



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *Aloe
barbadensis* Miller ASOCIADO A CEFTIOFUR SOBRE CEPAS de
*Escherichia coli***

Natalia Paz Forno Bell

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: BETTY SAN MARTÍN NÚÑEZ
Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET)

FINANCIAMIENTO PROYECTO FONDEF IDeA CA12I10008

SANTIAGO, CHILE
2014



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *Aloe barbadensis* Miller ASOCIADO A CEFTIOFUR SOBRE CEPAS de *Escherichia coli*

Natalia Paz Forno Bell

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

Nota Final:

		Nota	Firma
Prof. Guía:	Betty San Martín N.
Profesor Corrector:	Daniela Iragüen C.
Profesor Corrector:	Consuelo Borie P.

SANTIAGO, CHILE
2014

MEMORIA DE TÍTULO

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *Aloe barbadensis* Miller ASOCIADO A CEFTIOFUR SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli*”

“EVALUATION OF ANTIMICROBIAL EFFECT OF *Aloe barbadensis* Miller ASSOCIATED TO CEFTIOFUR AGAINST STRAINS OF *Escherichia coli*”

Natalia Paz Forno Bell*

*Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto FONDEF IDeA CA12I10008

RESUMEN

El uso indiscriminado de antimicrobianos en animales de producción es la principal causa del aumento de la resistencia bacteriana, por lo que organizaciones intergubernamentales solicitan disminuir el uso excesivo de estos fármacos. La mastitis es causada principalmente por *Escherichia coli* en la zona central de Chile y, debido a que su tratamiento se concentra en el uso de antimicrobianos, se ha estudiado *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*) como una alternativa terapéutica por su efecto antimicrobiano. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio “*in vitro*” de *A. vera* asociado a Cefotiofur en concentraciones menores a su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), frente a *E. coli* ATCC 25922 y en cepas aisladas de vacas con mastitis clínica. Se utilizó el Método de Macrodilución en Caldo. La CMI fue determinada mediante turbidez y confirmada por recuento de UFC/mL y por espectrofotometría UV-visible. Las cepas de campo fueron sometidas a un estudio de sensibilidad (Kirby Bauer) frente a un panel de antimicrobianos antes de analizar el efecto inhibitorio de *A. vera*. La CMI de *A. vera* se determinó en 60 mg/mL. La asociación de *A. vera*/Cefotiofur no inhibió el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922. Todas las cepas de campo presentaron sensibilidad intermedia o resistencia a al menos un antimicrobiano, pero fueron inhibidas por *A. vera*. Esto sugiere que *A. vera* es más efectiva en la inhibición del crecimiento de *E. coli* en comparación a la asociación y podría presentarse como una alternativa terapéutica frente a mastitis clínicas causadas por *E. coli*.

Palabras claves: *Aloe vera*, *Escherichia coli*, Cefotiofur, Mastitis clínica.

ABSTRACT

The inappropriate use of antibiotics in livestock is the main cause of the increase in bacterial resistance. Intergovernmental organizations have required diminishing the excessive use of these drugs. Mastitis is a disease caused mainly by *Escherichia coli* in the central region of Chile, and due to its treatment is focused on antibiotic administration, *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*) as a therapeutic alternative because of its antibiotic activity has been proposed. The objective of this study was to evaluate the “*in vitro*” inhibitory effect of *A. vera* combined to Cefotiofur, being the latter at lower concentrations

than the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), against *E. coli* ATCC 25922 and isolated strains from suffering mastitis cows. Broth Macrodilution Method was performed and the MIC was determined by the unaided eye and confirmed by colony count (CFU/mL) and spectrophotometry UV-vis. The isolated strains were submitted to a susceptibility test (Kirby Bauer) against a panel of antibiotics before the evaluation of the inhibitory effect of *A. vera*. The MIC of *A. vera* was defined at 60 mg/mL. The growth of *E. coli* ATCC 25922 was not inhibited by *A. vera*/Ceftiofur combination. All of the isolated strains were classified as intermediate or resistant at least to one antibiotic of the panel, nevertheless were successfully inhibited by *A. vera*, suggesting that *A. vera* has an acceptable inhibitory effect against *E. coli* compared to the combination. Hence, *A. vera* could be considered as a novel therapeutic alternative for clinical mastitis caused by *E. coli*.

Key words: *Aloe vera*, *Escherichia coli*, Ceftiofur, Clinical Mastitis.

INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de antimicrobianos en animales de producción se considera como la principal causa del aumento de la resistencia bacteriana a nivel mundial, situación que adquiere particular importancia cuando se trata de bacterias zoonóticas que pueden ser transmitidas por alimentos. Con el fin de disminuir o contener la resistencia bacteriana en medicina veterinaria, diferentes organizaciones intergubernamentales como la FAO/OMS (2009), EFSA/ECDC (2012) y OIE (2013) solicitan a los países disminuir el uso excesivo de los antimicrobianos sintéticos en los sistemas de producción animal, a través de su uso racional, o bien, a través del empleo de alternativas terapéuticas.

La resistencia bacteriana también posee un efecto directo sobre la economía de los sistemas productivos, ya que aumenta las tasas de mortalidad y morbilidad, además de los costos por medicamentos debido a la repetición de terapias, y extensión de los períodos de resguardo. En el caso particular del ganado bovino lechero, la mastitis es una enfermedad frecuente, conocida a nivel mundial por las pérdidas económicas que ocasiona (Wilson *et al.*, 2008). Debido a que las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp.* cumplen un rol importante en la frecuencia y permanencia de esta enfermedad en las lecherías, la terapia de la mastitis clínica se concentra fundamentalmente en el uso de antimicrobianos (San Martín *et al.*, 2002). En esta enfermedad las pérdidas económicas no sólo comprenden el costo de los antimicrobianos utilizados en las terapias, sino también, las pérdidas por litros de leche que deben ser eliminados durante la terapia y el período de carencia.

E. coli es la bacteria más frecuentemente aislada de vacas con mastitis clínica en la Región de Valparaíso y Región Metropolitana (San Martín *et al.*, 2002). Este patógeno ambiental ingresa a la ubre a través del canal del pezón, causando cuadros clínicos que por lo general, son de corta duración y de recuperación espontánea. Sin embargo, en ocasiones puede producir gran daño en la glándula mamaria y signos sistémicos severos, utilizándose en estos casos antimicrobianos parenterales o intramamarios. Existen diferentes antimicrobianos para tratar las mastitis por *E. coli*, dentro de los cuales se encuentra Ceftiofur (Roberson, 2012).

Ceftiofur es una cefalosporina de tercera generación utilizada para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gram positivas y negativas. Es de uso veterinario y se postula que su uso excesivo en animales de producción habría derivado en la transmisión de genes de resistencia en bacterias zoonóticas transmitidas por alimentos (Chander *et al.*, 2011).

Aloe barbadensis Miller (*Aloe vera*) es una de las alternativas terapéuticas para la mastitis clínica del ganado lechero debido a su actividad antimicrobiana. Su hoja posee una pulpa interna de la que se obtiene un gel y un exudado, siendo principalmente el gel asociado a usos medicinales como anti-inflamatorio, tratamiento de heridas, antibiótico, entre otras (Boudreau y Beland, 2006; Rodríguez *et al.*, 2010). Si bien se han identificado más de 75 compuestos activos en el gel, entre los que destacan polisacáridos y compuestos fenólicos, las propiedades inhibitorias sobre las bacterias no han logrado atribuirse directamente a alguno de ellos, sino que se habla de un efecto conjunto, que actuaría a través de distintos mecanismos de acción en la bacteria (Shilpakala *et al.*, 2009).

Diferentes investigadores han señalado el efecto inhibitorio de *A. vera* frente a cepas de “American Type Culture Collection” (ATCC) de *E. coli*, pero no frente a cepas aisladas de animales enfermos (Shilpakala *et al.*, 2009; Thirupathi *et al.*, 2010).

Actualmente, existe un pomó intramamario para el tratamiento de las mastitis que contiene *A. vera* asociado a otras hierbas. La terapia con estos pomos ha logrado una adecuada recuperación clínica pero no bacteriológica (Sumano *et al.*, 1996). Además, en un estudio de sensibilidad realizado en cepas de *E. coli* y *S. aureus* la actividad antimicrobiana del gel de *A. vera* resultó ser menor en comparación a los antimicrobianos sintéticos (Shilpakala *et al.*, 2009).

En este trabajo se plantea que *A. vera* asociado a concentraciones menores a la Concentración Mínima Inhibitoria CMI de Ceftiofur lograría inhibir el crecimiento de *E. coli*.

De acuerdo a lo señalado, el objetivo general es evaluar “*in vitro*” el efecto antimicrobiano de una asociación de *A. vera* con Ceftiofur en concentraciones menores a la CMI definidas para este antimicrobiano, frente a *E. coli* ATCC y cepas aisladas de vacas que cursaron con un cuadro de mastitis clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades se realizaron en el laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Favet), el cual funciona bajo un Sistema de Calidad (ISO 17025 of 2005), asegurando la protección del personal y del ambiente al manipular bacterias (se adjunta el certificado del comité de Bioseguridad Animal).

Obtención del gel desde plantas de *A. vera*

Se trabajó con plantas de *A. vera* cultivadas en Chile (Región de Coquimbo), de dos a tres años de edad, y con un gel liofilizado comercial (America Inc. Arizona, USA), proveniente de plantas con aproximadamente dos años de edad (Habeeb *et al.*, 2007). El gel comercial se utilizó como control debido a que la concentración de polisacáridos y compuestos fenólicos son conocidos.

Para obtener el gel, se utilizó como referencia el trabajo de Femenia *et al.*, (2003). Las hojas se lavaron con agua corriente con 50 ppm de cloro activo, finalizando con agua desionizada. Se eliminó la corteza dejando sólo el gel de color blanco, que fue pesado y centrifugado dos veces, la primera por 5 min a 4200 x g y la segunda por 15 min a 4200 x g. El gel se congeló a -80° y luego fue liofilizado.

Extracción de los componentes inhibitorios

Para extraer los componentes fenólicos y polisacáridos del liofilizado y eliminar residuos vegetales, se tomó como referencia el método descrito por Habeeb *et al.*, (2007), con modificaciones: se utilizaron 5 g del gel liofilizado (comercial y obtenido de plantas), como solvente se utilizó metanol puro, la muestra fue agitada por 10 min, fue sometida a baño de ultrasonido por 10 min y centrifugada por 10 min a 4200 x g, en dos oportunidades. Finalmente fue directamente evaporada mediante un rotavapor, sin utilizar soxhlet, obteniéndose un extracto seco con el que se realizaron los estudios de CMI.

Determinación de la CMI de los liofilizados de *A. vera* frente a *E. coli* ATCC 25922

Para cuantificar el efecto inhibitorio de *A. vera* sobre *E. coli* ATCC 25922, se trabajó con el extracto del liofilizado comercial y una vez conocida la concentración (mg/mL) necesaria para inhibir el crecimiento de la bacteria, se utilizó el extracto del liofilizado de gel de hojas de *A. vera* obtenidos de plantas cultivadas a nivel nacional.

Para los análisis se utilizó el Método de Macrodilución en Caldo, siguiendo las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute para animales (CLSI, 2008).

- Obtención del cepario a partir de la bacteria ATCC

Para la obtención del cepario de *E. coli* ATCC 25922 se siguieron las instrucciones del proveedor y luego se mantuvo en un sistema de esferas Cryobank a -80° C.

*- Preparación de las diluciones del gel de *A. vera**

El extracto obtenido de los 5 g de liofilizado fue diluido en 10 mL de caldo Mueller Hinton cation ajustado (CAMHB), logrando una concentración inicial de 500 mg/mL. A partir de ésta, utilizando CAMHB se prepararon las siguientes diluciones: 250; 125; 62; 31; 15,5; 7,8; 3,9; 1,75; 0,875 mg de gel/mL. También se utilizaron diluciones intermedias para determinar de manera más precisa la CMI.

- Inoculación de las bacterias en las diferentes diluciones del gel

A partir del cepario, se preparó una suspensión bacteriana equivalente al estándar 0,5 McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL). A partir de éste se realizó una dilución para obtener una concentración final entre $1-9 \times 10^6$ UFC/mL.

A cada tubo se colocó 1 mL del inóculo bacteriano, 5 mL de cada dilución de *A. vera* y 4 mL de caldo. Se realizaron dos controles, uno sin *A. vera* y uno sin inóculo bacteriano para controlar la esterilidad. Todo el proceso se realizó en un lapso inferior a 15 min. Los tubos se incubaron a $36 \pm 1^{\circ}$ C, por 24 horas.

La CMI se evaluó visualmente por turbidez y fue confirmada midiendo absorbancia por espectrofotometría UV-visible (625 nm) y recuento bacteriano (UFC/mL). En este último caso, 10 μ L de cada tubo se sembraron en placas con “Agar Plate Count” y se incubaron a $36 \pm 1^{\circ}$ C por 24 horas. Finalizada la incubación, se realizó el recuento bacteriano.

Confirmación de la CMI de Ceftiofur frente a *E. coli* ATCC 25922

Se evaluó la CMI de Ceftiofur (Sigma-Aldrich®) con el fin de comprobar los rangos de inhibiciones establecidas por el CLSI (2008), utilizando el Método de Macrodilución en Caldo.

En cada tubo de ensayo se colocaron: 8 mL de CAMHB, 1 mL de diluciones decrecientes de Ceftiofur (rango entre 64-0,06 µg/mL) y 1 mL de suspensión bacteriana ($1-9 \times 10^6$ UFC/mL). Se utilizaron los solventes y diluyentes establecidos para Ceftiofur de acuerdo a lo recomendado por el CLSI (2008). Todos los tubos se incubaron por 24 horas a $36 \pm 1^\circ$ C. Se realizó un control sólo con el inóculo bacteriano y un control sin inóculo bacteriano para controlar esterilidad.

Determinación de la concentración de Ceftiofur para su utilización en la asociación con *A. vera* frente a *E. coli* ATCC 25922

Se realizaron curvas de crecimiento según lo establecido por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1999) para determinar la concentración de antimicrobianos a utilizar en la asociación con *A. vera*.

Las curvas de crecimiento se realizaron con concentraciones decrecientes de Ceftiofur partiendo de la CMI definida para éste antimicrobiano (rango entre 0,5-0,125 µg/mL). A cada tubo se le colocó 1 mL de inóculo bacteriano ($1-9 \times 10^6$ UFC/mL), 1 mL de cada concentración de Ceftiofur y 8 mL de CAMHB. Los tubos se incubaron por 24 horas a $36 \pm 1^\circ$ C. Para evaluar la curva de crecimiento bacteriano, a las 0, 4, 8, 10 y 24 horas se cuantificaron las UFC/mL de cada concentración y se midió la absorbancia por espectrofotometría UV-visible (625 nm).

La concentración que presentó una curva de crecimiento bacteriano similar a la curva de crecimiento sin antimicrobiano, fue elegida para utilizar en la asociación con *A. vera*.

Determinación de la CMI de la asociación de *A. vera* con Ceftiofur frente a *E. coli* ATCC 25922

A partir de la concentración definida de Ceftiofur, y de diluciones decrecientes de *A. vera* a partir de la CMI previamente definida frente a *E. coli* ATCC 25922 se utilizó el Método de Macrodilución en Caldo, de acuerdo a las normas recomendadas por el CLSI (2008) para definir la CMI de la asociación de *A. vera* y Ceftiofur.

En un tubo de ensayo se colocaron: 3 mL de CAMHB, 1 mL de cada dilución de Ceftiofur, 5 mL de la concentración determinada de *A. vera* y 1 mL de suspensión bacteriana ($1-9 \times 10^6$ UFC/mL). Se realizó además un control para cada dilución de *A. vera* sin Ceftiofur, un control para cada concentración de Ceftiofur sin *A. vera*, y un control sólo con bacterias, además de un control sin bacterias. Todos los tubos de la serie se incubaron a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 horas.

La CMI se evaluó visualmente por turbidez y se confirmó mediante espectrofotometría UV-visible (625 nm) y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Para el recuento, 10 μL de cada tubo se sembraron en placas con Agar Plate Count y se incubaron a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 horas.

Estudio de susceptibilidad en cepas de *E. coli* obtenidas de vacas con mastitis clínica frente a *A. vera*, *A. vera* asociado a Ceftiofur y otros antimicrobianos

Las cepas de *E. coli* (n=15) obtenidas de vacas con diagnóstico de mastitis clínica fueron donadas por el laboratorio Biovetec de Favet. Estas cepas fueron aisladas durante el año 2012 de vacas de la Región Metropolitana, y el cepario fue conservado en glicerol a -80°C .

Mediante el Método de Macrodilución en Caldo se evaluó la CMI definida para *A. vera* y para *A. vera* asociado con Ceftiofur.

A cada tubo se colocó 1 mL de inóculo bacteriano ($1-9 \times 10^6$ UFC/mL), 5 mL de la concentración correspondiente a la CMI de *A. vera* y 4 mL de CAMHB. Se realizaron tres controles, uno sin *A. vera*, uno sin agente antimicrobiano y uno sin inóculo bacteriano para controlar la esterilidad. Para el análisis de sensibilidad de las cepas de *E. coli* frente a la asociación de *A. vera* con Ceftiofur, se reemplazó 1 mL de CAMBH por 1 mL de Ceftiofur

(concentración final de 0,125 µg/mL). Todo el proceso se realizó en un lapso inferior a 15 min. Los tubos se incubaron a 36±1° C por 24 horas.

Mediante el Método de Difusión en Placa (Kirby Bauer), se realizó el estudio de susceptibilidad para los otros antimicrobianos, siguiendo las recomendaciones del CLSI (2012). El panel de antimicrobianos incluyó: Ampicilina, Cefalotina, Cefotiofur, Gentamicina, Estreptomina, Tetraciclina, Ácido nalidíxico y Trimetoprim-Sulfametoxazol.

Análisis de resultados

Los resultados confirmatorios de la CMI definida mediante turbidez (visual) fueron analizados porcentualmente, comparando la absorbancia de los tubos correspondientes a la CMI con la absorbancia del tubo control de crecimiento bacteriano normal. Así también se comparó las UFC/mL de los tubos correspondientes a la CMI con las UFC/mL del tubo control de crecimiento bacteriano normal.

Se aceptó la CMI definida visualmente cuando los resultados de las concentraciones correspondientes en los métodos confirmatorios presentaron una disminución del crecimiento $\geq 80\%$ comparado con el tubo control de crecimiento normal.

RESULTADOS

CMI de los extractos de geles de *A. vera* frente a *E. coli* ATCC 25922

La CMI de los extractos de liofilizado de *A. vera* frente a *E. coli* ATCC 25922, evaluada por turbidez, se determinó en 60 mg/mL. Este valor fue igual para los extractos obtenidos de liofilizados comerciales y de hojas de plantas cultivadas a nivel nacional. En las Figuras 1 y 2 se muestran las CMI de ambos extractos comparando la turbidez de cada concentración con el tubo control sin bacterias.

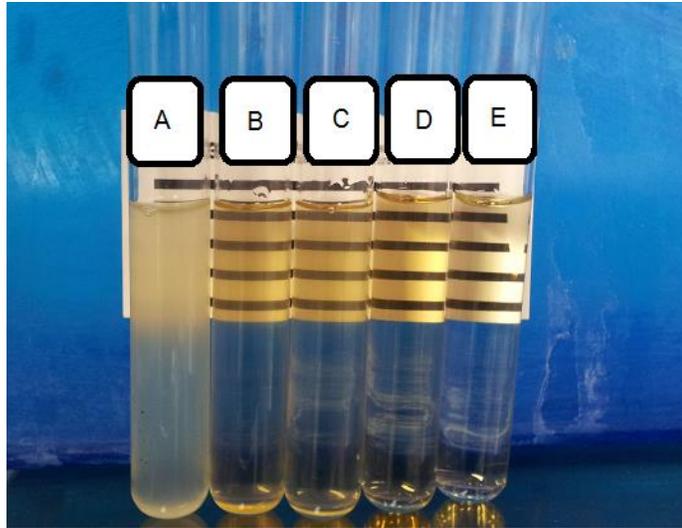


Figura 1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto del liofilizado del gel de *A. vera* comercial (America Inc. Arizona®) frente a *E. coli* ATCC 25922 (medido visualmente). A: Control de crecimiento normal de *E. coli*; B: *E. coli* + 45 mg/mL *A. vera*; C: *E. coli* + 50 mg/mL *A. vera*; D: *E. coli* + 60 mg/mL *A. vera*; E: Control sin bacterias.

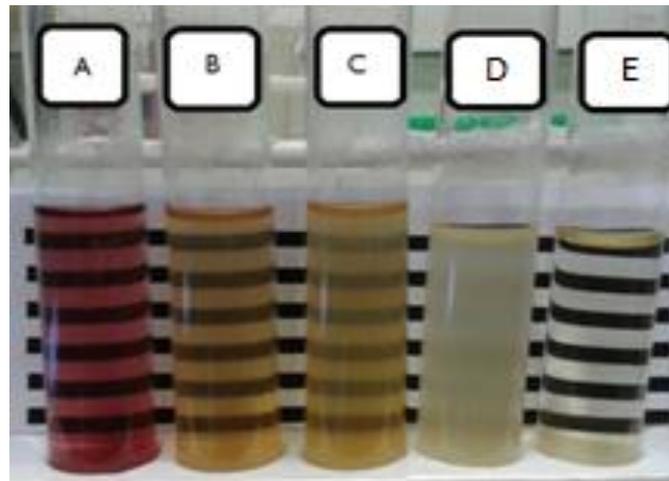


Figura 2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto del liofilizado del gel de *A. vera* obtenido de hoja frente a *E. coli* ATCC 25922 (medido visualmente). A: *E. coli* + 60 mg/mL *A. vera*; B: *E. coli* + 50 mg/mL *A. vera*; C: *E. coli* + 45 mg/mL *A. vera*; D: Control de crecimiento normal de *E. coli*; E: Control sin bacterias.

La CMI fue confirmada por absorbancia y recuento de UFC/mL, ya que los resultados de ambos métodos presentaron una disminución del crecimiento $\geq 80\%$ comparado con el tubo de crecimiento normal.

En las Tablas 1 y 2 se señalan los resultados obtenidos por UFC/mL y absorbancia para los extractos del liofilizado del gel comercial y de hojas obtenidas de plantas cultivadas a nivel nacional.

Tabla 1. Confirmación por UFC/mL y absorbancia de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto del liofilizado del gel de *A. vera* comercial (America Inc. Arizona®) frente a *E. coli* ATCC 25922.

Concentración del extracto del liofilizado (mg/mL)	Confirmación por UFC/mL			Confirmación por absorbancia		
	UFC/mL*	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)	Absorbancia	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)
0	730.000.000	100,00	0,00	1,248	100,00	0,00
45	12.560.000	1,72	98,28	0,138	10,75	89,25
50	11.080.000	1,52	98,48	0,125	9,74	90,26
60	5.840.000	0,80	99,20	0,015	1,17	98,83

*UFC/mL: unidades formadoras de colonias por mL.

Tabla 2. Confirmación por UFC/mL y absorbancia de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto del liofilizado del gel de *A. vera* obtenido de hoja frente a *E. coli* ATCC 25922.

Concentración de <i>A. vera</i> (mg/mL)	Confirmación por UFC/mL			Confirmación por absorbancia		
	UFC/mL*	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)	Absorbancia	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)
0	840.000.000	100,00	0,00	1,284	100,00	0,00
45	460.000.000	54,76	45,24	0,357	27,80	72,20
50	6.480.000	0,77	99,23	0,161	12,54	87,46
60	640.000	0,08	99,92	0,067	5,22	94,78

*UFC/mL: unidades formadoras de colonias por mL.

Se realizaron tres repeticiones con cada extracto de liofilizado. En la Tabla 3 se señalan los porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano, observándose que los resultados están dentro del rango establecido para cada ensayo ($\geq 80\%$).

Tabla 3. Resultados de las repeticiones de los métodos confirmatorios del gel de *A. vera* comercial liofilizado y obtenido de hoja sobre *E. coli* ATCC 25922.

<i>A. vera</i>	Concentración del extracto del liofilizado (mg/mL)	Confirmación por UFC/mL			Confirmación por absorbancia		
		UFC/mL*	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)	Absorbancia	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)
No	0	960.000.000	100,00	0,00	1,258	100,00	0,00
Comercial	60	19.700	0,00	100,00	0,005	0,40	99,60
Comercial	60	3.000	0,00	100,00	0,000	0,00	100,00
Comercial	60	54.800	0,01	99,99	0,015	1,19	98,81
Hoja	60	0	0,00	100,00	0,100	7,95	92,05
Hoja	60	0	0,00	100,00	0,146	11,61	88,39
hoja	60	0	0,00	100,00	0,129	10,25	89,75

*UFC/mL: unidades formadoras de colonias por mL.

Confirmación de la CMI de Cefitiofur definida según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008)

La CMI definida por el CLSI (2008) para Cefitiofur fue confirmada, ya que el resultado frente a *E. coli* ATCC 25922 fue de 0,5 ug/mL.

En la Tabla 4 se señala la CMI de Cefitiofur y de los extractos de los liofilizados de los geles de *A. vera* frente a *E. coli* ATCC 25922.

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los agentes antimicrobianos en estudio.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922		
Agente Inhibitorio	CMI obtenida	CMI definida por el CLSI (2008)
Ceftiofur	0,5 ug/mL	0,25-1,0 ug/mL
<i>A. vera</i> Comercial	60 mg/mL	Sin definición
<i>A. vera</i> Hojas	60 mg/mL	Sin definición

Determinación de la concentración de Ceftiofur para utilizar en asociación con *A. vera*

Después de analizadas las curvas de crecimiento bacteriano con Ceftiofur, en concentraciones menores a la CMI, la concentración de 0,125 ug/mL fue definida para ser utilizada en la asociación con *A. vera*. Esta curva presentó un comportamiento del crecimiento similar a la curva de crecimiento bacteriano sin antimicrobiano y la concentración correspondió a un 25% del valor de la CMI de Ceftiofur frente a la bacteria en estudio.

En la Figura 3 se observan las curvas de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 en presencia de Ceftiofur evaluando las UFC/mL, y en la Figura 4 las curvas de crecimiento evaluadas por espectrofotometría UV-visible (625 nm) (absorbancia).

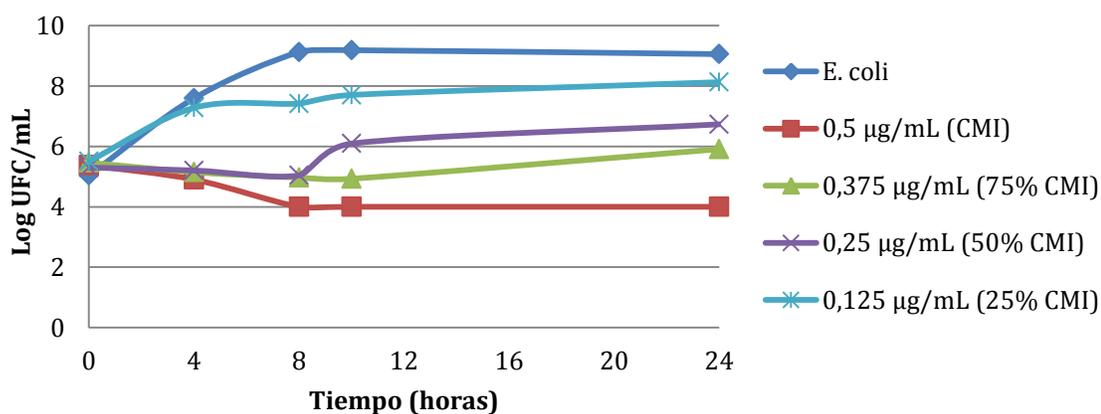


Figura 3. Curva de crecimiento evaluada por UFC/mL para cada concentración de Ceftiofur.

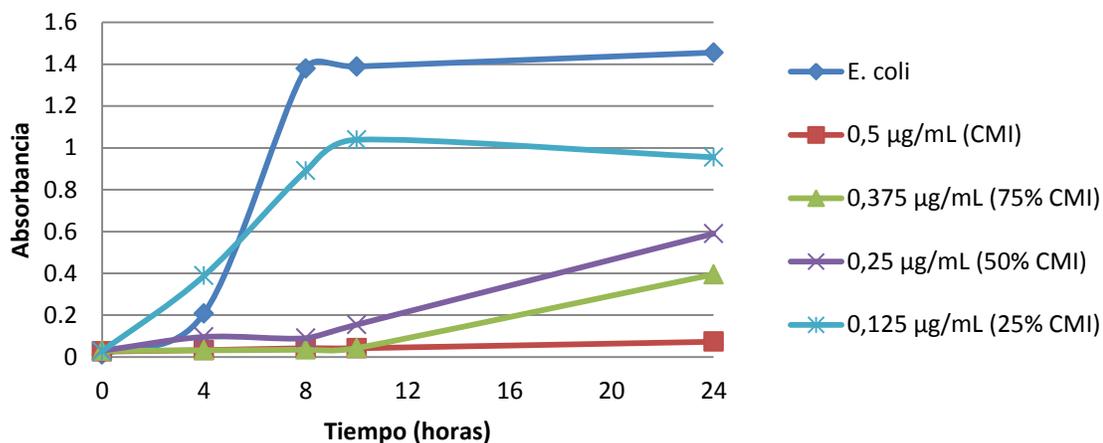


Figura 4. Curva de crecimiento evaluada por espectrofotometría UV- visible (absorbancia) para cada concentración de Ceftriaxona.

Determinación de la CMI de la asociación de Ceftriaxona con *A. vera*

La concentración de 0,125 µg/mL definida en las curvas de crecimiento de *E. coli* frente a Ceftriaxona se asoció con concentraciones menores a la CMI definida para *A. vera* (40, 35 y 30 mg/mL).

Al comparar visualmente la turbidez, se pudo observar que el crecimiento bacteriano de los tubos con las concentraciones elegidas para la asociación fue siempre mayor que el tubo control sin bacteria. Los resultados fueron similares utilizando el liofilizado comercial y el liofilizado obtenido de plantas nacionales.

Evaluación del efecto antimicrobiano de *A. vera* frente a cepas obtenidas de vacas con mastitis clínica.

Debido a que no se logró obtener una CMI con la asociación de *A. vera* y Ceftriaxona, se evaluó sólo el efecto de *A. vera* a la concentración definida como CMI frente a *E. coli* ATCC 25922, en las cepas obtenidas de vacas con diagnóstico de mastitis clínica.

En todas las cepas aisladas se observó el efecto inhibitorio de *A. vera*, al comparar visualmente la turbidez con el tubo control sin bacterias. El efecto inhibitorio fue confirmado al cuantificar las UFC/mL y al medir la absorbancia por espectrofotometría

UV-visible (625 nm), ya que al compararlas con sus controles respectivos, la inhibición fue >80% (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación del efecto de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) definida para el extracto del liofilizado del gel comercial de *A. vera* (America Inc. Arizona®) sobre cepas de *E. coli* aisladas de vacas con mastitis clínica, mediante UFC/mL y absorbancia.

Cepa	Recuento de colonias			Absorbancia		
	UFC/mL*	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)	Absorbancia	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)
1	156.800	0,05	99,95	0,013	1,02	98,98
2	128.000	0,05	99,95	0,007	0,55	99,45
3	128.000	0,05	99,95	0,017	1,34	98,66
4	157.600	0,05	99,95	0,01	0,87	99,13
5	81.600	0,02	99,98	0,012	0,91	99,09
6	157.600	0,05	99,95	0,013	1,12	98,88
7	200.000	0,03	99,97	0,01	0,83	99,17
8	270.400	0,14	99,86	0,012	0,98	99,02
9	188.000	0,06	99,94	0,015	1,30	98,70
10	67.200	0,03	99,97	0,042	0,04	99,96
e	127.200	0,02	99,98	0,014	1,05	98,95
f	163.200	0,05	99,95	0,003	0,25	99,75
g	200.000	0,06	99,94	0	0,00	100,00
h	70.000	0,02	99,98	0,008	0,70	99,30
i	170.000	0,03	99,97	0	0,00	100,00
ATCC 25922	26.400	0,01	99,99	0,058	4,75	95,25

*UFC/mL: unidades formadoras de colonias por mL.

Es interesante señalar, que todas las cepas analizadas presentaron resistencia o sensibilidad intermedia frente a uno o más antimicrobianos. En la Tabla 6 se muestran los resultados del estudio de sensibilidad frente a nueve antimicrobianos.

Tabla 6. Panel de susceptibilidad de cepas de *E. coli* obtenidas de vacas con diagnóstico de mastitis clínica frente a otros antimicrobianos.

Cepa	Antibiótico							
	AM	KF	EFT	GM	S	TE	NA	TXS
1	16 I	18 S	24 S	20 S	14 I	15 I	19 S	23 S
2	21 S	20 S	26 S	21 S	16 S	15 I	21 S	27 S
3	20 S	20 S	28 S	22 S	16 S	16 I	22 S	27 S
4	20 S	20 S	26 S	22 S	15 S	15 I	20 S	28 S
5	4 R	4 R	8 R	20 S	14 I	16 I	19 S	25 S
6	17 S	18 S	23 S	21 S	14 I	5 R	17 I	24 S
7	15 I	16 I	23 S	20 S	14 I	14 R	15 I	23 S
8	16 I	20 S	23 S	22 S	16 S	14 R	20 S	25 S
9	4 R	4 R	11 R	22 S	4 R	4 R	4 R	4 R
10	4 R	4 R	12 R	22 S	4 R	4 R	4 R	4 R
e	18 S	19 S	26 S	21 S	15 S	17 R	20 S	25 S
f	17 S	18 S	24 S	21 S	15 S	14 R	17 I	22 S
g	15 I	16 I	25 S	21 S	16 S	16 I	20 S	25 S
h	20 S	19 S	25 S	22 S	15 S	13 R	20 S	23 S
i	17 S	17 I	23 S	22 S	15 S	16 I	17 I	24 S
ATCC	16	17	26	23	15	18	22	23

*AM: Ampicilina; KF: Cefalotina; EFT: Ceftiofur; GM: Gentamicina; S: Estreptomicina; TE: Tetraciclina; NA: Ácido nalidíxico; TXS: Trimetoprim-Sulfametoxazol.

*R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que los patógenos causantes de mastitis en ganado bovino lechero poseen diferentes niveles de resistencia antimicrobiana según el uso que tengan los antibióticos en una zona geográfica determinada. En países como Estados Unidos de América y Chile la resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de vacas de ganado lechero frente a Ceftiofur es de 4,6% y 11,2%, respectivamente (Erskine *et al.*, 2002; San Martín *et al.*, 2002), mientras que en países como Suiza y Francia el nivel de resistencia es cercano a 0 (Bengtsson *et al.*, 2009; Botrel *et al.*, 2010). Particularmente, en el caso de Chile, San Martín *et al.*, (2005), señalaron que la resistencia de *E. coli* frente a Ceftiofur aumentó a un 54%, en un período de tres años con respecto al estudio realizado el año 2002, lo que podría explicarse por el mayor uso que ha tenido este fármaco durante los últimos años. En este trabajo se describe una situación similar de la resistencia de *E. coli* frente a Enrofloxacino, debido a que se incrementó aproximadamente en un 32% comparado con el estudio anterior. Entre otros antimicrobianos que han presentado considerables niveles de resistencia a nivel mundial

destacan Oxitetraciclina, Estreptomycin y Gentamicina (San Martín *et al.*, 2002; Erskine *et al.*, 2002; Ebrahimi *et al.*, 2007; Bengtsson *et al.*, 2009; Botrel *et al.*, 2010; Kalmus *et al.*, 2011).

Considerando estos antecedentes, es evidente la importancia de disponer de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de mastitis, teniendo en cuenta además que dicha patología es responsable de aproximadamente un 80% del uso de antimicrobianos en el ganado bovino lechero (Pol y Ruegg, 2007).

La CMI obtenida en este estudio (60 mg/mL) resultó ser menor en comparación a la señalada por Shilpakala *et al.*, (2009), quienes frente a la misma bacteria, estimaron un valor de 100 mg/mL, utilizando un extracto de gel proveniente de plantas con dos años y medio de edad. Es importante señalar que estos autores la determinaron mediante el método de Kirby Bauer, sin confirmarla mediante el recuento de UFC/mL.

Para explicar las diferencias de estos resultados, se deben considerar diversos factores que modifican la actividad antimicrobiana del gel de *A. vera*, incluyendo la edad de cosecha y el origen de la planta, y la capacidad de extraer y concentrar los componentes que causan el efecto inhibitorio desde el liofilizado. Con respecto a la edad de cosecha, diferentes autores han descrito que en plantas con dos a tres años se alcanza la mayor concentración de aloína en las hojas, la que disminuye su concentración con el paso del tiempo (Shilpakala *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010). Aloína es uno de los compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana, por lo tanto el momento de la cosecha de la planta podría ser un factor a considerar al realizar estudios de actividad antimicrobiana del gel de *A. vera*. Sin embargo, tanto en este estudio como en el de Shilpakala *et al.*, 2009, se utilizaron liofilizados proveniente de plantas de dos a tres años de edad (Habeeb *et al.*, 2007). Por otra parte, el origen de las plantas, obedeciendo a las condiciones climáticas de la región en la que la planta ha sido cultivada, afecta particularmente la concentración de los polisacáridos (Rodríguez *et al.*, 2010) y por lo tanto, su efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano. Considerando que el estudio de Shilpakala *et al.*, (2009) fue realizado en la Universidad de Madras (India), pero que no se indica la proveniencia de las plantas utilizadas, el clima sí podría ser un factor importante a considerar. No obstante, en este estudio se utilizaron geles de plantas obtenidas de la Región de Coquimbo, y un gel comercial proveniente de los

Estados Unidos de América y, aun cuando ambos geles tenían distintos orígenes, no se observaron diferencias en el efecto antimicrobiano, definiéndose la misma CMI para ambos.

En relación a la capacidad de extraer y concentrar polisacáridos y compuestos fenólicos, moléculas responsables de la actividad antimicrobiana. Al respecto, Thiruppathi *et al.*, (2010), mediante el método de Kirby Bauer, analizaron diferentes solventes para extraerlos desde el liofilizado de hoja de *A. vera*, obteniendo mejores resultados inhibitorios cuando estos fueron extraídos con etanol. Shilpakala *et al.*, (2009) que estimaron la CMI de *E. coli* en 100 mg/mL, utilizaron como solvente tampón fosfato salino (pH 7,5), lo que también podría explicar que la CMI definida por ellos, haya sido superior a la obtenida en este trabajo, donde se utilizó como solvente metanol que, por sus características de polaridad, sería capaz de extraer una mayor cantidad de compuestos inhibitorios.

Existe escasa información de asociaciones de antimicrobianos con *A. vera* frente a *E. coli*, pero sí se han descrito asociaciones de *A. vera* con otras sustancias inhibitorias. Saavedra *et al.*, (2012) probaron *A. vera* con sulfato de cobre 1,5% sobre *E. coli*, logrando incrementar hasta cuatro veces el efecto antibacteriano de las sales de cobre en relación a una solución acuosa de las mismas. En este estudio, al evaluar el efecto antimicrobiano de la asociación de *A. vera* con Cefotiofur, en concentraciones menores a su CMI, no se logró una inhibición del crecimiento bacteriano $\geq 80\%$ con respecto al control sin inhibidor. Estos resultados podrían ser explicados por diferentes factores:

i) Asociar dos sustancias con actividad antimicrobiana que, por separado, son efectivas frente a una especie bacteriana, pero que asociadas no logran inhibir el crecimiento de la misma, orienta a la probabilidad de que uno de estos sea inactivado en la asociación. Es por esto que la interacción entre diferentes fármacos no puede ser inferida directamente a partir del mecanismo de acción de cada uno y debe entonces ser determinada empíricamente o a través de estudios “*in vitro*” que definan claramente esta interacción. Al respecto, Ankohmah *et al.*, (2009) señalaron que, particularmente en el caso de *E. coli*, la mayoría de las asociaciones estudiadas en su trabajo tuvieron interacciones difíciles de predecir a partir de los mecanismos de acción de sus componentes, ya que muchas veces los factores que modifican dichos mecanismos no están claramente

establecidos. Particularmente, en el caso del gel de *A. vera* la situación sería incluso más compleja ya que se menciona un efecto antimicrobiano complementario entre los compuestos fenólicos (antraquinonas) y polisacáridos (Saavedra *et al.*, 2012).

ii) Recientemente, Kuhlmann (2014), demostró que *A. vera* asociado a Ceftiofur presentó una inhibición del crecimiento de *S. aureus* $\geq 80\%$, resultados que permiten sugerir que la complejidad de la pared celular que presenta la bacteria en estudio sería un factor importante a considerar (Alemdar y Agaoglu, 2009). En este estudio, se utilizó una bacteria gram negativa, *E. coli*, mientras que Kuhlmann (2014) utilizó una bacteria gram positiva, *S. aureus*.

Debido a que no se observó un efecto inhibitorio $\geq 80\%$ de la asociación de Ceftiofur con *A. vera*, el crecimiento de las cepas de *E. coli* aisladas de vacas con mastitis clínica solo fue evaluado frente a la CMI previamente definida para el liofilizado de *A. vera*. Todas las cepas presentaron una inhibición del crecimiento $\geq 80\%$. A título complementario, es posible señalar que el 53,3% de las cepas fue resistente al menos a un antimicrobiano y un 20% a dos o más antimicrobianos. La sensibilidad de las cepas analizadas frente al gel de *A. vera* podría deberse al efecto conjunto de sus componentes, que actúan a través de diferentes mecanismos de acción, por lo que las bacterias no podrían generar resistencia frente a *A. vera* con la misma rapidez con que lo hacen frente a antimicrobianos sintéticos (Rodríguez *et al.*, 2010).

Debido a que *A. vera* asociado a Ceftiofur no presentó una inhibición $\geq 80\%$ del crecimiento *E. coli* se concluye que el gel de *A. vera* no permitió disminuir la concentración de Ceftiofur a un 25% de su CMI.

En base a estos resultados, se sugiere realizar estudios “*in vitro*” que permitan definir el tipo de interacción entre los componentes de una asociación y determinar los factores que disminuyen su eficacia frente al agente en estudio, ya que asociar dos compuestos con actividad antimicrobiana demostrada frente a un mismo agente no implica necesariamente que dicha característica se cumpla para la asociación.

Paralelamente, se puede concluir que *A. vera* podría ser una buena alternativa terapéutica frente a mastitis clínicas causadas por *E. coli*, como monoterapia.

BIBLIOGRAFÍA

- **ALEMDAR, S.; AGAOGLU, S.** 2009. Investigation of *In vitro* Antimicrobial Activity of *Aloe vera* Juice. *J Anim Vet Adv.* 8(1): 99-102.
- **ANKOHMAH, P.; JOHNSON, P.; LEVIN, B.** 2009. The Pharmacokinetics, Population and Evolutionary Dynamics of Multi-drug Therapy: Experiments with *S. aureus* and *E.coli* and Computer Simulations. *PLoS Pathog.* 9(4): 1-13.
- **BENGTSSON, B.; ERICSSON, H.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-ÖST, M.; PERSSON, K.** 2009. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Vet Microbiol.* 136(1-2): 142-149.
- **BOTREL, M.; HAENNI, M.; MORIGNAT, E.; SULPICE, P.; MADEC, J.; CALAVAS, D.** 2010. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. *Foodborne Pathog Dis.* 7(5): 479-487.
- **BOUDREAU, M.; BELAND, F.** 2006. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe Barbadensis* (Miller), Aloe Vera. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 24(1): 103-154.
- **CHANDER, Y.; OLIVEIRA, S.; GOYAL, S.** 2011. Characterization of Ceftiofur resistance in swine bacterial pathogens. *Vet J.* 187(1): 139–141.
- **CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.** 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; Approved standard- Third Edition. 3^a ed. Wayne, Pennsylvania, USA. 99 p. (CLSI document M31-A3).
- **CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.** 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement. Wayne, Pennsylvania, USA. 183 p. (NCCLS document M100-S22).
- **EBRAHIMI, A.; KHEIRABADI, K.; NIKOOKHAH, F.** 2007. Antimicrobial susceptibility of environmental bovine mastitis pathogens in west central Iran. *Pak Biol Sci.* 10(17):3014-3016.
- **EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY; ECDC, EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL.** 2012. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA J.* 10(3): 2598.
- **ERSKINE, R.; WALKER, R.; BOLIN, C.; BARTLETT, P.; WHITE, D.** 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J Dairy Sci.* 85(5):1111-1118.

- **FAO, ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN; OMS, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2009. Codex alimentarius. Producción de alimentos de origen animal. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Segunda Edición. 277 p.
- **FEMENIA, A.; GARCÍA-PASCUAL P.; SIMAL, S.; ROSSELLO, C.** 2003. Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. Carbohydr Polym. 51(4): 397-405.
- **HABEEB, F.; SHAKIR E.; BRADBURY, F.; CAMERON, P.; TARAVATI, M.; DRUMMOND, A.; GRAY, A.; FERRO, V.** 2007. Screening methods used to determine the anti-microbial properties of Aloe vera inner gel. Methods. 42(4): 315-320.
- **KALMUS, P.; AASMAE, B.; KARSSIN, A.; ORRO, T.; KASK, K.** 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. Acta Vet Scand. 53(4): 1-7.
- **KUHLMANN, F.** 2014. Evaluación del efecto antimicrobiano de *Aloe barbadensis* Miller asociado a ceftiofur o cloxacilina sobre cepas de *S. aureus*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 26 p.
- **NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.** 1999. Standard M26-A. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. 19(18). 29 p.
- **OIE. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL.** 2013. Código Sanitario para los Animales Terrestres. [en línea]. <<http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-terrestre/acceso-en-linea/>> [consulta: 01-04-2014]
- **POL, M.; RUEGG, P.** 2007. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. J Dairy Sci. 90(1): 262-273.
- **ROBERSON, J.** 2012. Treatment of clinical mastitis. Vet Clin Food Anim Pract. 28(2): 271–288.
- **RODRÍGUEZ, E.; DARIAS, J.; DÍAZ, C.** 2010. Aloe vera as a functional ingredient in foods. Crit Rev Food Sci Nutr. 50(4): 30-326.
- **SAAVEDRA, F.; LÓPEZ, B.; YREI, V.; GALLARDO, T.; ALE, N.; GORDILLO, G.** 2012. Actividad antibacteriana y fungicida de las antraquinonas de Aloe vera L. combinadas con cationes cobre, hierro, plata y bismuto. Cienc Invest. 15(1): 30-35.

- **SAN MARTÍN, B.; KRUZE, J.; MORALES, M.; AGÜERO, H.; LEÓN, B.; ESPINOZA, S.; IRAGÜEN, D.; PUGA, J.; BORIE, C.** 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V región, Región Metropolitana y X Región, Chile. Arch Med Vet. 34(2): 221-234.
- **SAN MARTÍN, B.; BRAVO, V.; BORIE, C.** 2005. Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. Arch Med Vet. 37(2): 117-123.
- **SHILPAKALA, S.; PRATHIBA, J; MALATHI, R.** 2009. Susceptibilities of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to *Aloe barbadensis*. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 13(6): 461-464.
- **SUMANO, H.; MATEOS, G.; BRUMBAUGH, G.** 1996. Bases farmacológicas del tratamiento de la mastitis bovina. Veterinaria México. 27(1): 63-82.
- **THIRUPPATHI, S.; RAMASUBRAMANIAN, V.; SIVAKUMAR, T.; THIRUMALAI, V.** 2010. Antimicrobial activity of *Aloe vera* (L.) Burm. f. against pathogenic microorganisms. J. Biosci. Res. 1(4): 251-258.
- **WILSON, D.; GROHN, Y.; BENNETT, G.; GONZÁLEZ, R.; SCHUKKEN, Y.; SPATZ, J.** 2008. Milk production change following clinical mastitis and reproductive performance compared among j5 vaccinated and control dairy cattle. J Dairy Sci. 91(10): 3869–3879.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

CERTIFICADO N° 4

El Comité de Bioseguridad ha revisado la postulación al 1^{er} Concurso de Ciencia Aplicada Fondef 2012, del proyecto "Desarrollo de Formulaciones Farmacéuticas en base a Aloe Vera y antimicrobianos de uso habitual en sistemas intensivos de producción animal, que permitan disminuir las dosis y los periodos de carencia de estos fármacos" a cargo de la Dra. Betty San Martín.

En el proyecto se trabajará con bacterias de origen animal, clasificadas dentro de los niveles 1-2 de bioseguridad (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Renibacterium salmoninarum*) con el fin de realizar estudios de efectos inhibitorios del Aloe Vera solo y asociado a otros antimicrobianos. Como medidas de bioseguridad, el proyecto estipula lo siguiente:

1. Todos los ensayos se realizarán en el laboratorio FARMAVET, que cuenta con la acreditación vigente ISO 17025 Of 2005.
2. Los aislamientos bacterianos a partir de Salmones se realizarán en una empresa externa acreditada según ISO 9001 Of 2008 y las cepas serán enviadas correctamente selladas y rotuladas hasta el laboratorio FARMAVET.
3. Los aislamientos a partir de leche bovina serán realizados en el laboratorio FARMAVET, considerando el uso de Gabinete de Bioseguridad, uso de desinfectantes y antisépticos (Cloro y Alcohol yodado), eliminación de materiales contaminados por autoclavado o por incineración según corresponda, uso de delantales y guantes desechables. La obtención de las muestras de leche será realizada por personal del proyecto entrenado.
4. La cuantificación de la inhibición del crecimiento bacteriano se realizará en el Laboratorio BIOVETEC bajo las normas estipuladas por el mismo.
5. Todos los desechos líquidos peligrosos serán eliminados por una empresa externa, mientras que los sólidos serán incinerados.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

Con relación a lo expuesto, este comité estima que el proyecto se ajusta convenientemente con las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas de Bioseguridad" editado por CONICYT versión 2008 y previenen el riesgo para las personas, los animales y el medio ambiente.


SANTIAGO URCELAY VICENTE
Decano y Presidente
Comité de Bioseguridad Animal



Santiago, mayo 28, 2012