
TEZA DE DOCTORAT

Impactul apifitoterapiei *in vitro* în modificarea profilului de antibioticorezistență la vaci cu mamite

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Doctorand **Giupană Radu Mihai**

Conducător de doctorat **Prof.univ. dr. Marina Spînu**



REZUMAT

Bolile la animalele lactante au un impact important asupra producțiilor, mastita fiind una dintre afecțiunile infecțioase cele mai comune la bovinele pentru lapte din întreaga lume, indiferent de sistemul de creștere, tipul sau dimensiunile acestuia. Din punct de vedere economic, mastita este una dintre cele mai păgubitoare afecțiuni, cu influență semnificativă asupra cantității și a calităților nutritive ale laptelui (OECD/FAO (2019), "OECD-FAO Agricultural Outlook", OECD Agriculture statistics (database), <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outl-data-en>).

Promovarea conștientizării importanței, a elementelor de identificare și terapeutice pot duce la creșterea importantă a producțiilor prin diminuarea pierderilor și costurilor excedentare. În mod curent, controlul mamitelor presupune utilizarea de antibiotice, crescând astfel îngrijorarea față de suprautilizarea acestor compuși. Similar, posibilitatea instalării rezistenței duce la diminuarea eficacității lor terapeutice și implică la augmentarea sintezei de noi compuși. Acest proces prezintă numeroase necunoscute, factorii de influență fiind extrem de numeroși (specia infectantă și rezistența intrinsecă a acesteia, schemele terapeutice folosite, poluarea mediului cu plasmide de rezistență, etc.).

Analiza morfologică și funcțională a bacteriomului susține evaluarea calității laptelui și aprecierea riscului cu care se confruntă consumatorii, fiind definit în special profilul de antibioticorezistență. Rezultatele servesc unui dublu scop, acela de a redefini terapiile aplicate la nivel de fermă în controlul mastitelor, iar al doilea acela de a preveni transmiterea antibioticorezistenței la consumatori. Asocierea unor rezultate legate de indicele MAR (rezistență multiplă la antibiotice) cu profilul imunologic al animalelor diagnosticate cu mamite poate direcționa protocolul terapeutic astfel încât să asigure simultan însănătoșirea animalului și creșterea calității laptelui pentru consum (Rindt, 2009a, b, 2011).

Metodele alternative pentru surmontarea dificultăților induse de rezistența la antibiotice au cunoscut o dezvoltare la scară largă în ultimele decenii. Între acestea se pot cita nanotehnologicele, terapia fagică, extractele vegetale (inclusiv uleiuri esențiale), proteine de origine animală (IgY) sau bacteriocine (Radzikowski și colab., 2020). Avantajul major al terapiilor alternative este reprezentat de lipsa fenomenului de rezistență în cazul acestor compuși terapeutici utilizați, în plus față de rezultatele obținute *in vitro* și *in vivo* care relevă eficacitatea prin inhibarea cu succes a creșterii/distrugerii bacteriilor provenite de la vaci cu mamite. Procesul de intensificare a creșterii în ferme, deosebit de complex și aliniat noțiunii "mai mult cu mai puțin" a avut și are efecte inegale asupra interfeței matricilor om/ animal / mediu. La ora actuală, în contextual dezvoltării socio-culturale centrate pe conceptul "One Health, One Welfare" există o campanie pentru creșterea nivelului de conștientizare a impactului negativ al intensivizării de tip industrial în exploatarea animalelor asupra mediului (Del Prado și colab., 2013), bunăstării animalelor (Koeck și colab., 2014), dezvoltării rurale echitabile și nu în ultimul rind, asupra sănătății omului. Rezultanta unei asemenea campanii este una benefică, aceea de a intensifica eforturile pentru proiectarea unor sisteme juste și sustenabile de creștere a animalelor pentru lapte și nu numai (Jay, 2006).

Mastita reprezintă una dintre bolile bacteriene cele mai frecvente în majoritatea fermelor de vaci pentru lapte, indiferent de sistemul de creștere, constituind totodată una dintre afecțiunile majore tratabile prin utilizarea antibioticelor. Utilizarea largă a antibioticelor în controlul mamitelor crește foarte mult riscul de instalare și transmitere a

antibiotice rezistenței la consumatori. O astfel de posibilitate este permanent în atenția autorităților din domeniul sănătății animalelor și sănătății publice, necesitând redefinirea fundamentată științific a terapiilor cu antibiotice ținându-se cont de intersectarea bunăstării animalelor cu preocupările sociale (Ruegg, 2009, 2017; Stevens și colab., 2016a și b).

Plantele medicinale reprezintă o sursă istoric consolidată de agenți terapeutici naturali, cu biodisponibilitate crescută. Plantele conțin agenți cu efect antibacterian și utilitate ca antibiotice inovative, inhibitori de pompa de eflux, componente anti-factori de virulență sau chiar utile în combinație cu medicamente de sinteză (Mushtaq și colab., 2018).

Bioprospectarea reprezintă o ramură a științei prin care sunt identificate noi surse de produse naturale (microorganisme, plante, fungi, animale) cu utilitate farmaceutică sau aplicații în biologie. Peste 80% din substanțele medicamentoase actuale provin din produse naturale, ocupând în continuare un rol important în terapie (Ashforth et al., 2010).

Cercetarea efectuată s-a axat pe patru direcții prioritare, urmărind:

- Investigatii etiologice, incluzând definirea profilului de antibiotice rezistență la bovine (vacii și bivolițe) cu mastite clinice și subclinice,
- Modificări ale profilului imunologic la animale cu mamite clinice și subclinice, în relație cu acțiunea patogenă a microbiomului izolat,
- Identificarea factorilor de influență ai profilului de antibiotice rezistență în cazul bacteriilor izolate de la animale cu mastită,
- Identificarea unor plante cu potențial antibacterian, biodisponibilitate crescută, și evaluarea efectelor *in vitro* ale acestor extracte.

Prima parte a tezei este structurată în trei capitole, însumând datele actuale din literatura de specialitate privind potențialul terapeutic și efectele biologice ale unor plante medicinale, în special din familia *Lamiaceae* și utilitatea lor în terapie la animale (capitolul 1), etiologia complexă a mastitelor la bovine și factorii de patogenitate ai diferitelor genuri bacteriene care constituie microbiomul patogen în aceste cazuri (capitolul 2) și trece în revistă pe scurt mecanismele de instalare și importanța fenomenului de antibiotice rezistență în cadrul conceptului "One Health" (capitolul 3).

Ca o introducere la partea a doua a tezei care include rezultatele studiilor proprii efectuate, sunt prezentate scopurile urmărite, iar mai apoi zece studii originale, structurate în patru capitole, axate pe investigarea structurii și patogenității microbiomului în mastite la vacii (capitolul 4, subcapitolele 4.1-4.3), pe definirea mecanismelor imune de rezistență față de microbiomul izolat la vacii cu mastită (capitolul 5, subcapitolele 5.1-5.2), caracterizarea unor potențiali factori de influență asupra microbiomului bacterian mastitic și a variațiilor de patogenitate ale acestuia (capitolul 6, subcapitolele 6.1-6.2) și pe evaluarea potențialului terapeutic alternativ al unor extracte vegetale selectate (capitolul 7, subcapitolele 7.1-7.3). Corolarul cercetării efectuate este prezentat în Concluziile generale ale tezei.

În subcapitolul 4.1, au fost investigate diferențele de prevalență și etiologice a mamitelor subclinice la vacii și bivolițe din Transilvania, România. Prevalența mastitei clinice la bivoli și vacii este considerată similară în literatura de specialitate cuprinsă între 8 și 40%, respectiv 19,9% până la 44,8%. Procentul este extrem de variabil în funcție de regiune și de tehnologia de creștere. Cu toate acestea, nu se știe prea mult despre agenții etiologici în mastita subclinică la bubalinele din România. Scopul studiului a fost evaluarea comparativă a prevalenței și etiologiei mastitei la vacii și bivolițe din Transilvania, fiind totodată testat profilul de sensibilitate la substanțele antimicrobiene al microorganismelor izolate din probele de lapte. Cercetarea a fost efectuată pe un grup de bivoli ($n = 108$) și un grup de vacii Bălțată Românească și red Holstein ($n = 211$), la care diagnosticul de mastită a fost stabilit

prin examinare clinică susținută de efectuarea R. Mastitest. Ulterior, au fost colectate 56 de probe de lapte de la bivoli și 28 de probe de lapte de la vaci, probe supuse examinării bacteriologice de rutină. Pentru cultivarea bacteriilor din probele de lapte s-au utilizat metode microbiologice clasice și s-a efectuat tehnica de difuzie Kirby-Bauer pentru a evalua sensibilitatea/rezistența la antibiotice utilizate frecvent pentru tratarea bolii, cum ar fi ampicilina, amoxicilina, enrofloxacină, cloxacilina și oxitetraciclină. Stafilococi rezistenți sau foarte rezistenți la antibiotice au fost întâlniți în aproape toate probele de lapte mastitic de vacă (90%) comparativ cu cel de bivoliță, în cel mai mare procent (71,42%), a fost prezent *Streptococcus spp.* Rezultatele au indicat faptul că utilizarea frecventă și necontrolată a antibioticelor împotriva mastitei sau a altor boli concurente atât de bivoli cât și de vacile pentru lapte induc dezvoltarea unei rezistențe multiple sau totale la antibiotice. Cea mai mare sensibilitate globală pentru tulpinile izolate a fost înregistrată la ambele specii față de amoxicilină.

Subcapitolul 4.2., prezintă avantajele estimării prin metode automatizate a diferențelor în profilul bacteriomului și precizează date legate de comportamentul antimicrobian al acestuia la vaci pentru lapte, diferențiate prin sistemul de creștere, considerat ca fiind unul dintre factorii de influență în inducerea antibiotic-rezistenței. Acest studiu și-a propus să compare, folosind metode automatizate, profilul de sensibilitate/rezistență la antibiotice al microbiomului izolat de la vacile lapte crescute în sistem intensiv respective extensiv. Cercetarea a fost realizată în câte o fermă din fiecare tip tehnologic, pe vaci pentru lapte din rasele Holstein și Brună de Maramureș. Un total de 122 de probe de lapte colectate de la animalele mastitice au fost prelucrate prin tehnici microbiologice clasice și, de asemenea, prin utilizarea aparatelor WalkAway și Sensititre OptiRead, care au facilitat identificarea tulpinilor microbiene și a profilul lor de rezistență la antibiotice. Culturile izolate au fost testate de cele două sisteme folosind amoxicilină și acid clavulanic, Sulbactam, ampicilină, cefazolin, cefalotină, clindamicină, gentamicină, oxacilină, penicilină, rifampin, tetraciclină, trimetoprim/sulfa, vancomicina și cefepina.

Au fost izolate prin utilizarea aparatului WalkAway tulpini de *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. wernerii*, *S. schleiferi*, *S. auricularis*, *Micrococcus spp.* În cazul *Staphylococcus spp.*, rezistența a fost mult crescută, fiind constatată doar eficiența unor antibiotice (gentamicină, rifampină) împotriva tuturor tulpinilor. Rezistența totală a fost observată în procent de 33,33%. Fiind betalactamază pozitive, toate tulpinile au fost rezistente la penicilină, similar datelor prezente în literatura de specialitate. Probele de lapte testate de Sensititre OptiRead au depistat 48 de tulpini (34 G + respectiv 18 G -). Varietatea de tulpini a fost mai mică decât în ferma care aplică tehnologia de creștere intensivă, incluzând: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* și *Streptococcus uberis*. Datele au indicat participarea CNS la etiologia mastitei. Deși mecanismele unora dintre ele sunt puțin cunoscute, profilul de rezistență la antibiotice ar putea susține patogenitatea lor sporită. Diferențele dintre microbiomul din cele două ferme au fost ușoare, unele G- fiind prezente în fermele extensive, dar o varietate mai mică de stafilococi coagulazo-negativi. Modelul de rezistență la antibiotice înregistrat în această fermă a fost similar, ceea ce sugerează un schimb de gene de rezistență la diferite niveluri, inclusiv habitat.

Așa cum s-a arătat, una dintre cele mai severe patologii înregistrate la vacile lactante este reprezentată de mastită, din cauza pierderii capacității productive a ugerului, modificărilor grave ale stării de sănătate și a impactului economic al bolii, și de asemenea, de apariția tulpinilor rezistente la antibiotic (subcapitolul 4.3., Patogenitatea crescută a tulpinilor de *Staphylococcus spp.* antibioticorezistente izolate de la vaci cu mastite). Au fost utilizate probe de lapte de la

vacile în lactație Holstein (n = 20) crescute în sistem intensive, prelucrate prin metode microbiologice clasice, cu identificare ulterioară a tulpinilor izolate pe bulion și agar prin aplicarea testelor API 20 STREP, API STAPH, API 20 E. Testele de sensibilitate antimicrobiene *in vitro* au fost efectuate pe flora totală și, de asemenea, pe tulpini izolate, folosind oxitettraciclină, neomicină/bacitracină/ tetraciclină, marbofloxacină, ampicilină, amoxicilină/acid clavulanic, gentamicină, enrofloxacină și Tetra-delta, un medicament classic utilizat în tratarea mastitelor la vaci. Potențialului toxigen al tulpinilor de *Staphylococcus spp.* Isolate s-a estimat prin metode moleculare (PCR). Rezultatele au susținut prezența unui microbiom variabil, care implică bacterii multirezistente la antibiotice. Lipsa eficacității *in vitro* a fost observată în cazul mai multor antibiotice utilizate frecvent pentru terapia mastitei (ampicilină, oxitettraciclină). Potențialul patogen ridicat al tulpinilor de *Staphylococcus spp.* izolate a fost definit nu doar de rezistența antimicrobiană ci și de prezența genelor *seb* și *nuc* care codifică toxine, la 28,57% din tulpinile izolate.

Intervenția sistemului imun în condiționarea evoluției și stabilirea prognosticului mastitei la vacile prezintă o importanță deosebită. În acest context, capitolul 5. Profilul imunologic la vaci cu mastite, s-a axat pe monitorizarea modificărilor survenite la nivelul efectorilor nespecfici la animale cu mastite subclinice în ani consecutivi. În subcapitolul 5.1. Cuantificarea mediatorilor nespecfici ai sistemului imun într-o populație de vaci pentru lapte diagnosticate cu mastite subclinice, cercetările au urmărit să monitorizeze modificările imunității sistemice nespecifice umorale și mediate celular la animale din rasele Bălțată Românească și Holstein cu vârste cuprinse între 3 și 8 ani, diagnosticate cu mastită subclinică. În acest scop, au fost utilizate tehnici de precipitare pentru cuantificarea complexelor imune circulante și a nivelelor de imunoglobuline totale din lactoser. Mai mult, raportul neutrofile/limfocite a fost utilizat pentru a estima nivelul de stres la animalele bolnave iar testul de includere a particulelor de carbon pentru a monitoriza fagocitoza.

Studiul a relevat valori mai mici ale complexelor imune circulante în lactoserul vacilor mastitice ($0,002 \pm 0,010$ unități de densitate optică, UDO) în comparație cu cele sănătoase ($0,004 \pm 0,027$ ODU), în timp ce nivelurile totale de imunoglobuline au fost inversate ($0,36 \pm 0,13$ și respectiv $0,29 \pm 0,13$ UDO). Valorile indicelui de stres (N/L) și fagocitoza au fost semnificativ mai mari la animalele mastitice în comparație cu cele sănătoase (N/L $1,24 \pm 0,69$ și $0,48 \pm 0,15$, $p < 0,05$ și activitatea fagocitară $1,78 \pm 0,21$ și $0,44 \pm 0,23$, $p < 0,01$). Rezultatele au indicat un clearance mai mare al complexelor imune, niveluri mai mari de stres și fagocitoză la vaci cu mastită subclinică crescute în sistem intensiv, ceea ce sugerează o implicare puternică a imunității sistemice nespecifice umorale și mediate celular în ciuda cursului subclinic al bolii.

Etiologia bacteriană a mastitei își exercită impactul atât asupra efectorilor imunitari locali, cât și ai sistemului, astfel starea imunitară a animalelor poate ajuta la prezicerea rezultatului bolii (Giupana și colab., 2015, subcap. 5.2). În anul următor, testările similare (subcapitolul 5.2. Modificări ale imunității nespecifice la bovine cu mastită subclinică), au urmărit să monitorizeze modificările imunității sistemice nespecifice și a imunității mediate celular la bovine metiși pentru lapte, diagnosticate anterior cu mastită subclinică (n = 10), în comparație cu un grup sănătos (n = 9). Bovinele au provenit din gospodării particulare situate în NV Transilvaniei. Probele de lapte și sânge au fost colectate de la fiecare animal și testate în continuare prin utilizarea tehnicilor de precipitare cu $ZnSO_4$, pentru a cuantifica nivelul total al imunoglobulinelor din ser și testul de includere a particulelor de carbon pentru a monitoriza activitatea fagocitară sistemică. Studiul a relevat că nu există diferențe semnificative statistic între nivelul imunoglobulinelor totale prezentă în serul bovinelor

diagnosticate cu mastită subclinică ($0,31 \pm 0,079$ unități de densitate optică, ODU) în comparație cu cele sănătoase ($0,26 \pm 0,088$ ODU). Valorile fagocitozei au fost semnificativ mai mari ($p < 0,01$) la animalele mastitice ($2,24 \pm 0,92$ ODU) față de animalele sănătoase ($4,33 \pm 0,71$), acestea relevând prevalența crescută a imunității nespecifice mediate celular față de cea umorală sistemică la animalele pentru lapte din această categorie.

În încercarea de a defini factorii de influență ai profilului de antibioticorezistență în cazul bacteriomului izolat de la animale cu mastită, s-au efectuat experimente care au inclus experimente referitoare la influența pH-ului habitat bacterian asupra antibioticorezistenței (subcapitolul 6.1. Influența potențială a modificărilor de pH asupra profilului de antibioticorezistență bacteriomului la vaci pentru lapte) precum și evaluarea influenței solventului utilizat în extracția principiilor active din plante în condiționarea antibioticorezistenței (6.2. Natura extractului ca factor de influență asupra efectelor *Melissa officinalis* L. asupra microbiomului din lapte la vaci cu mastită subclinică).

Mastita, în principal infecții localizate, dar uneori generalizate, care apar la animale în lactație sunt inițiate de microfloră bacteriană în asociere cu factori chimici și fizici. Pentru a elucida intervenția unor factori conecși și modul în care intervenția acestora influențează antibioticorezistența, s-au efectuat cercetări pe vaci pentru lapte crescute în sistem semi-intensiv, cu vârsta cuprinsă între trei și cinci ani, care au prezentat mamită clinică sau subclinică diagnosticată prin testul California Mastitis Test și numărarea a celulelor somatice. Probele de lapte au fost colectate înainte de mulsul de dimineață în recipiente sterile și prelucrate prin metode microbiologice clasice: cultivarea pe medii uzuale și selective, realizând testarea sensibilității/rezistenței la antibiotice prin metoda Kirby-Bauer, implicând ampicilina, enrofloxacină, gentamicina, oxitetraciclina, ciprofloxacină, acidul clavulanic, amoxicilina și produsul comercial Tetra delta® (novobiocină, neomicină, procaină penicilină, dihidrostreptomycină, prednisolon). Pentru a estima modificările potențiale ale sensibilității la antibiotice induse de modificări în pH-ul mediului, metoda Kirby-Bauer a fost repetată pe bacterii izolate după expunerea lor prealabilă la pH acid (4-6,5) sau alcalin (7,8-8,2). Bacteriile dominante (*Enterococcus* - 45% și *Staphylococcus* - 55%), au fost sensibile la ciprofloxacină și parțial sau total rezistent la alte antibiotice. Atât pH-ul alcalin (8,0) cât și cel acid (5,0) s-a dovedit a fi utili, crescând sensibilitatea la ciprofloxacină pentru toate izolatele. Comportamentul bacteriilor în prezența antibioticelor a fost extrem de variabil după expunerea prealabilă la diferite valori de pH, variind de la sensibilitate scăzută la rezistență totală. Astfel, s-a concluzionat că schimbarea pH-ului ar putea fi de ajutor în tratarea mastitei la vacile pentru lapte, în asociere cu antibioticele adecvate.

Într-un alt studiu (subcap. 6.2) a fost evaluată influența solventului de extracție asupra eficacității antimicrobiană a extractului de *Melissa officinalis* L. asupra microbiomului de la vaci pentru lapte, suferind de mastită subclinică. Probele de lapte și sânge au fost recoltate de la vaci lactante în perioada de vârf a lactației. Raporturile N/L (colorație Panoptică) au fost calculate ca indicatori ai nivelului de stres. Componentele microbiomului au fost identificate prin utilizarea metodelor bacteriologice clasice și cultivarea în prezența extractului alcoolic și a uleiului esențial de *M. Officinalis* (Metoda Kirby-Bauer). Programul Minitab 16.0 a fost utilizat pentru interpretarea statistică a datelor; semnificația diferențelor dintre grupuri a fost interpretată prin testul Student. Raporturile N/L au indicat o creștere semnificativă a stresului ($p < 0,01$) la animalele afectate subclinic ($1,24 \pm 0,69$) în comparație cu cele sănătoase ($0,56 \pm 0,12$). Extractul alcoolic *M. officinalis* a fost mai puțin eficient decât uleiul esențial (zona de inhibare a $11,3 \pm 3,6$ mm versus $12,3 \pm 4,3$ mm), dar acest effect a fost comparabil cu cel al amoxicilinei, amoxicilinei/ acidului clavulanic și crescută față de cea a

cefoperazonei (rezistență totală). În mod similar, în izolatele din lapte sănătos, efectele au fost mai pronunțat pentru uleiul esențial decât pentru tinctură ($18,67 \pm 7,0$ mm față de $13,0 \pm 8,2$ mm) și mai mare decât în cefoperazone ($15,67 \pm 3,2$ mm). Rezultatele au sugerat că utilizarea terapeutică a uleiului esențial de *M. officinalis* s-ar putea dovedi a fi mai eficientă decât a extractului alcoolic împotriva bacteriului din laptele mastitic, efectul fiind mai degrabă dependent de specia bacteriană decât de metoda de extracție.

Întrucât mastita bovină este o boală cu impact economic a animalelor lactante la nivel mondial, majoritatea investigațiilor s-au concentrat pe definirea indicatorilor epidemiologici și, de asemenea, măsuri de control. Ca parte a programelor de control, cele mai populare măsuri terapeutice în mastita clinică și subclinică la bovinele lactante este tratamentul cu antibiotice, din ce în ce mai puțin eficient sub presiunea creșterii rezistenței la antibiotice a bacteriilor inductoare.

În capitolul 7, Evaluarea potențialului terapeutic alternativ al unor extracte vegetale selectate sunt trecute în revistă rezultatele obținute prin investigarea activității unor extracte vegetale asupra bacteriilor izolate de la vaci cu mastite subclinice, fiind evaluate biodisponibilitatea componentelor active comparative cu cea a antibioticelor cu utilizare maximă în aceste infecții.

Subcapitolul 7.1. Identificarea extractelor de plante ca potențială alternativă terapeutică pentru vaci diagnosticate cu mastită subclinică, descrie investigațiile legate de definirea potențialului terapeutic imunostimulator al extractelor din plante precum *Calendula officinalis*, *Echinacea angustifolia*, *E. purpurea*, *Hippophae rhamnoides*, *Urtica dioica*, *Allium sativum*, *Salvia officinalis*, *Mentha piperita* ce cresc pe majoritatea pășunilor românești. Cercetarea a fost realizată pe un grup de 27 de vaci lactante, împărțite în două grupuri, sănătoase ($n = 10$) și diagnosticate cu mastită subclinică ($n = 17$). Probele de sânge colectate prin punctii venei jugulare au fost diluate cu RPMI 1640 (1: 4) și distribuite în plăci cu 96 de godeuri. Variantele de lucru, incluzând probe netratate (martor) tratate cu mitogene clasice (PHA, LPS - $1\mu\text{l/godeu}$) și extracte alcoolice din plantele deja menționate ($1.5\mu\text{l/godeu}$) au fost efectuate în duplicat. Concentrațiile glucozei reziduale au fost măsurate cu ajutorul unui test colorimetric orto-toluidin și pe baza valorilor citite spectrophotometric (SUMAL PE2, Carl Zeiss, Jena) au au fost calculați indici de stimulare (IS%). IS pentru blastizarea spontană au fost mai mici la grupul cu mastită subclinică ($48,03 + 10,23\%$) decât în lotul animalelor sănătoase ($53,44 + 9,34\%$). Nu s-au înregistrat creșteri ale IS la vacile mastitice sub influența extractelor de plante, care au acționat inhibând (valori ale IS% cuprinse între $17,54 + 13,97$ la $39,90 + 7,89$, dependent de variantă), comparativ cu IS spontan ($48,03 + 10,23\%$) și indus de alcool, martorul solvent (IS% $40,06 + 8,57$) și respective efectele obținute la animalele sănătoase (extract de usturoi IS% $56,71 + 12,91$, IS% salvie $58,26 + 12,31$, IS% mentă $54,60 + 15,97$). Rezultatele au indicat că extractele de plante utilizate în conformitate cu protocolul descris nu au reușit să restabilească răspunsul imun mediat celular *in vitro* la vacile cu mastită, ceea ce sugerează continuarea cercetării pentru a stabili doza adecvată pentru aceste extracte sau identificarea altora cu potențial bioactiv mai pronunțat.

Thymus marschallianus Willd. este o specie *Lamiaceae* răspândită într-o mare varietate de habitate la nivel mondial. Scopul cercetării prezentate în capitolul 7.2 (Profilul fitochimic și potențialul antibacterian al extractelor obținute din *Thymus marschallianus* Willd) a fost analiza a două eșantioane diferite din această specie, una obținută din flora spontană și una din cultură. A fost efectuată caracterizarea spectrofotometrică a nivelului de polifenoli totali, flavonoide și a conținutului de acid fenolic. Analiza calitativă și cantitativă a polifenolilor a fost realizată printr-o metodă HPLC-DAD-ESI (+) - MS. Pentru testul

antibacterian s-au utilizat, și metodele de microdiluție în bulion. Analiza a evidențiat prezența polifenolilor pentru ambele probe precum și prezența flavonoidelor de tipul luteolinei, quercetinei, apigeninei și derivaților lor, dar și a acidului rosmarinic și a metil-rosmarinatului. Au fost sesizate diferențe accentuate între cele două variante, sălbatică și cultivată, cu privire la cantitatea acestor compuși. S-au găsit cantități semnificativ mai mari de flavonoide pentru proba recoltată în flora spontană, în timp ce pentru acidul rosmarinic, au fost cantități mai mari găsite pentru proba de cultură. Ambele probe au arătat o activitate antibacteriană promițătoare, în special asupra bacteriilor Gram pozitive. *T. marschallianus* reprezintă, așadar, o sursă bogată de compuși polifenolici care dovedesc potențialul său promițător ca specie medicinală. Studiul este primul raport despre prezența compușilor polifenolici și despre activitatea antimicrobiană a acestora și, în același timp, este primul studiu care oferă comparația între două tipuri de probe de *T. marschallianus*, recoltate din cultură și din flora spontană, în contextul în care nu există studii raportate asupra compoziției polifenolice a speciei *T. marschallianus* și a acțiunilor sale biologice.

Ultimul subcapitol al studiului (7.3. Cercetări comparative asupra utilizării antibioticoterapiei clasice și terapiilor alternative în mastita bovinelor) a fost dedicată evaluării comparative a efectelor terapiilor alternative (apiproduselor) și antibioticelor uzuale asupra microbiomului mastitic. Având în vedere rezistența crescută la antibiotice a tulpinilor bacteriene implicate, această cercetare a urmărit să evalueze eficacitatea terapiei alternative cu miere și propolis în tratarea mastitei la bovine. Cercetarea a fost realizată pe un grup de 28 de animale, cu vârste cuprinse între 3 și 11 ani, din rase Bălțată Românească și Holstein Roșu. Cercetările au vizat izolarea și identificarea bacteriilor implicate în cazuri de mastită clinică la vaci, evaluarea sensibilității/rezistenței acestora la antibioticele utilizate frecvent, precum și evaluarea eficacității mierii și propolisului asupra bacteriilor izolate din cazurile de mastită la vaci crescute în sistem intensiv. Principalele metode utilizate au fost cultivarea prin metode clasice și testul Kirby-Bauer. Din majoritatea probelor de lapte au fost izolați stafilococi rezistenți sau foarte rezistenți la antibiotice. Studiul comparativ privind utilizarea diferitelor concentrații de tinctură de propolis a arătat eficacitate maximă pentru concentrația de 20%, cu efecte descrescătoare pentru concentrații mai mari, ceea ce a negat ipoteza conform căreia concentrațiile crescute produc efect crescut. Eficacitatea mierii a depins de concentrație și tulpină bacteriană, individualizarea schemelor terapeutice fiind absolut necesară. Rezultatele au indicat că utilizarea frecventă și necontrolată a antibioticelor împotriva mastitei a dus la dezvoltarea unei rezistențe multiple sau totale la antibiotice, astfel mierea și propolisul au reprezentat alternative terapeutice valoroase, în special în cazul stafilococului. Rezultatele obținute sunt încurajatoare, în principal pentru utilizarea clinică a propolisului în terapie singur sau în combinație cu antibiotice, după standardizarea metodei prin studii *in vivo* și găsirea unei soluții pentru diminuarea efectelor iritative ale tincturii de propolis.

BIBLIOGRAFIE SELECTATĂ

1. DEL PRADO, A., MAS, K. PARDO G., GALLEJONES P.. 2013. Modelling the interactions between C and N farm balances and GHG emissions from confinement dairy farms in northern Spain. *Science of the Total Environment* 465: 156–165.
2. JAY, M. 2006. The political economy of a productivist agriculture: New Zealand dairy discourses. *Food Policy* 32: 266–279.
3. KOECK, A., LOKER S., MIGLIOR F., KELTON D.F., JAMROZIK J., SCHENKEL F.S.. 2014. Genetic relationships of clinical mastitis, cystic ovaries, and lameness with milk yield and somatic cell score in first-lactation Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science* 97: 5806–5813.
4. RADZIKOWSKI, D., KALIŃSKA, A., OSTASZEWSKA, U., GOŁĘBIEWSKI, M., 2020. Alternative solutions to antibiotics in mastitis treatment for dairy cows - a review. *Animal Science Papers and Reports* vol. 38 no. 2, 117-133.
5. RINDT, I.K., 2011. Evaluarea calitatilor terapeutice si imunostimulatoare ale unor produse apicole, Teza de doctorat, Facultatea de Medicina Veterinara Cluj Napoca.
6. RINDT, I.K., SPÎNU, M., NICULAE, M., 2009. The Immunomodulatory Effect Of Propolis: A Review, *Lucrări științifice Medicină veterinară Timișoara*, vol. XLII(1), p. 346-349.
7. RINDT, J.K., SPÎNU, M., BRUDAȘCĂ, GH.F., NICULAE, M., SZAKACS, B., KISS, T., URICARU, A., BIANU, G.T., 2009a. Antibacterial Activity of Honey, Honeydew Honey and Propolis From Different Regions of Transilvania Against *Staphylococcus Aureus*, *Lucrări științifice Medicină veterinară Iasi*, vol. 52(11), p. 1093- 1095.
8. RINDT, J.K., SPÎNU, M., ȘANDRU, C.D., BRUDAȘCĂ, GH.F., NICULAE, M., KOBOLKUTI, L.B., CADAR, D., URICARU, A., KISS, T., UNGVARI, N.A., LASLO, L., MIHAI C.M., 2009b. Propolis, from different origin and composition, antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* stains isolated from bovine mastitis, *Proceedings of the 16th Scientific Conference with International Participation Animal Protection and Welfare Brno, Czech Republic*, partea B, p. 210-212.
9. OECD/FAO (2019), "OECD-FAO Agricultural Outlook", OECD Agriculture statistics (database), <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outl-data-en>
10. RUEGG, P.L. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention, *J. Dairy Sci.* 100:10381–10397
11. RUEGG, P.L., 2009. Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. *J Anim Sci*, 87:43-55.
12. STEVENS, M., PIEPERS, S., DE VliegHER, S., 2016a. Mastitis prevention and control practices and mastitis treatment strategies associated with the consumption of (critically important) antimicrobials on dairy herds in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 2896–2903.
13. STEVENS, M., S. PIEPERS, K. SUPRE, J. DEWULF, AND S. DE VliegHER. 2016b. Quantification of antimicrobial consumption in adult cattle on dairy herds in Flanders, Belgium, and associations with udder health, milk quality, and production performance. *J. Dairy Sci.* 99:2118–2130.
14. ASHFORTH E. J., FU C., LIU X., DAI H., SONG F., GUOAC H., ZHANG L. 2010, Bioprospecting for antituberculosis leads from microbial me-tabolites, *Nat. Prod. Rep.* 27, 1709–1719
15. MUSHTAQ, S., SHAH A. M., SHAH A., LONE S. A., HUSSAIN A., HASSAN Q.P., ALIB N. M., 2018, Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure, *Microbial Pathogenesis* 114 357–361
16. Giupană, R. M.; Paștiu, A. I.; Niculae, M.; Pall, E.; Șandru, C. D.; Cerbu, C. Gh.; Guranda, S.; Herman, V.; Spînu, M. Quantification of nonspecific immune system mediators in a population of dairy cows previously diagnosed with subclinical mastitis. *Lucrari Stiintifice - Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara* 2015 Vol. 48 No. 2 pp. 114-120, 1221-5295