueba serológica de Lancefield, la cual consistió en enfrentar los sueros de los diversos grupos de Lancefield a cada cultivo a evaluar mediante la técnica de aglutinación en lámina, considerándose positivas a *Streptococcus*  $\beta$  – hemolítico grupo A de Lancefield, aquellas cepas que aglutinen sólo al grupo A de Lancefield<sup>3</sup>.

- **Estandarización del Inóculo:**

A partir de los 10 cultivos identificadas como *Streptococcus*  $\beta$ – hemolítico grupo A de Lancefield, se procedió a realizar suspensiones de las mismas en solución salina fisiológica estéril (SSFe), hasta alcanzar la densidad bacteriana similar a la turbidez del tubo N° 1 de McFarland ( $3 \times 10^8$  bact/ml)<sup>3,21</sup>.

### **2.2.3.- EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA MIEL DE ABEJA SOBRE EL CRECIMIENTO “IN VITRO” DE *Streptococcus* $\beta$ –HEMOLÍTICO GRUPO A DE LANCEFIELD**

La evaluación del efecto de diferentes concentraciones de la miel de abeja sobre el crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus*  $\beta$ –hemolítico grupo A de Lancefield se realizó mediante la técnica de difusión en agar<sup>25,36</sup>. A cada uno de los 10 cultivos de *Streptococcus*  $\beta$ –hemolítico grupo A de Lancefield aislados, identificados y estandarizados, se los sembró mediante la técnica de superficie en placas con agar Muller Hinton suplementado con agar sangre de carnero al 5%. Posteriormente se procedió a realizar cinco pozos de 8 mm de diámetro y a una distancia de 2 cm aproximadamente por cada placa utilizando

un sacabocado estéril N°04 <sup>36</sup>, luego se procedió a colocar la miel de abeja en diversas concentraciones. Hay que resaltar que como control positivo se utilizó a la penicilina y como control negativo se utilizó SSF estéril (**ANEXO 05**).

Posteriormente las placas sembradas con estreptococos fueron incubados a 35°C por 18-24 horas, luego se procedió a realizar la lectura e interpretación de los resultados, mediante la medición de los halos de inhibición, la cual se realizó con ayuda de un vernier. Se tomó como referencia a los halos mayores o iguales a 2mm de diámetro como inhibitorios <sup>31,37</sup> (**ANEXO 06**).

#### **2.2.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

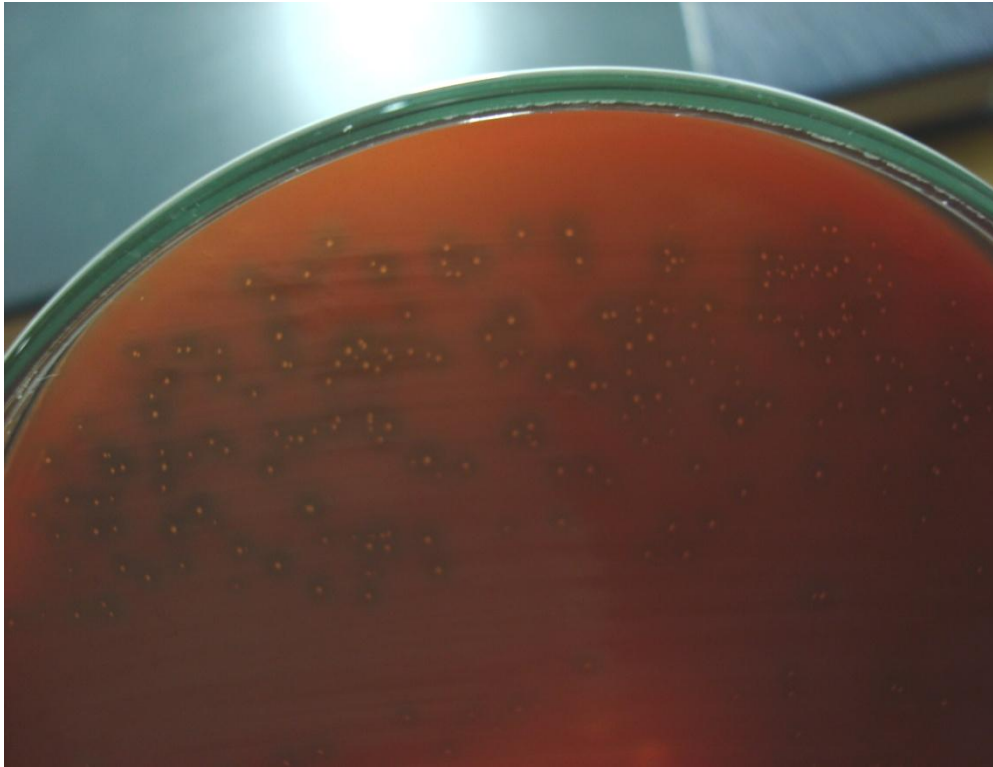
El procesamiento estadístico, se realizó mediante los análisis de ANOVA Y DUNCAN, para verificar las diferencias entre las medias de los diámetros de los halos de inhibición de cada concentración de la miel de abeja, para su comparación con el control positivo que fue la penicilina (**ANEXO 07 Y 08**).

### III. RESULTADOS

Para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de la miel de abeja sobre el crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield, se lograron aislar e identificar 10 cultivos de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield en medios enriquecidos como el agar sangre de carnero al 5%, en los cuales se observó la beta hemólisis, así como las características típicas de las colonias de la bacteria (**Fig. N°01**).

En lo concerniente a la miel de abeja, después de su recolección se procedió a la identificación de sus constituyentes, encontrándose la presencia de azúcares reductores, flavonoides, leucoantocianinas y un pH de 4.1 (**Tabla N°01**)

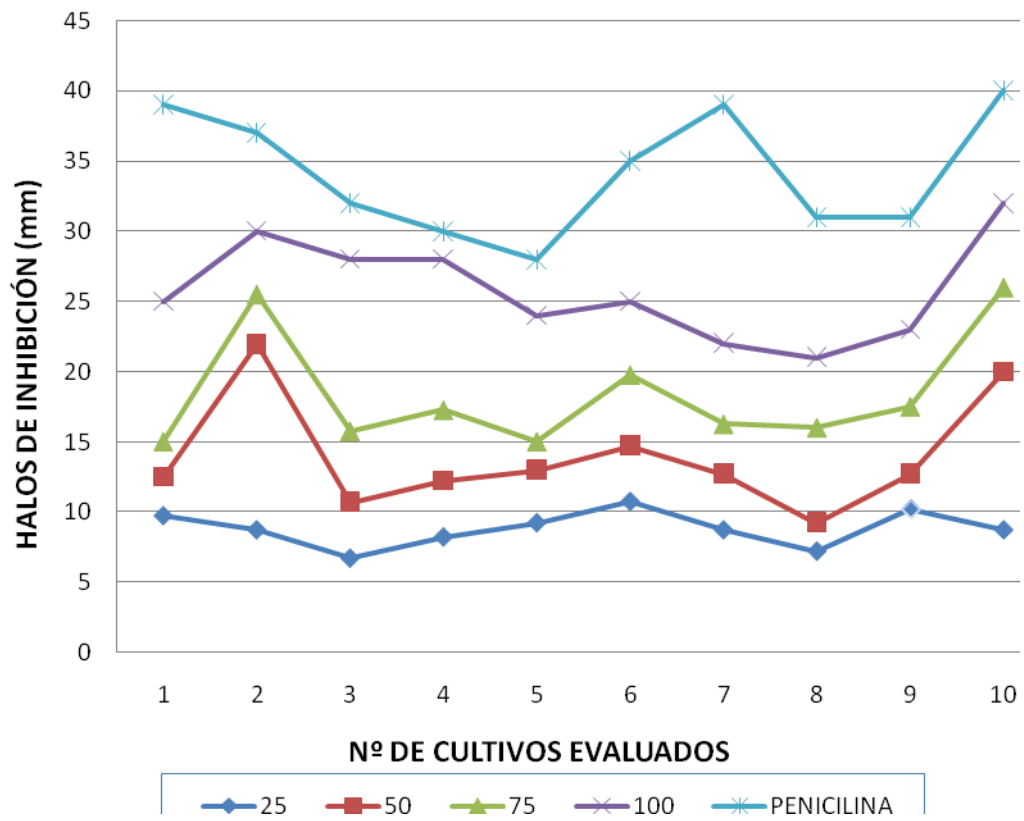
En lo que respecta al efecto de diferentes concentraciones de la miel de abeja sobre el crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield, se observó que una diferencia estadística entre el tamaño de los halos encontrados en cada concentración, Así mismo se observó que a partir del 25% se forman halos de inhibición contra *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield, alcanzando un máximo a la concentración del 100% de la miel de abeja. Sin embargo, los mayores halos de inhibición correspondieron al control positivo, es decir, al que utiliza la penicilina (**Fig. N°02**).



**Fig. N°01.** Colonias de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield en agar sangre de carnero al 5%

**Tabla N°01.-** Identificación de constituyentes de la Miel de abeja  
 procedente del distrito de Shirac, provincia de San  
 Marcos, Departamento de Cajamarca

<b>CONSTITUYENTES</b>	<b>MIEL DE ABEJA</b>
AZUCARES REDUCTORES	+
ALCALOIDES	-
FLAVONOIDES	+
TANINOS	-
LEUCOANTOCIANINAS	+
SAPONINAS	-
HIDROXILOS FENOLICOS	-
pH:	4.1



**Fig. N°02** Efecto de diferentes concentraciones de la miel de abeja sobre el crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield

#### IV. DISCUSIÓN

El *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico del grupo A de Lancefield coloniza con frecuencia la orofaringe de los niños y adultos jóvenes. Aunque se ha descrito una incidencia de portadores entre 15 y 20%, esas cifras resultan equívocas, pues se necesitan técnicas de cultivo altamente selectivas para detectar un pequeño número de microorganismos en las secreciones orofaríngeas<sup>4,5</sup>. En nuestro país las enfermedades invasivas por este microorganismo son de notificación obligatoria. Sin embargo, debido al tedioso procedimiento, en la mayoría de los hospitales, no se realiza la adecuada identificación de éste microorganismo.

El *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico del grupo A de Lancefield es el principal patógeno humano vinculado con invasión local o sistémica y con trastornos inmunitarios después de infección con estreptococos, produce grandes zonas (1 cm. de diámetro) de hemólisis  $\beta$  alrededor de las colonias mayores de 0.5 mm de diámetro. Son positivos a PYR (hidrólisis de L-pirrolidonil-2-naftilamida) y habitualmente susceptibles a la bacitracina<sup>4,5,38</sup>, esto concuerda con los resultados obtenidos (**Fig. N°01**).

Según la **Fig. N°01**, se pudo observar que las zonas alrededor de las colonias fueron beta hemolíticas, esto se debe a que el *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico del grupo A elabora dos hemolisinas o estreptolisinas: La estreptolisina O que es una proteína hemolíticamente activa en estado reducido, causa parte de la hemólisis observada cuando el crecimiento ocurre en cortes profundos dentro del medio en placas de agar sangre y la estreptolisina S, que es el agente causante de las zonas hemolíticas alrededor de las colonias de estreptococos que crecen sobre la superficie de placas agar sangre<sup>4,5</sup>.

Según lo observado en la **Tabla N°01**, los constituyentes identificados como el bajo pH, alto contenido de azúcar y la presencia de flavonoides son los responsables de inhibir el crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico del grupo A de Lancefield, esto concuerda con lo encontrado por Cruzado et al <sup>21</sup>, el cual revela que la poca cantidad de agua que posee la miel de abeja (15% a 20%), pH de 3,9, alto contenido en azúcar, su pobre contenido en proteínas que privan del nitrógeno que necesitan las bacterias para crecer; todo esto en conjunto hacen que se inhiba el crecimiento bacteriano.

Las penicilinas son el tratamiento de elección de la Faringitis estreptocócica. A pesar de su empleo masivo en los últimos 60 años, no se han detectado cepas resistentes de *Streptococcus*  $\beta$  –hemolítico grupo A de Lancefield, esto también se evidenció en la presente investigación realizada (**Fig. N°02**).

En los últimos años han surgido nuevos antibióticos de vida media larga (nuevos macrólidos y cefalosporinas orales de tercera generación) que se han presentado como alternativas a las penicilinas en el tratamiento de la Faringitis estreptocócica debido a su pauta de dosificación más cómoda para el paciente, en el caso de alérgicos, debido que al usar penicilina, la erradicación del agente requiere una terapia oral prolongada de diez días<sup>4,5</sup>. Esta creciente utilización de macrólidos se ha asociado a un aumento de la prevalencia de cepas de *Streptococcus*  $\beta$  –hemolítico grupo A de Lancefield resistentes.

Aunque algunos autores como Portillo et al<sup>39</sup>, recomiendan utilizar la penicilina oral, administrada cada 12 horas, para tratar la faringoamigdalitis, Otras sugieren que las desventajas de la terapia con penicilina incluyen la posibilidad de tolerancia, los riesgos de incumplimiento y adherencia, debido a la necesidad de tomar el medicamento en un horario distinto al de las comidas, el sabor poco agradable del antibiótico y la

necesidad de que se continúe la terapia tras la recuperación clínica inicial, incluso requiriendo de algunas dosis en el sitio de trabajo o en las escuelas y guarderías, que usualmente no están preparadas para mantener este tipo de atención y tratamiento.

Se sabe que además del tratamiento convencional contra *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico del grupo A de Lancefield, se practica como medidas preventivas la erradicación del estreptococo para evitar las infecciones postestreptocócicas, tales medidas se basan primordialmente en la administración de penicilina<sup>40</sup>. Sin embargo, estudios como el realizado por Silva<sup>15</sup>, afirma que la penicilina no tiene capacidad para prevenir la fiebre reumática, una infección postestreptocócicas común.

No hay una única opinión entre los expertos acerca de la actitud terapéutica a adoptar ante infecciones recidivantes por EGA, en pacientes que recaen pocos días después de los diez de un tratamiento antibiótico clásico. Además de ser prudente una consulta con un especialista, unos opinan que se deben tratar con Amoxicilina+Acido clavulánico, otros que con cefalosporinas orales, otros que con Clindamicina y algunos opinan que se pueden administrar dos días de Rifampicina al final de cualquier tanda de diez días con alguno de los antibióticos clásicos<sup>15,40</sup>. Por tal motivo es que desde hace unos años atrás se opta por la utilización de productos naturales, dentro de éstos productos podemos citar a la miel de abeja, debido a su absoluta inocuidad de este alimento y su perfecta tolerabilidad, incluso en dosis muy elevadas<sup>21,23,24</sup>

Según lo observado en la **Fig. N°02**, la miel de abeja inhibe el crecimiento de *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico del grupo A de Lancefield en todas las concentraciones evaluadas, esto se debe a su composición química, la cual está conformada por agua (15% a 20%), pH de 3,9, alto contenido en azúcar, su pobre contenido en proteínas que

privan del nitrógeno que necesitan las bacterias para crecer; todo esto en conjunto hacen que se inhiba el crecimiento bacteriano<sup>21</sup>.

Según la **Fig. N°02**, podemos observar que a pesar de los mayores tamaños de los halos de inhibición corresponden al 100% de la miel de abeja, al compararlo con el control positivo que fue la penicilina, éste presentó los mayores valores de inhibición, lo cual concuerda con trabajos realizados<sup>22</sup>, Sin embargo, esto no descarta la utilización de la miel de abeja como un tratamiento alternativo en las infecciones causadas por *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico del grupo A de Lancefield, debido a las propiedades de la miel, así como a la falla en el tratamiento a base de la penicilina y a las reacciones alérgicas que presentan algunas personas<sup>10,41,44</sup>.

De manera general, podemos observar que en la **Fig. N°02**, el tamaño de los halos de inhibición encontrados para las concentraciones de 25 y 50% de la miel de abeja, oscilan en promedio entre 9 y 14 mm, los cuales concuerdan con otros estudios como el realizado por Cabrera<sup>25</sup> et al, la cual evaluó la actividad antibacteriana de miel de abejas procedente de cuatro zonas apícolas del estado Zulia, Venezuela; encontrando que el tamaño de los halos de inhibición promedio para las concentraciones entre 0 y 50% es de 8 y 14 mm con respecto a *Staphylococcus aureus*; además sugiere que el uso de dichas mieles como un tratamiento alternativo para el control clínico de afecciones y/o infecciones de superficie asociadas con las diferentes bacterias evaluadas, así como a especies de alta resistencia a los antibióticos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, que suelen llegar al hombre a través del ambiente o por consumo de alimentos.

Así mismo, un trabajo realizado por Cruzado<sup>21</sup> et al, sobre el efecto de antibiosis “*in vitro*” de la miel de abeja sobre microorganismos grampositivos y gramnegativos,

confirma no sólo los componentes encontrados en la miel de abeja, sino que al comparar los halos de inhibición para microorganismos grampositivos como por ejemplo *Staphylococcus aureus*, éste presentó halos comprendidos entre 7 y 15 mm a concentraciones de 50%, lo cual concuerda con el efecto producido hacia el *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico del grupo A de Lancefield (**Fig. N°02**).

Por otro lado al comparar el tamaño de los halos producidos por otros productos naturales como la “Taya”, en una investigación realizada por De La Cruz<sup>22</sup>, la cual evaluó el efecto de diversas concentraciones de la “Taya” sobre la viabilidad de *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico, encontró que el tamaño de los halos promedios de inhibición oscilaron entre 14 y 22 mm y al compararlo con el tamaño de los halos promedio de inhibición de la miel de abeja contra el *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico del grupo A de Lancefield (9 y 26 mm), podemos corroborar el efecto antibacteriano de la miel de abeja y ofrecerlo como alternativa terapéutica gracias además a su absoluta inocuidad, su perfecta tolerabilidad, incluso en dosis muy elevadas<sup>21,23,24</sup> (**Fig. N°02**).

Otros estudios acerca de la miel como el realizado por Salazar<sup>41</sup> et al sobre la acción antimicrobiana *in vitro* de la Miel de Abejas sobre los Microorganismos Cariogénicos Estreptococos del Grupo *mutans*, encontraron que a concentraciones entre 5 y 35% de la miel, las que poseen mayor actividad antibacteriana sobre los microorganismos productores de caries son las del 30 y 35%. Dicho autor reafirma que el mecanismo de la acción antimicrobiana de la miel de abejas sobre las bacterias estreptococos del grupo *mutans* puede ser atribuido a varios factores como: actividad osmótica de la miel, concentración de peróxido de hidrógeno en la miel, inhibición de la formación de dextrano, contenido de ácidos orgánicos no aromáticos, concentración de

ácido benzoico y sus derivados, contenido de ácido cinámico y sus derivados, y concentración de flavonoides<sup>42,43,44</sup>.

Es necesario resaltar el aporte de Basson<sup>45</sup> *et al*, el cual determinó la concentración inhibitoria mínima de miel para 7 especies de *Streptococcus* relacionadas al desarrollo de caries dental. La concentración inhibitoria mínima de miel para *Streptococcus oralis* fue 12%, para *Streptococcus anginosus* 17%, y para *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus sobrinus* fue 25%, además complementando este aporte con lo obtenido en la presente investigación podemos considerar que con la concentración del 25% de la miel de abeja se puede inhibir el crecimiento de varias especies de *Streptococcus*, resaltando al *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico del grupo A de Lancefield, y así utilizarla como tratamiento preventivo en las diferentes patogenias que éstos microorganismos causan.

## V. CONCLUSIONES

- La miel de abeja procedente del distrito de Shirac, provincia de San Marcos, Departamento de Cajamarca tiene acción antimicrobiana “*in vitro*” sobre *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico del grupo A de Lancefield.
- A mayor concentración de la miel de abeja mayor inhibición del crecimiento de *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico del grupo A de Lancefield.
- La miel de abeja constituye una buena alternativa en el tratamiento y prevención de enfermedades causadas por *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico del grupo A de Lancefield.

## VI. PROPUESTA

Considerando que en el Perú existe una gran producción de la miel de abeja y conociendo sus propiedades inocuas y utilización terapéutica; además viendo la necesidad de aplicar un tratamiento alternativo contra las infecciones producidas por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield, debido al incremento de casos de alergias al tratamiento convencional como la penicilina, además sabiendo que hay reportes de resistencia a los tratamientos alternativos como los macrólidos, se propone el uso de la miel de abeja para tratamientos y/o prevención de infecciones causadas por *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rotger R. Microbiología Sanitaria y clínica. Editorial Síntesis. España. 1997.
2. Rojas W, J Anaya, B Aristizábal, L Cano, L Gómez, y D Lopera. Inmunología de Rojas. 14<sup>a</sup> ed. Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia. 2007.
3. Koneman E, S Allen, W Janda, P Schreckenbenger y W Winn. Diagnostic microbiológico. 4<sup>a</sup>ed. Editorial Panamericana. Argentina. 1999.
4. Jawetz E, J Melnik y E Adelberg. Microbiología Médica. 16<sup>a</sup>ed. Editorial Manual Moderno. México. 1999.
5. Mims C, J Playfair, J Roitt, D Wakelin y R William. Microbiología Médica. Editorial Mosby/Doyma. España. 1995.
6. Murray P, K Rosenthal y M Pfaller. Microbiología Médica. 6<sup>a</sup>ed. Editorial Elsevier/Mosby. España. 2009.
7. Romero R. Microbiología y Parasitología Humana. Editorial Medica Panamericana. México. 1999.
8. Merck E. Manual de Microbiología. Alemania; 1994.
9. Madigan M, J Martikon y J Paker. Biología de los Microorganismos. 8<sup>a</sup>ed. Editorial Prentice Hall. España. 1998.
10. Alós JI, Aracil B, Oteo J, Torres C, Gómez-Garcés JL and the Spanish Group for the study of Infection in the Primary Health Care Setting. High prevalence of erythromycin-resistant and miocamycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes*: results of a multicenter study performed in 1998 in Spain. J Antimicrob Chemother 2000; 45:605-609.

11. Guevara J, J Aguirre, E Valencia, J Guevara, F Williams, E Cuellar, M Barbosa y W Agurto. Prevalencia de *Streptococcus* beta hemolítico en pacientes con faringoamigdalitis aguda, en un hospital de la ciudad de Chachapoyas, Amazonas. En An. Fac. med. 69(2) Perú 2008.
12. Avellaneda F, M Diosque y P Yedlin. Enfermedad invasiva por *Streptococcus Beta-hemolítico* del grupo A. Arch. argent. Pediat. 1999; 97 (2): 130-134
13. Lopardo H, C Hernández y P Vidal. Resistencia de *Streptococcus pyogenes* a los antibióticos. Experiencia de once años en un hospital Pediátrico de Buenos Aires. Acta Bioquím Clín Latinoam. España. 2004; 38 (2): 151-7
14. Saldias f, J Yañez, V Saldias y O Díaz. Neumonía grave por *Streptococcus pyogenes*. Reporte de un caso. En Rev Méd Chile. Chile. 2008; 136: 1564-1569
15. Silva H, M Chávez y R Vinueza. Azitromicina en el tratamiento de la faringitis estreptocócica en niños. Rev. Infec. Colombia. 2008.
16. Córdova L, E Blanco, A Picciuto. Infecciones Respiratorias adquiridas en la comunidad. Rev. Vital academia Biomédica. 2000. 8(2):34-36.
17. Fariña N, M Ocampos, M Batmaceda, R Sanabria y M Samudio. *Streptococcus* b-hemolítico grupo A, resistencia a los macrólidos. Paraguay; 2008.
18. Kaplan E. Recent Evaluation of Antimicrobial Resistance in Beta Hemolytic Streptococci. Clin Infect Dis. 1997; 24 (Suppl 1):89-92.
19. Seppälä H, Klaukka T, Lehtonen R, Nenonen E, the Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance, Huovinen P. Outpatient use of erythromycin: link to increased erythromycin resistance in group A streptococci. Clin Infect Dis 1995; 21: 1378- 1385.

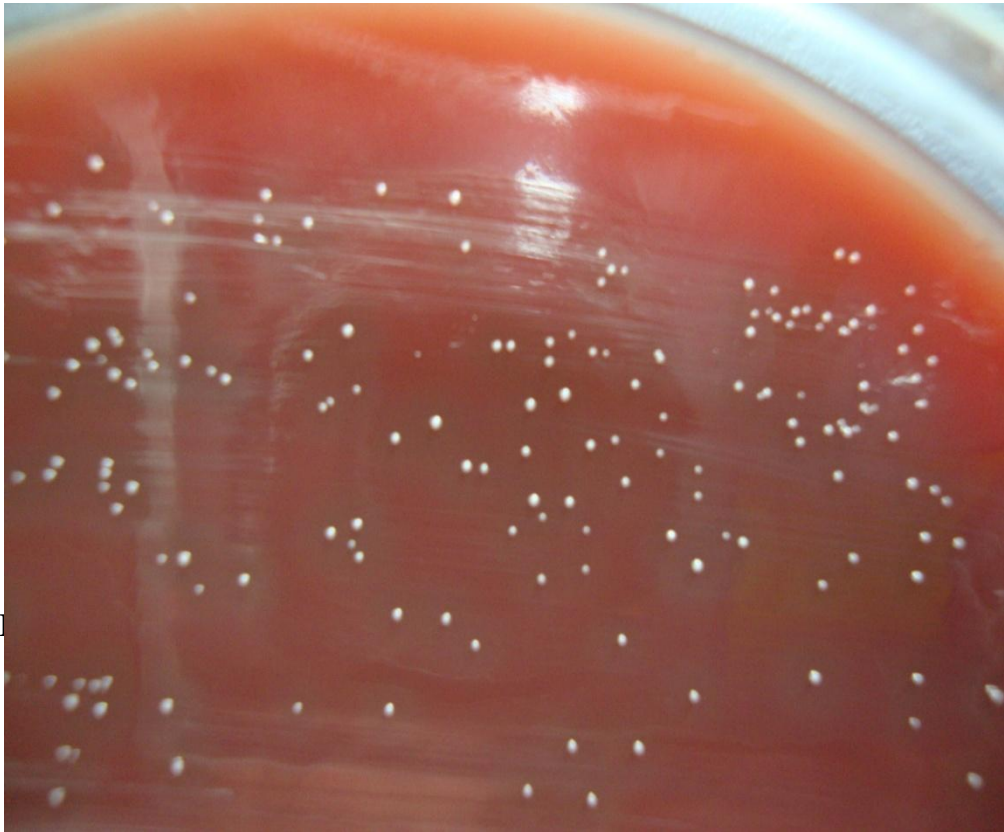
20. Vinagre del P C, Cifuentes M, Valdivieso F, Ojeda A, Prado V. Emergencia de resistencia a macrólidos en *Streptococcus pyogenes*. Rev Méd Chile. 1999; 127:1447-1452
21. . Cruzado L, D Gutiérrez, S Ruiz. Ensayo bioquímico y efecto de antibiosis *in vitro* de la miel de abeja sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Rev. Med. Vallejiana. Perú. 2007; 4(2): 95-108.
22. De la Cruz M. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinoza*. (mulina). Kuntze “taya” sobre la viabilidad de *Streptococcus beta-hemolítico*. (Tesis). Universidad Nacional de Trujillo. 2007.
23. Vit P. Actividad antibacteriana de miel de abeja. Profesores de investigación. Universidad de los andes. Venezuela. 2006.
24. López J, R Ramón, D Cevallos. Propiedades bioquímicas y antimicrobianas de la miel de *Melipoma* del estado de Yucatán. Mexico. 2005.
25. Cabrera L, G Ojeda, E Céspedes y A Colina. Actividad antibacteriana de miel de abejas multiflorares (*Apis mellifera scutellata*) de cuatro zonas avícolas del estado Zulia, Venezuela. Rev. Científica. 2003; 8(3):205-211.
26. Maeda Y, A Loughry, JA Eagle, BC Milla JR Rao, A Kearns, O McConville. Antibacterial activity of honey against community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. Complement. Ther clim Prat. 2008; 14(2):77-82.
27. Viuda M, Ruiz J. Fernández y JA Pérez. Funtional properties of honey, propolis and royal filly. J. Food. Sci. 2008; 73(9): 117-124.
28. Ceyhan N y A Ugur. Investigation of *in vitro* antimicrobial activity of Honey. Rev. Biol. 2001; 94(2):363-371.

29. Miorin PL, NC Luvy, AR Custodio, WA Bretz y MC Marcucci. Antibacterial activity of Honey and propolis from *Apis mellifera* and *tetragonisca angustula* against *S. aureus*. *Appl. Microbiol.* 2003; 95(5): 913-920.
30. Estrada H, M Gamboa, C Chávez y M Arias. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Ps. aureginosa*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes* y *A. niger*. Evaluación de su carga microbiológica. *Costa Rica.* 2005; 55(2): 167-171.
31. Allen K, P Molan y G Reid. A Surrey of the actuvity of some New Zeland honeys. *J. Pharm. Pharmacol.* 1991; 43:817-822.
32. Heuk C. Métodos básicos de laboratorio en Microbiología Clínica. Organización Mundial de la Salud. Suiza. 1997.
33. Prats G. Microbiología Clínica. España. Editorial Panamericana; 2006.
34. Finegold S, J Ellen. Diagnostico Microbiológico. Edit. Panamericana. Argentina; 1991.
35. MacFaddin J. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ªed. Editorial Panamericana. Argentina. 2003
36. Vandepite J, K Engbaek, P Piot y c Heuck. Métodos básicos de laboratorio en bacteriología clínica. OMS. Suiza. 1993.
37. Dwight J y E Kaplan. Diagnostico de laboratorio de las infecciones estreptocócicas del grupo A. Organización Mundial de la Salud. Suiza; 1997.
38. Identificación de *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolítico grupo A (*S. pyogenes*). En Guia de Trabajo Prácticos. Instituto de Tecnología ORT . España. 2006.
39. Portillo A, M Lantero, MJ Gastanares, F Ruiz-Larrea y C Torres. Macrolide resisntance phenotupes and mecanismo of resistance in *Streptococcus pyogenesen* la Rioja. Spain. *Int.J. Antimicrob. Agents.* Spain. 1999. 13:137-140.

40. Joachin F. Fiebre Reumática. En compendio de Terapéutica. Asociación Colombiana de Medicina Interna. Ediciones Acta Médica Colombiana. Colombia. 1992.
41. Salazar L. Acción antimicrobiana *in vitro* de la miel de abeja sobre microorganismos cariogénicos Estreptococos del grupo *mutans*. Int. J. Morphol., Chile. 2009. 27(1):77-82,
42. Steinberg, D.; Kaine, G. & Gedalia, I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *Am. J. Dent.* 9 (6):236-9, 1996.
43. Molan, P.C. Why honey is effective as a medicine. 2. The scientific explanation of its effects. *Bee. World*, 82(1):22-40, 2001 (b).
44. Mato, I.; Huidobro, J.F.; Simal-Lozano, J. & Sancho, M.T. Significance of nonaromatic acids in honey. *J. Food. Prot.*, 66:2371-6, 2003.
45. Basson, N. J.; Du Toit, I. J. & Grobler, S.R. Antibacterial action of honey on oral Streptococci. *J. Dent. Assoc. S. Afr.*, 49: 339-41, 1994.

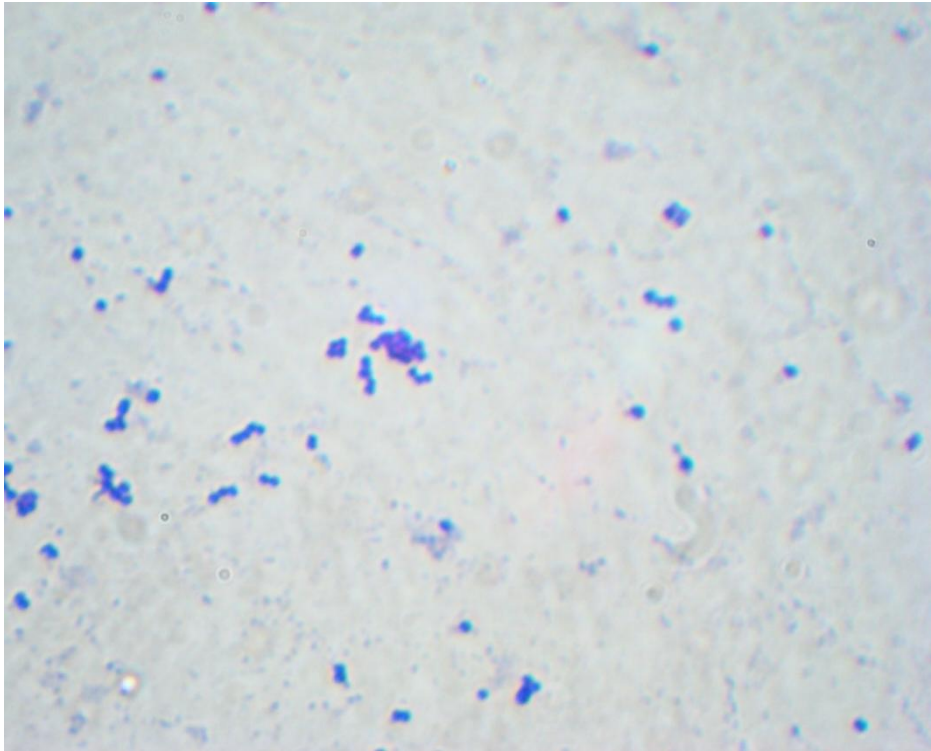
# ANEXOS

## ANEXO 01



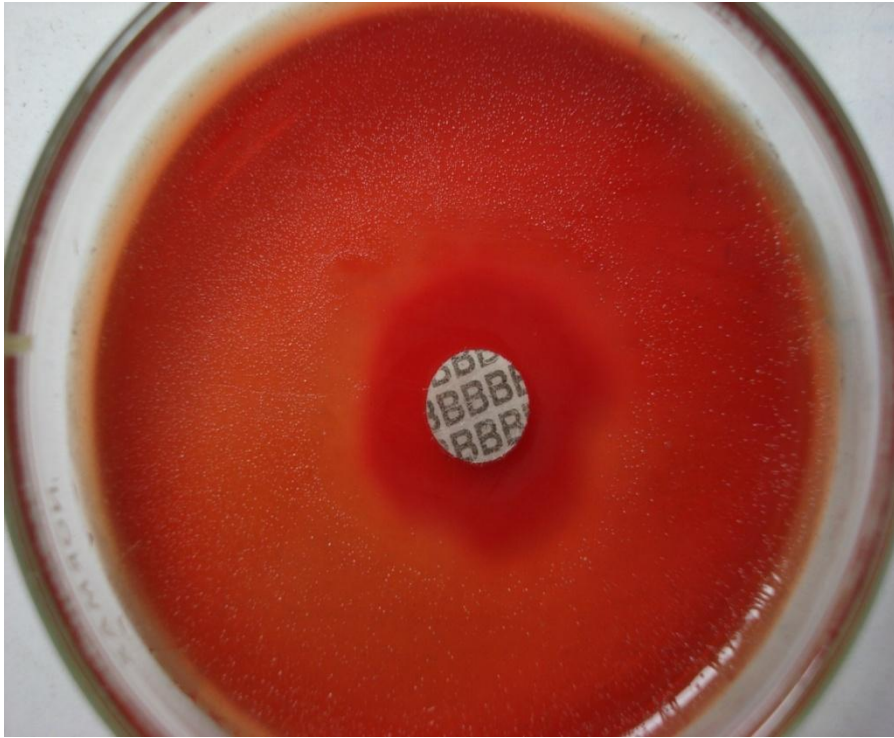
**Fig. N°03.-** Colonias de *Streptococcus*  $\beta$  –hemolítico grupo A de Lancefield aisladas de pacientes sospechosos de faringitis atendidos en el Hospital IV Víctor Lazarte Echeagaray, desde Octubre del 2009 a Agosto del 2010.

**ANEXO 02**



**Fig. N°04.-** Observación de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield mediante la tinción Gram.

ANEXO 03



**Fig. N°05.-** Susceptibilidad de *Streptococcus*  $\beta$  -hemolítico grupo A de Lancefield a la Bacitracina.

## ANEXO 04



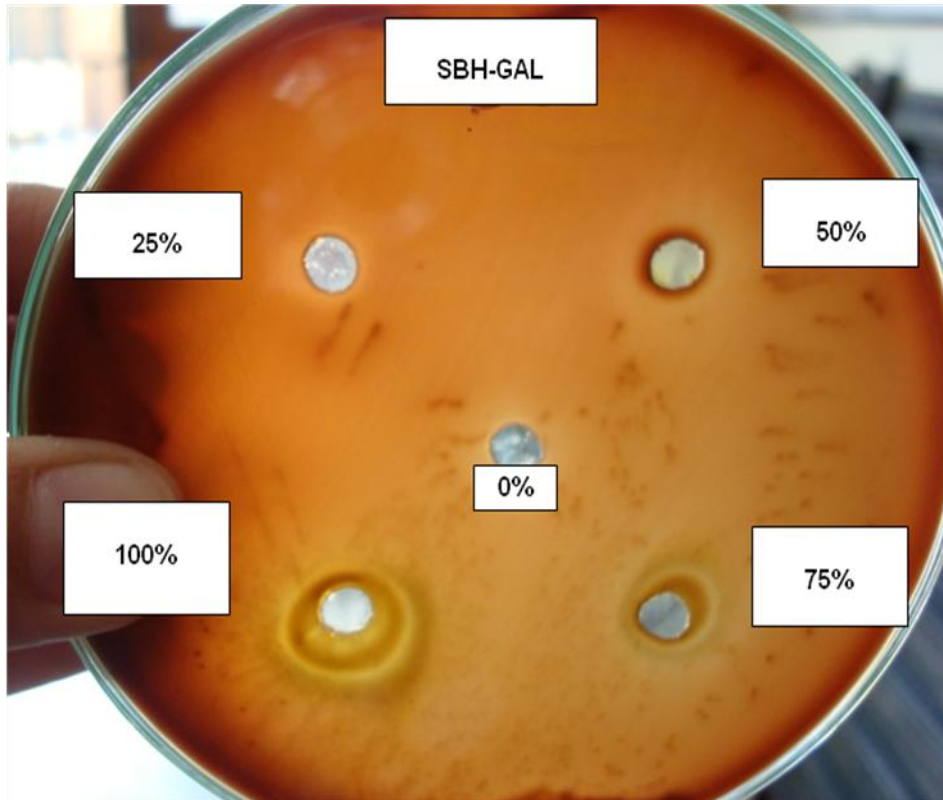
**Fig. N°06.-** Prueba Bioquímica para la determinación de *Streptococcus*  $\beta$  – hemolítico grupo A de Lancefield.

ANEXO 05



**Fig. N°07.-** Cultivo de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield sensible a la Penicilina y Bacitracina.

**ANEXO 06**



**Fig. N°08.-** Efecto de diferentes concentraciones de la miel de abeja sobre el crecimiento “*in vitro*” de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico grupo A de Lancefield

## ANEXO 07

### Resumen Estadístico para DIAM HALO

[ ] MIEL	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Error Estándar
100%	4	25.675	0.0957427	0.0478714
25%	4	8.85	0.191485	0.0957427
50%	4	14.0	0.216025	0.108012
75%	4	18.4	0.432049	0.216025
P	4	34.075	0.206155	0.103078
Total	20	20.2	9.0987	2.03453

### ANOVA para DIAM HALO por [ ] MIEL

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1571.98	4	392.994	6108.71	0.0000
Intra grupos	0.965	15	0.0643333		
Total (Corr.)	1572.94	19			

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de DIAM HALO en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 6108.71, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de DIAM HALO entre un nivel de [ ] MIEL y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

## ANEXO 08

### Pruebas de Múltiple Rangos para DIAM HALO por [ ] MIEL

Método: 95.0 porcentaje Duncan

[ ] MIEL	Casos	Media	Grupos Homogéneos
25%	4	8.85	X
50%	4	14.0	X
75%	4	18.4	X
100%	4	25.675	X
P	4	34.075	X

Contraste	Sig.	Diferencia
100% - 25%	*	16.825
100% - 50%	*	11.675
100% - 75%	*	7.275
100% - P	*	-8.4
25% - 50%	*	-5.15
25% - 75%	*	-9.55
25% - P	*	-25.225
50% - 75%	*	-4.4
50% - P	*	-20.075
75% - P	*	-15.675

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 10 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 5 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.