



Original

## Actividad antibacteriana de la Propolina® frente a bacterias causantes de mastitis subclínica

Antibacterial Activity of Propolina® against Subclinical Mastitis-Causing Bacteria

Aymara L. Valdivia Avila <sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7399-3638>

Yasmary Rubio Fontanills <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9396-4487>

Marlene M. Martínez Mora <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4918-5424>

Melissa Garrote Pérez <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3125-8373>

Yunel Pérez Hernández <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7245-5632>

Madyu M. Matos Trujillo <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0435-5514>

<sup>1</sup> Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.

\* Autor para la correspondencia(email): [aymara.valdivia@umcc.cu](mailto:aymara.valdivia@umcc.cu)

### RESUMEN

**Antecedentes:** La antisepsia final del pezón es una medida preventiva para la mastitis, con este propósito se utilizan soluciones acuosas de Propolina®. Este trabajo tuvo como objetivo determinar la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de Propolina® frente a microorganismos causantes de mastitis.

**Materiales y métodos:** Se aislaron microorganismos de muestras de leche de vacas con tres cruces de mastitis. Se determinó la actividad antimicrobiana de soluciones acuosas de Propolina® entre 2,5 y 60,0 mg.ml<sup>-1</sup> frente a las bacterias aisladas y a una cepa Gram negativa de *Escherichia coli* ATCC 25922 mediante el método de difusión en agar por pocillos. Se utilizó un ANOVA simple para determinar el efecto de las dosis de Propolina® sobre las especies bacterianas y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para la comparación entre las dosis.

#### Como citar (APA)

Valdivia Avila, A., Rubio Fontanills, Y., Martínez Mora, M., Garrote Pérez, M., Pérez Hernández, Y., & Matos Trujillo, M. (2022). Actividad antibacteriana de la Propolina® frente a bacterias causantes de mastitis subclínica. *Revista de Producción Animal*, 34(3). <https://revistas.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e4293>



©El (los) autor (es), Revista de Producción Animal 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Attribution-NonCommercial 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), asumida por las colecciones de revistas científicas de acceso abierto, según lo recomendado por la Declaración de Budapest, la que puede consultarse en: Budapest Open Access Initiative's definition of Open Access.

**Resultados:** Se identificaron las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. Coagulasa negativo y *Corynebacterium* sp., que resultaron sensibles a las soluciones de Propolina®. La cepa Gram negativa de *Escherichia coli* ATCC 25922 no mostró sensibilidad. Las concentraciones 60, 30 y 20 mg.ml<sup>-1</sup> resultaron más efectivas frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* sp. Coagulasa negativo.

**Conclusiones:** Se aislaron e identificaron diferentes géneros microbianos causantes de mastitis subclínica que incluyen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. Coagulasa negativo y *Corynebacterium* sp. Las soluciones de Propolina® mostraron una mayor efectividad frente a los microorganismos Gram positivos *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* sp. Coagulasa negativo los cuales resultaron sensibles a las concentraciones 20, 30 y 60 mg.ml<sup>-1</sup> y 30 y 60 mg.ml<sup>-1</sup> de Propolina®, respectivamente.

**Palabras clave:** actividad antimicrobiana, propóleo, *Staphylococcus* sp. (Fuente: BVS)

## ABSTRACT

**Background:** The final antisepsis of nipples is performed with aqueous solutions containing Propolina® to prevent mastitis. The aim of this paper was to determine the antimicrobial activity of different concentrations of Propolina® against mastitis-causing microorganisms.

**Materials and Methods** The microorganisms were isolated from the milk of cows having three mastitis crossings. The antimicrobial activity of aqueous Propolina® solutions between 2.5 and 60.0 mg.ml<sup>-1</sup> was tested against isolated bacteria and Gram-negative *Escherichia coli* strain ATCC 25922 by spraying the solution in plate wells containing agar. A one-way ANOVA was used to determine the effect of the propoline dose on the bacterial species associated with mastitis; the Duncan's multiple rank-sum test was used for dose comparisons.

**Results:** The Gram-positive bacteria were identified: *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative *Staphylococcus* sp. and *Corynebacterium* sp., which were sensitive to the Propolina® solutions, while Gram negative *Escherichia coli* strain ATCC 25922 showed no sensitivity. The 60, 30, and 20 mg.ml<sup>-1</sup> concentrations were more effective against *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp.

**Conclusions:** *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative *Staphylococcus* sp., and *Corynebacterium* sp. were isolated and identified, as causing subclinical mastitis. The Propolina® solutions were highly effective against Gram positive bacteria *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* sp., which were sensitive to the 20, 30, and 60 mg.ml<sup>-1</sup>, and 30 and 60 mg.ml<sup>-1</sup> concentrations of Propolina® respectively.

**Keywords:** antimicrobial activity, propoleum, *Staphylococcus* spp. (Source: BVS)

Recibido: 9/9/2022;

Aceptado: 11/10/2022;

## INTRODUCCIÓN

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria que causa pérdidas económicas significativas en los rebaños bovinos (Ramírez *et al.*, 2018). Se clasifica de acuerdo a su curso en clínica y subclínica. En la forma clínica se observan los signos de la enfermedad y cambios en la composición química de la leche. La forma subclínica es más común que la clínica, pero en este caso no se aprecian síntomas en los animales ni cambios en la apariencia de este producto (Beniéc *et al.*, 2018).

Esta enfermedad se considera un problema importante de salud pública que provoca disminución de la cantidad y calidad de la leche producida (Andrade *et al.*, 2017; Quevedo, 2018). Puede modificar su composición proteica y lipídica (Valdivia *et al.*, 2020), favorecer la excreción de microorganismos a la leche y afectar la inocuidad de este alimento (Romero *et al.*, 2018).

La mastitis bovina frecuentemente tiene un origen infeccioso y puede ser causada por cerca de 150 especies microbianas (Beniéc *et al.*, 2018). Su prevención debe contemplar la higiene del ambiente donde se desarrollan los animales y del ordeño. La correcta desinfección del pezón post-ordeño o sellado, es una de las medidas más importantes para evitar su presentación. Consiste en la aplicación de una solución antiséptica a los pezones, después de retiradas las pezoneras. Esta práctica tiene el propósito de reducir la penetración y la multiplicación de patógenos infecciosos y ambientales que quedan en la piel y la punta del pezón al finalizar el ordeño, para evitar su entrada y multiplicación en el canal del pezón (Blanco y Montero, 2018). Con este objetivo, en la Empresa Pecuaria Genética de Matanzas (EPGM) se emplea la solución acuosa de tintura de Propolina<sup>®</sup>, elaborada a base de propóleos.

El propóleo es uno de los productos de la colmena que genera gran interés en la comunidad científica. Posee una compleja composición y un amplio espectro de actividades. Su acción antimicrobiana está descrita frente a cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas (Przybyłek *et al.*, 2019). Sin embargo, su efectividad depende de la especie microbiana en cuestión, que a su vez puede variar en el tiempo por diversos factores ambientales, así como por la concentración del producto. Los resultados indican que la Propolina<sup>®</sup> constituye una alternativa recomendable para la prevención de la mastitis. El empleo de soluciones de propóleo para combatir microorganismos permite contar con productos naturales e inocuos para el enfrentamiento a microorganismos resistentes a los antibióticos (Fernández-León *et al.*, 2022). A partir de estos resultados, esta investigación tuvo como objetivo determinar la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de Propolina<sup>®</sup> frente a microorganismos causantes de mastitis subclínica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Toma de muestras de leche

El muestreo se realizó en una vaquería perteneciente a la EPGM, en el mes de mayo de 2019. En la unidad, el ordeño se realiza dos veces al día (4:00 am y 4:00 pm) con el empleo de un equipo

mecanizado marca Eurolate. Las vacas corresponden a la raza Mambí y se alimentaban con pasto estrella [*Cynodon nlemfuensis* (Van-deryst)], forraje King grass CT-115 (*Cenchrus purpureus* Schumach Morrone), caña molida (*Saccharum officinarum*), pienso de vaca lechera y sales minerales *ad libitum*.

Se tomaron diez muestras de leche de vacas que no presentaban signos clínicos de mastitis ni alteraciones en la leche. Las muestras se obtuvieron por ordeño manual de cuartos que previamente se diagnosticaron como positivos a tres cruces de mastitis subclínica, mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT). Para ello, las ubres se lavaron con agua corriente y posteriormente se desinfectaron con un algodón estéril humedecido en etanol al 70%. Se colectaron aproximadamente 5 ml de leche que se extrajeron después de realizar el despunte. Las muestras se conservaron en hielo y se trasladaron al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas para su procesamiento.

### **Aislamiento de bacterias causantes de mastitis**

Se sembraron 100 µl de cada muestra de leche en placas que contenían medio agar nutriente mediante diseminación con espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C en condiciones de aerobiosis. Posteriormente, se seleccionaron las colonias que mostraron características culturales diferentes, las que se purificaron mediante siembra por estrías en placas con agar nutriente con el empleo de un asa de siembra de platino. Para la conservación de las cepas aisladas se utilizaron dos métodos: en cuñas de agar nutriente a 4 °C y en glicerol a -20 °C.

### **Pruebas bioquímicas e identificación de bacterias causantes de mastitis**

Las cepas conservadas se inocularon en tubos que contenían 3 ml de caldo nutriente y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Luego se sembraron en tubos con cuñas de agar nutriente y se colocaron en las condiciones descritas anteriormente. Las pruebas bioquímicas catalasa, manitol salado, hidrólisis del almidón y coagulasa se realizaron según el procedimiento descrito por MacFaddin (2006).

Se realizó la tinción de Gram a partir de los cultivos jóvenes de las cepas que se sembraron en agar nutriente por el método de Madigan *et al.* (2015). Se determinó la presencia de endospora por el mismo procedimiento.

### **Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de Propolina®**

Para los estudios de actividad antimicrobiana se utilizó la Propolina® procedente de la Empresa Productora y Comercializadora de Productos Biofarmacéuticos de Matanzas GENIX®, LABIOFAM que contenía 60 mg·ml<sup>-1</sup> de sustancias bioactivas. Se prepararon diluciones acuosas de este producto con las concentraciones siguientes: 2,5; 5,0; 7,5; 20,0 y 30,0 mg·ml<sup>-1</sup>.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las cinco diluciones preparadas y la Propolina® en su forma de presentación (60,0 mg·ml<sup>-1</sup>) se efectuó en placas mediante el método de difusión en agar por pocillos (Pérez *et al.*, 2020). Se utilizó como control una solución hidroalcohólica al

10%. La evaluación se realizó frente a los microorganismos aislados de las muestras de leche procedentes de vacas diagnosticadas con mastitis subclínica y a una cepa Gram negativa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Esta última cepa se incluye en el estudio para comprobar la efectividad del producto ante microorganismos que muestran este patrón frente a la tinción de Gram.

Los microorganismos que se emplearon en este ensayo crecieron a 37°C durante 24h en medio agar Müeller-Hinton. Posteriormente, se tomaron colonias aisladas que se inocularon en tubos que contenían 9 ml de caldo Müeller-Hinton y se dejaron crecer hasta que alcanzaron una concentración equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. Luego se sembraron por diseminación en placas que contenían agar Müeller-Hinton con el empleo de un hisopo estéril. Los pocillos se realizaron con un horador estéril y se le añadieron 200 µl de cada solución a evaluar. Las placas se colocaron a 4 °C durante 15 minutos y después se incubaron a 37 °C durante 18h (Pérez, 1990). Se realizaron tres réplicas por cada cepa.

La inhibición del crecimiento se calculó mediante la fórmula:  $I = DZI - DP$

Dónde: DZI es el diámetro de la zona de inhibición y DP el diámetro del pocillo, ambas mediciones se realizaron con un pie de rey.

Para realizar la evaluación cualitativa de la inhibición se empleó la escala de Duraffourd (Duraffourd *et al.*, 1987) que establece los criterios siguientes:

- Nula (-) cuando el diámetro del halo de inhibición es inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +) cuando el halo de inhibición comprende entre 8 y 14 mm.
- Medio (muy sensible = ++): para un diámetro entre 14-20 mm.
- Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20mm.

### **Análisis estadístico**

Los datos se procesaron con el programa estadístico Statgraphics Plus 5.0 sobre Windows. Se analizó primeramente el ajuste de los datos a una distribución normal y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de bondad de ajuste (Chi cuadrado) y la prueba de Bartlett, respectivamente. Se realizó un Análisis de Varianza de clasificación simple y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ( $P < 0,05$ ) para la comparación entre las medias.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Aislamiento de bacterias causantes de mastitis**

Se aislaron 15 cepas bacterianas Gram positivas de las muestras de leche tomadas de vacas previamente diagnosticadas con tres cruces de mastitis subclínica. Se seleccionaron tres de ellas, de acuerdo a las características morfológicas de sus colonias y a la respuesta a la tinción de Gram

para su identificación. Como resultado se aislaron los microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. Coagulasa negativo y *Corynebacterium* sp.

*Staphylococcus aureus* es uno de los principales patógenos relacionados con la presencia de mastitis subclínica de tipo contagioso en los rebaños (Jurado-Gómez *et al.*, 2019). Este microorganismo y *Enterobacter* spp. se identificaron como agentes causantes de esta enfermedad en una lechería de la Empresa Pecuaria Genética Los Naranjos, en el municipio Caimito provincia Artemisa, Cuba (García-Sánchez *et al.*, 2018). Su aislamiento en la leche implica el riesgo de la presencia de enterotoxinas en este y otros productos lácteos que pueden causar gastroenteritis e infecciones en la piel en los humanos (Benicé *et al.*, 2018; NiolaToasa *et al.*, 2020).

Las cepas de *Staphylococcus* sp. Coagulasa negativo y *Corynebacterium* sp. aisladas en el presente trabajo también son descritas como causantes de infecciones leves o de tipo subclínico (Sánchez Bonilla *et al.*, 2018). Estos autores consideran a *Staphylococcus* sp. Coagulasa negativo como un patógeno emergente en mastitis a nivel mundial.

*Corynebacterium* spp. se encuentra entre los patógenos contagiosos y ambientales causantes de mastitis (Andrade *et al.*, 2017; Hahne *et al.*, 2018). Su presencia en un rebaño puede indicar la desinfección inadecuada de los pezones (Callejo, 2010). Este género bacteriano también se diagnosticó en casos de la enfermedad en cabras por Nabih *et al.* (2018).

Los tres microorganismos aislados en la presente investigación se clasifican como Gram positivos. Sin embargo, en la literatura consultada se plantea que esta enfermedad también puede ser causada por microorganismos Gram negativos. Entre estos *Escherichia coli* constituye uno de los aislamientos más frecuentes (Fiordalisi *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2017).

### Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes concentraciones de Propolina® frente a bacterias Gram positivas y negativas

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el experimento anterior se determinó la actividad antimicrobiana *in vitro* de concentraciones de Propolina® entre 2,5 –60,0 mg·ml<sup>-1</sup> frente a las cepas salvajes aisladas de vacas con mastitis subclínica y a la cepa de *E. coli* ATCC 25922 y los datos se procesaron estadísticamente. A partir del análisis estadístico se aceptó la normalidad de los datos ya que se obtuvo un p-valor igual a 0,0808. De manera similar, se aceptó la homogeneidad de la varianza de los datos (hipótesis nula), ya que el p-valor calculado fue de 0,163.

En la **Tabla 1** se muestran los resultados estadísticos del Análisis de Varianza Simple realizado a cada grupo microbiano. Como se puede observar, el p-valor calculado para cada grupo microbiano fue menor que 0,05, por lo cual se obtuvieron diferencias significativas entre las distintas dosis evaluadas para cada microorganismo en estudio.

**Tabla 1.** Resultados estadísticos del Análisis de Varianza Simple realizado a cada grupo microbiano estudiado.

Grupo microbiano	N	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
------------------	---	----	----------------	---	------

<i>Staphylococcus aureus</i>	21	6	66,08	173,46	0,0000
<i>Staphylococcus</i> spp. Coagulasa negativo	21	6	110,38	193,17	0,0000
<i>Corynebacterium</i> sp.	21	6	40,60	1107,36	0,0000

La **tabla 2** muestra los resultados del efecto antibacteriano de las concentraciones de Propolina® estudiadas frente a las cepas salvajes de *Staphylococcus* sp. Coagulasa negativo y a *Staphylococcus aureus*. En el caso de la primera cepa, la mayor inhibición se alcanzó con la concentración de 60,0 mg·ml<sup>-1</sup>, seguida por las concentraciones de 30,0, 20,0 y 7,5 mg·ml<sup>-1</sup> respectivamente; mientras que las dosis de 5,0 y 2,5 mg·ml<sup>-1</sup>, no evidenciaron actividad inhibitoria con valores similares estadísticamente a la solución hidroalcohólica utilizada como control.

La Propolina® también fue efectiva frente a la cepa aislada de *S. aureus*. Todas las concentraciones evaluadas evidenciaron un efecto antibacteriano al comparar los resultados con la disolución hidroalcohólica control. Los valores de inhibición más altos se observaron con la concentración 60,0 mg·ml<sup>-1</sup>, seguida de 30,0 y 20,0 mg·ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Las concentraciones entre 7,5 y 2,5 mg·ml<sup>-1</sup> mostraron valores similares entre sí, inferiores a 20,0 mg·ml<sup>-1</sup> del producto, pero superiores al control.

Según la escala de Duraffourd la cepa de *S. aureus* aislada fue sensible a las concentraciones de Propolina® superiores a 7,5 mg·ml<sup>-1</sup> y muy sensible a la dosis máxima evaluada de 60 mg·ml<sup>-1</sup> y la cepa de *Staphylococcus* spp Coagulasa negativo resultó sensible a la concentración 30 mg·ml<sup>-1</sup> y muy sensible a 60 mg·ml<sup>-1</sup>.

**Tabla 2.** Actividad antibacteriana de diferentes concentraciones de Propolina® frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. Coagulasa negativa y a *Corynebacterium* sp.

Propolina® (mg·ml <sup>-1</sup> )	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Staphylococcus</i> spp Coagulasa negativo			<i>Corynebacterium</i> sp.		
	I (mm)	± EE	S	I (mm)	± EE	S	I (mm)	± EE	S
2,5 mg·ml <sup>-1</sup>	6,33 <sup>d</sup>	0,33	-	0,00 <sup>f</sup>	0,00	-	1,9 <sup>b</sup>	0,22	-
5 mg·ml <sup>-1</sup>	7,33 <sup>d</sup>	0,33	-	0,66 <sup>ef</sup>	0,33	-	1,7 <sup>b</sup>	0,22	-
7,5 mg·ml <sup>-1</sup>	6,66 <sup>d</sup>	0,33	-	3,33 <sup>d</sup>	0,33	-	0,86 <sup>c</sup>	0,22	-
20 mg·ml <sup>-1</sup>	8,66 <sup>c</sup>	0,33	+	5,66 <sup>c</sup>	0,88	-	0,86 <sup>c</sup>	0,22	-
30 mg·ml <sup>-1</sup>	11,0 <sup>b</sup>	0,00	+	8,33 <sup>b</sup>	0,33	+	0,86 <sup>c</sup>	0,22	-
60 mg·ml <sup>-1</sup>	15,33 <sup>a</sup>	0,66	++	17,66 <sup>a</sup>	0,33	++	10,83 <sup>a</sup>	0,22	+
Alcohol (10%) Control	0,00 <sup>e</sup>	0,00	-	1,66 <sup>e</sup>	0,33	-	0,83 <sup>c</sup>	0,22	-

I: diámetro de la zona de inhibición. Los datos representan medias de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencia significativa según Duncan (P≤0,05). La sensibilidad (S) se indica según la escala de Duraffourd (-): nula, (+): sensible, (++) : muy sensible. ± EE: error estándar.

Los resultados obtenidos concuerdan con los referidos por otros autores donde se observó un efecto antibacteriano del propóleo frente a *Staphylococcus* spp. Fiordalisi *et al.* (2016) estudiaron el efecto antibacteriano de diferentes concentraciones de propóleo frente a *S.aureus*. Estos investigadores observaron una reducción del crecimiento bacteriano en concentraciones entre

750-1,000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , lo cual se relacionó con diversos componentes presentes en el propóleo, principalmente flavonoides, ésteres y compuestos terpenoides. Navarro López *et al.* (2018), también vinculan la acción antibacteriana del propóleo a la presencia de flavonoides, ésteres, sesquiterpenos, ácidos grasos, hidroxiácidos, además de otros compuestos como la acacetina y la galangina que establecen un sinergismo significativo para favorecer la actividad biológica.

Estudios similares de actividad antimicrobiana *in vitro* con un propóleo chileno frente a la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 33862) evidenció una sensibilidad a concentraciones superiores a 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Balboa *et al.*, 2018). En trabajos realizados por Rodríguez *et al.* (2020), se evaluó la efectividad de propóleos de diferentes regiones de México frente a esta especie bacteriana. Estos autores determinaron valores de Concentración Mínima Inhibitoria entre 0,19 y 15,0  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  y de Concentración Mínima Bactericida entre 0,37 y 30,0  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Suran *et al.* (2015) obtuvieron valores de concentración mínima inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* entre 16 y 64  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , con el uso de soluciones no alcohólicas de propóleo.

Un estudio sobre el efecto de extractos etanólicos de propóleo frente a aislamientos de *Staphylococcus* spp. procedentes de cabras con mastitis, demostró la efectividad de estos extractos con una eficacia de 72,67% (Santos *et al.*, 2020). En la presente investigación, se comprobó que la cepa *Staphylococcus aureus* fue sensible a concentraciones de 20, 30 y 60  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de Propolina®, mientras que la cepa *Staphylococcus* sp. Coagulasa negativo mostró sensibilidad ante 30 y 60  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  del producto.

En la **tabla 2** se muestra además el efecto de la Propolina® frente a *Corynebacterium* sp. Como se puede observar, frente a este microorganismo solo se obtuvo un efecto inhibitorio en la máxima concentración evaluada (60  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). En el caso de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 se consideró resistente ya que no mostró sensibilidad a ninguna de las dosis estudiadas.

La actividad antibacteriana observada en la presente investigación con el uso de la Propolina®, concuerda con los resultados obtenidos por otros investigadores. Klhar *et al.* (2019) enfrentaron un extracto etanólico de propóleo con una concentración de 300  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a bacterias Gram positivas y Gram negativas y comprobaron que los niveles más altos de inhibición se alcanzaron frente a las Gram positivas.

Los resultados obtenidos en el enfrentamiento de las disoluciones de propolina ante *Corynebacterium* sp. pueden estar relacionados con las características estructurales de la pared celular, la cual tiene una arquitectura compleja debido a que estas bacterias están cubiertas por una capa de peptidoglicano a la que se une covalentemente una de arabinogalactanos. Unido a esto se encuentra una capa de ácidos micólicos, la cual es funcionalmente equivalente a la capa LPS de las bacterias Gram negativas. Adicionalmente, se encuentra una capa más externa compuesta de polisacáridos, glicolípidos y proteínas (Burkovski, 2013). Se ha descrito que uno de los mecanismos de resistencia intrínseca por los cuales las bacterias se hacen menos susceptibles a los desinfectantes es la formación de biopelículas, característica presente en este género (Rozman *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2020).



Fiordalisi *et al.*, (2016) también estudiaron las propiedades antimicrobianas de propóleos brasileños de diferentes orígenes geográficos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. En el caso de este último microorganismo, encontraron una eficacia limitada que se asoció con la complejidad química que poseen las paredes celulares de las bacterias Gram negativas. Resultados similares se encontraron al evaluar extractos etanólicos de propóleos mexicanos frente a estos dos microorganismos (Rodríguez *et al.*, 2020). Estos autores lograron inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, pero no se apreció efectividad frente a *Escherichia coli*.

## CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron diferentes géneros microbianos causantes de mastitis subclínica que incluyen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. Coagulasa negativo y *Corynebacterium* sp. Las soluciones de Propolina<sup>®</sup> mostraron una mayor efectividad frente a los microorganismos Gram positivos *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* sp. Coagulasa negativo los cuales resultaron sensibles a las concentraciones 20, 30 y 60 mg·ml<sup>-1</sup> y 30 y 60 mg·ml<sup>-1</sup> de Propolina<sup>®</sup>, respectivamente.

## REFERENCIAS

- Andrade, M., Muños, M., Artieda, J. R., Ortíz, P., González, R. & Vega, V. (2017). Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche. *Revista Electrónica Veterinaria*, 18(11), 1-16. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
- Balboa, N., Núñez, D., Alvear, M., Cerón, A., & Paredes, M. (2018). Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de un propóleo chileno sobre muestras clínicas de exudados bucofaríngeos y cepas ATCC. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 17(6), 541-554. <https://search.bvsalud.org/gim/resource/fr/biblio-1007328>
- Benić, M., Maćešić, N., Cvetnić, L., Habrun, B., Cvetnić, Ž., Turk, R., ... & Samardžija, M. (2018). Bovine mastitis: a persistent and evolving problem requiring novel approaches for its control-a review. *Veterinarski arhiv*, 88(4), 535-557. <https://hrcak.srce.hr/clanak/300244>
- Blanco, A. J., & Montero, R. M. (2018). Evaluación de tres selladores de pezones para la prevención de casos nuevos de mastitis en ganado lechero (*Bostaurus*) en San Carlos, Costa Rica. *Revista AgroInnovación en el Trópico Húmedo*, 1(1), 72-77. <https://181.193.125.13/index.php/agroinn/article/view/3931>
- Burkovski, A. (2013). Cell Envelope of *Corynebacteria* : Structure and Influence on pathogenicity. *ISRN Microbiology*, 2013(935736), 1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/935736> Review

- Callejo Ramos, A. (2010). Desinfectantes de pezones. *Frisona española*, (178), 94-100. <https://oa.upm.es/7650/>
- Duraffourd, C., D'Hervicourt, L., & Lapraz, J. C. (1987). *Cuadernos de fitoterapia clínica: Infecciones ORL y broncopulmonares, enfermedades infantiles, afecciones cutáneas*. Masson.
- Fernández-León, K. J., Rodríguez-Díaz, J. A., Reyes-Espinosa, L., Duquesne-Alderete, A., Solenzal-Valdivia, Y. O., Rives-Quintero, A., & Hernández-García, J. E. (2022). Comparison of in vitro anti-Staphylococcus aureus activity of eight antibiotics and four dilutions of propolis. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 13(1), 35-48. <https://www.redalyc.org/journal/3613/361370160007/361370160007.pdf>
- Fiordalisi, S. A., Honorato, L. A., Loiko, M. R., Avancini, C. A., Veleirinho, M. B., Machado Filho, L. C., & Kuhnen, S. (2016). The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. *Journal of dairy science*, 99(3), 2308-2318. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215009418>
- García-Sánchez, F., Sánchez-Santana, T., López-Vigoa, O., & Benítez-Álvarez, M. Á. (2018). Prevalencia de mastitis subclínica y microorganismos asociados a esta. *Pastos y Forrajes*, 41(1), 35-40. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942018000100005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942018000100005)
- Hahne, J., Kloster, T., Rathmann, S., Weber, M., & Lipski, A. (2018). Isolation and characterization of Corynebacterium spp. from bulk tank raw cow's milk of different dairy farms in Germany. *PLoS One*, 13(4), e0194365. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0194365>
- Jurado-Gámez, H., Muñoz-Domínguez, L., Quitiaquez-Montenegro, D., Fajardo-Argoti, C., & Insuasty-Santacruz, E. (2019). Evaluación de la calidad composicional, microbiológica y sanitaria de la leche cruda en el segundo tercio de lactancia en vacas lecheras. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 66(1), 53-66. <https://search.proquest.com/openview/fb82c987df1c3a7bc40404485370d811/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2035755>
- Klhar, G. T., Isola, J. V., da Rosa, C. S., Giehl, D. Z., Martins, A. A., Bartmer, M. E., & Segabinazzi, L. R. (2019). Antimicrobial activity of the ethanolic extract of propolis against bacteria that cause mastitis in cattle. *Biotemas*, 32(1), 1-10. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20193145230>
- MacFaddin, J. F. (2006). Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica. Tomo I.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K., Buckley S. & Stahl D.A. (2015) *Brock Biology of Microorganism*, (14 Ed), 25- 81p. <https://fkg.usu.ac.id/images/Brock-Biology-Of-Microorganisms-14th-Edition-by-Michael-T-Madigan-John-M-Martinko-Kelly-S-Ben.pdf>

- Nabih, A. M., Hussein, H. A., El-Wakeel, S. A., Abd El-Razik, K. A., & Gomaa, A. M. (2018). *Corynebacterium pseudotuberculosis* mastitis in Egyptian dairy goats. *Veterinary world*, 11(11), 1574. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6303489/>
- Navarro López, J. S. A., Lezcano, M. R., Mandri, M. N., Gili, M. A., & Zamudio, M. E. (2018). Acción anticariogénica del propóleo. [https://www.lareferencia.info/vufind/Record/AR\\_9e7a08f272614eef8db2d4c84bf4daf7](https://www.lareferencia.info/vufind/Record/AR_9e7a08f272614eef8db2d4c84bf4daf7)
- NiolaToasa, A.G., Medina Montoya, F.A., Anchundia, G.M., & Peñaranda Coloma, J.B. (2020). *Staphylococcus aureus* resistente a meticiclina. *Recimundo*, 4(3), 96-101. <https://www.recimundo.com/index.php/es/article/view/853>
- Pérez, B. R., Carrillo, J. G. P., Martínez, M. M. C., & Sánchez, T. A. C. (2020). Actividad antibacteriana de propóleos con la adición de chalconas sintéticas. *Acta universitaria*, 30, 1-15. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-62662020000100119](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-62662020000100119)
- Pérez, C. (1990). Antibiotic assay by agar-well diffusion method. *Acta Biol Med Exp*, 15, 113-115.
- Przybyłek, I., & Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial properties of propolis. *Molecules*, 24(11), 2047. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6600457/>
- Quevedo, W. (2018). Recuento de celassomaticas (rsc), como indicador en la resistencia de la mastitis bovina. *Revista Ciencia, Tecnología e Innovación*, 16(17), 1001-1012. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2225-87872018000100005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2225-87872018000100005&script=sci_arttext)
- Ramírez Vásquez, N., Fernández-Silva, J. A., & Palacio, L. G. (2018). Taxa de incidência de mastite clínica e susceptibilidade antibiótica de patógenos produtores de mastite em gado leiteiro do norte de Antioquia, Colômbia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (36), 75-87. <http://dx.doi.org/10.19052/mv.5173>
- Rodríguez, B., Canales, María Margarita, Penieres, J. G. & Cruz, T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria*, 30, 1-30. <https://doi.org/10.15174/au.2020.2435>
- Romero, A. C., Calderón, A., & Rodríguez, R. (2018). Evaluación de la calidad de leches crudas en tres subregiones del departamento de Sucre, Colombia. *Revista colombiana de ciencia animal*, 10(1), 43-50. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2027-42972018000100043](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2027-42972018000100043)
- Rozman, U., Pušnik, M., Kmetec, S., Duh, D., & Turk, S. Š. (2021). Reduced Susceptibility and Increased Resistance of Bacteria against Disinfectants: A Systematic Review. *Microorganisms*, 9(2250), 1-22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122550>
- Sánchez Bonilla, M. D. P., Gutiérrez Murillo, N. P., & Posada Almanza, I. J. (2018). Prevalencia de mastitis bovina en el Cañón de Anaimé, región lechera de Colombia, incluyendo etiología y resistencia antimicrobiana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*,

29(1), 226-239.  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172018000100022&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172018000100022&script=sci_arttext&tlng=pt)

Santos, H. C. D., Vieira, D. S., Yamamoto, S. M., Costa, M. M., Sá, M. C., Silva, E., & Silva, T. (2020). Antimicrobial activity of propolis extract fractions against *Staphylococcus* spp. isolated from goat mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 39, 954-960.  
<https://www.scielo.br/j/pvb/a/zqjNpQhDR3swwDL5BpBN3gb/abstract/?lang=en>

Souza, C. De, Mota, H. F., Faria, Y. V., Cabral, F. D. O., Oliveira, D. R. De, Sant'Anna, L. de O., Nagao, P. E., Santos, C. da S., Moreira, L. O., & Mattos-Guaraldi, A. L. (2020). Resistance to Antiseptics and Disinfectants of Planktonic and Biofilm-Associated Forms of *Corynebacterium striatum*. *Microbial Drug Resistance*, 26(12), 1546-1558.  
<https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0124>

Suran, J., Matanovic, K., Seol, B., Aladrovic, J., Bacic, G., Macesic, N., Masek, T., Brosik, D., Benic, M., Radic, B., & Radin, L. (2015). Intramammary propolis formulation for prevention and treatment of mastitis in dairy ruminants. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38(1), <http://www.researchgate.net>

Valdivia-Avila, A. L., Rubio-Fontanills, Y., Pérez-Hernández, Y., Sarmenteros-Bon, I., Vega-Alfonso, J., & Mendoza-Rodríguez, A. (2020). Factores que influyen en la calidad higiénico-sanitaria de la leche en dos lecherías. *Pastos y Forrajes*, 43(4), 267-274.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S086403942020000400267&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S086403942020000400267&script=sci_arttext&tlng=pt)

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Concepción y diseño de la investigación: ALVA, YRF, MM.MM, MGP, YPH, MMTT; análisis e interpretación de los datos: ALVA, YRF, MM.MM, MGP, YPH, MMTT; redacción del artículo: ALVA, YRF, MM.MM, MGP, YPH, MMTT.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.