
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Evaluarea *in vitro* și *in vivo* a proprietăților probiotice ale bacteriilor din genul *Bacillus*

Doctorand

Maria-Cătălina Matei (Matei-Lațiu)

Conducător de doctorat

**Prof. univ. dr. Laura Cristina
Ștefănuț**



INTRODUCERE

Probioticele sunt considerate microorganisme vii care, administrare în cantități adecvate, sunt capabile să producă efecte benefice gazdei. În prezent, din cauza rezistenței la antibiotice, atenția a fost îndreptată către administrarea probioticelor, ca terapie alternativă în tratamentul patologiilor gastro-intestinale. Sănătatea intestinală este în directă legătură cu homeostazia populațiilor microbiene rezidente la acest nivel, populații care alcătuiesc microbiomul intestinal. În momentul în care apare un dezechilibru la acest nivel pot fi prezente și simptome cu caracter general care vor influența absorbția nutrienților, digestia hranei, vor provoca sindroame inflamatorii locale și sistemice care vor afecta organismul ca ansamblu. Starea de dezechilibru a microbiomului intestinal este cunoscută sub numele de dismicrobism. Mai mult decât atât, această stare atrage după sine o altă patologie și anume endotoxemia metabolică sistemică. În acest context, probioticele pot fi utilizate în scop terapeutic, fiind capabile să moduleze compoziția microbiană intestinală, producând ca rezultat diminuarea stării de dismicrobism și, implicit, îmbunătățirea stării de sănătate generală a gazdei. Din acest motiv, utilizarea lor pe scară largă este din ce în ce mai populară. Administrarea probioticelor este folosită și cu scop preventiv, una din cele mai frecvente situații fiind tratamentul cu antibiotice. Utilizarea antibioticelor în diferite patologii produce, în cele mai multe cazuri, și un dismicrobism secundar. Din acest motiv, administrarea probioticelor concomitent cu antibioterapia poate reduce gradul de dismicrobism, având un efect general benefic pentru gazdă.

IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Scopul lucrării de față se regăsește în totalitate în titlul acesteia: **“Evaluarea *in vitro* și *in vivo* a proprietăților probiotice ale bacteriilor din genul *Bacillus*”**. Formulele probiotice pe bază de bacterii sporulate prezintă rezistență mai ridicată la condițiile tractului gastro-intestinal (SCHMITZ și SUCHODOLSKI, 2016). În prezent, spre deosebire de medicina umană, probioticele utilizate frecvent în medicina veterinară nu includ în compoziția lor și bacterii sporulate, precum cele din genul *Bacillus*. Din acest motiv, datele științifice legate de potențialul probiotic al acestor bacterii pentru animale sunt puține.

Obiectivul general al tezei:

- ✓ Demonstrarea efectului probiotic pentru animale al bacteriilor din genul *Bacillus*

Pentru atingerea obiectivului general formulat, cercetarea a fost divizată în 3 studii individuale, fiecare dintre acestea reprezentând un **obiectiv specific** al cercetării:

- ✓ Evaluarea *in vitro* a rezistenței sporilor de bacili prin simularea condițiilor tractului gastro-intestinal canin:
 - Adaptarea unui protocol de digestie artificială pentru simularea condițiilor tractului gastro-intestinal canin;
 - Determinarea tolerabilității formulelor probiotice la condițiile simulate ale tractului gastro-intestinal;
 - Determinarea capacității antibacteriene a diferitelor formule probiotice testate;
- ✓ Analiza *in vivo* a capacității probiotice a sporilor de bacili în contextul disbiozei intestinale, utilizând modelul murin:
 - Evaluarea efectelor probiotice pe bază de bacili la șobolani sănătoși și șobolani cu dismicrobism;
 - Evaluarea impactului asupra ratei de conversie a hranei a probiotice și antibiotice;
 - Evaluarea prin tehnici histologice și imunohistochimice a capacității probiotice pe bază de bacili de a diminua efectele dismicrobismului indus de antibiotice;
- ✓ Evaluarea clinică a potențialului probiotic a sporilor de bacili în contextul disbiozei și endotoxemiei post-prandiale la câine:
 - Evaluarea clinică și paraclinică a subiecților incluși în studiu;
 - Determinarea valorilor și modelului de evoluție a endotoxemiei post-prandiale la câini clinic sănătoși;
 - Determinarea valorilor și modelului de evoluție a endotoxemiei post-prandiale la câini cu semne de disbioză intestinală aparentă;
 - Determinarea corelațiilor dintre prezența endotoxemiei naturale post-prandiale și markerii inflamației la nivel intestinal la câini cu semne de disbioză intestinală aparentă;
 - Analiza scorului fecalelor pe parcursul celor 30 de zile de tratament;
 - Evaluarea coeficientului digestibilității aparente înainte și după cele 30 de zile de tratament.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat intitulată "Evaluarea *in vitro* și *in vivo* a proprietăților probiotice ale bacteriilor din genul *Bacillus*" cuprinde 33 de figuri, 34 de tabele și este structurată conform normelor de tehnoredactare în două părți: **Partea I – Stadiul actual al cunoașterii și Partea a II-a – Contribuția personală.**

Partea I – Stadiul actual al cunoașterii

Partea I cuprinde 2 capitole și reprezintă sinteza cunoștințelor cu privire la microbiomul intestinal, probiotice, utilizarea acestora în scop curativ și preventiv, dar și caracteristicile generale ale bacteriilor din genul *Bacillus* și potențialul lor probiotic.

Capitolul I este intitulat “Microbiomul” și cuprinde 3 subcapitole: “Generalități și importanță”, “Microbiomul la canide” și “Modificările microbiomului în contextul afecțiunilor gastro-intestinale la câine (dismicrobism- antibioterapie, endotoxemie)”.

Capitolul II este intitulat “Probioticele” și cuprinde 5 subcapitole intitulate: “Definiție și clasificare”, “Mecanisme de acțiune”, “Importanța probioticelor”, “Terapia alternativă cu probiotice la câine” și “Utilizarea *Bacillus* spp. ca probiotic”.

Partea a II-a Contribuția personală

Partea a II-a cuprinde 7 capitole și reprezintă contribuția personală. Aceste capitole cuprind ipoteza de lucru și obiectivele cercetării, materialul și metodele utilizate, rezultatele obținute, concluziile generale, recomandările desprinse în urma cercetării și elemente de originalitate ale tezei.

Capitolul III este intitulat “Ipoteza de lucru și obiectivele cercetării”, unde este descrisă ipoteza de lucru, dar și obiectivul general și obiectivele specifice ale tezei.

Capitolul IV este intitulat “Materiale și metode – aspecte generale” și este structurat și sistematizat în 5 subcapitole unde sunt descrise într-o manieră generală toate materialele și metodele utilizate, începând de la modul de organizare al investigațiilor, până la analiza statistică a datelor obținute.

Capitolul V este intitulat “Evaluarea *in vitro* a rezistenței diferitelor formule probiotice la condițiile simulate ale tractului gastro-intestinal” și este structurat și sistematizat în 4 subcapitole care prezintă, într-o manieră logică, parcursul acestui prim studiu. Astfel, sunt prezentate scopul și obiectivele studiului, materialele și metodele specifice, rezultatele obținute și concluziile parțiale. În acest capitol se regăsesc date privind toleranța la suc gastric artificial, precum și la sărurile biliare al diferitelor formule probiotice testate, dar și informații referitoare la capacitatea antimicrobiană a unei combinații bacteriene probiotice care include spori de bacili.

Capitolul VI este intitulat “Determinarea *in vivo* a capacității probiotice a sporilor de bacili în contextul disbiozei intestinale, utilizând modelul murin”, cuprinde 4 subcapitole menite să ilustreze firul logic al celui de al doilea studiu din această teză. În acest capitol se regăsesc informații legate de impactul antibioticelor și probioticelor în dismicrobismul intestinal indus experimental, prin analiza evoluției indicilor convenționali de creștere pentru populația murină utilizată în studiu, precum și prin evaluarea aspectelor histologice și imunohistochimice obținute.

Capitolul VII se intitulează “Evaluarea clinică a potențialului probiotic a sporilor de bacili în contextul disbiozei și endotoxemiei post-prandiale la câine”. În cele 4 subcapitole sunt prezentate date clinice, dar și paraclinice cu importanță deosebită (evaluarea endotoxemiei post-prandiale și a markerilor inflamatori) care ilustrează potențialul probiotic al sporilor de bacili. De asemenea, se regăsesc și date referitoare la impactul formulei probiotice asupra digestiei.

Capitolul VIII este intitulat “Concluzii generale și recomandări” și cuprinde sintetizat concluziile aferente studiilor noastre și recomandările desprinse din acestea, care au menirea de a îmbunătăți cercetarea fundamentală.

Capitolul IX este intitulat “Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei” și însumează elementele unice și originale ale tezei și totodată contribuția inovativă a unor metode nou implementate pentru evaluarea potențialului probiotic.

REZULTATELE CERCETĂRII

Evaluarea *in vitro* a rezistenței sporilor de bacili prin simularea condițiilor tractului gastro-intestinal canin

Rezistența bacteriilor probiotice la condițiile simulate ale tractului gastro-intestinal

Având în vedere că rezultatele testelor biologice *in vitro* aplicate se încadrează în categoria rezultatelor calitative, pentru demonstrarea validității metodei aplicate de testare a efectului inhibitor al sucului gastric am utilizat principiul funcțiilor matematice. Funcția matematică logică pe care se bazează demonstrația de față atribuie fiecărui element fundamental (suc gastric, probiotic, hrană) o constantă, după cum urmează: $f(x)=a+b+c$, unde a reprezintă suc gastric, b reprezintă probioticul, iar c reprezintă hrana. Astfel, în funcție de protocolul experimental au fost create două funcții de bază, luând în considerare efectul așteptat al experimentului (probioticele testate își păstrează viabilitatea în urma digestiei artificiale). Utilizând această metodă de interpretare matematică am obținut următoarele rezultate:

Pentru protocolul de digestie artificială a probelor P1, P2 și P3, în absența hranei, rezultatele funcțiilor matematice au fost divizate în două situații:

- $f(x)=a$ pentru probele P1 și P2
- $f(x)=a+b$ pentru P3

Astfel, pentru P1 și P2, unde $f(x)=a$, se remarcă inhibarea totală a viabilității bacteriilor probiotice în urma digestiei artificiale. Pentru P3, unde $f(x)=a+b$, poate fi observat faptul că bacteriile probiotice și-au menținut un anumit nivel de viabilitate.

Pentru protocolul de digestie artificială a probelor P1H, P2H, P3H, adică digestie artificială în prezența hranei, rezultatele funcției matematice au fost rezumate la un singur caz:

- $f(x)=a+b+c$.

Astfel, pentru toate cele trei probe incluse în studiu, se remarcă faptul că acestea și-au menținut un anumit procent de viabilitate în urma procesului de digestie artificială în prezența hranei.

În ceea ce privește **toleranța la secreția biliară**, pentru Proba 1 și Proba 3 se observă prezența unei activități bactericide slabe asupra tulpinilor bacteriene din compoziția probioticelor (zona de liză de 1,5-2 mm în jurul rondelii cu bilă). Astfel, bacteriile probiotice manifestă o toleranță scăzută la bila proaspătă de porc, viabilitatea lor fiind direct influențată de prezența acestei secreții digestive. Cu toate acestea, activitatea bactericidă manifestată de bilă este una slabă.

Capacitatea antimicrobiană

Principalele căi de manifestare a eficacității sunt reprezentate de înlocuirea bacteriilor patogene la nivel intestinal (LEE și colab., 2003), producția de substanțe antimicrobiene, stimularea răspunsului imun (JONES și VERSALOVIC, 2009) sau reglarea concentrației de metaboliți (SOO și colab., 2008).

Prezentul studiu a evidențiat inhibiția de competiție manifestată de bacteriile probiotice testate. Astfel, în cazul culturilor de *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* această inhibiție de competiție este evidentă. În cazul culturii patogene de *Bacillus cereus* putem observa caracterul coloniilor patogene, de dimensiuni mult mai reduse în zona centrală, în jurul coloniei de probiotic, comparativ cu dimensiunile coloniilor din restul plăcii.

Analiza *in vivo* a capacității probiotice a sporilor de bacili în contextul disbiozei intestinale, utilizând modelul murin

Analiza indicilor convenționali de creștere

Cea mai mare valoare a factorului de conversie a hranei a fost înregistrată la lotul 1- lotul martor (Tabel 1). În ceea ce privește lotul 2 (administrare amoxicilină 14 zile) și lotul 3 (administrare probiotic 14 zile), valoarea ratei de conversie a hranei a înregistrat valori negative. Amoxicilina a fost utilizată datorită biovalabilității crescute la nivel intestinal (CHESA-JIMEJNEZ și colab., 1994). Valorile negative pot fi explicate datorită capacității celor 2 produse administrate de a modifica microbiomul intestinal și implicit de a influența rata de absorbție intestinală. Astfel, deși animalele au consumat o cantitate de hrană normală, similară lotului martor (Tabel 1), acestea au pierdut în greutate, efect care se atribuie direct intervenției experimentale. În ceea ce privește lotul 4 (antibiotic și probiotic concomitent timp de 14 zile), factorul de conversie al hranei a înregistrat valori pozitive. Cantitatea de hrană consumată a fost și pentru acest lot încadrată în parametri fiziologici, fiind comparabilă cu celelalte loturi. Astfel, valoarea pozitivă înregistrată pentru FCR la acest lot este rezultatul administrării concomitente a celor 2 tratamente. În ceea ce privește lotul 5 (antibiotic 7 zile, probiotic 7 zile), valoarea FCR a fost negativă. În contextul consumului unei cantități de hrană aproximativ egală cu celelalte loturi, se poate considera că probioticul administrat după încetarea tratamentului cu antibiotic nu are efectul scontat.

Tabel (Table) 1

<i>Valorile medii ale indicilor convenționali de creștere</i>				
Lot	Hrană consumată	ST/lot	RCH/lot	RSC
L1	885.8	4.50	196.8444	0.021967
L2	896	-16.50	-54.303	-0.08514
L3	1003	-15.50	-64.7097	-0.07613
L4	1079	10.00	107.9	0.047923
L5	984.5	-26.00	-37.8654	-0.12782

ST- spor total; RCH- Rata de conversie a hranei; RSC- rata specifică de creștere;

Evaluarea histologică și imunohistochimică

La examenul **histologic** al probelor colorate Tricrom Goldner, aspectul morfologic al celor trei segmente intestinale a relevat modificări pregnante la loturile 2, 3 și 5. La lotul martor, precum și la lotul 4 - tratat concomitent cu antibiotic și probiotic, modificările survenite la nivel intestinal au fost absente sau reduse. Cele mai importante modificări observate au fost la nivel duodenal, acestea fiind sugerate de prezența unor spații subepiteliale, cu menținerea integrității și coeziunii epiteliului vilozităților intestinale

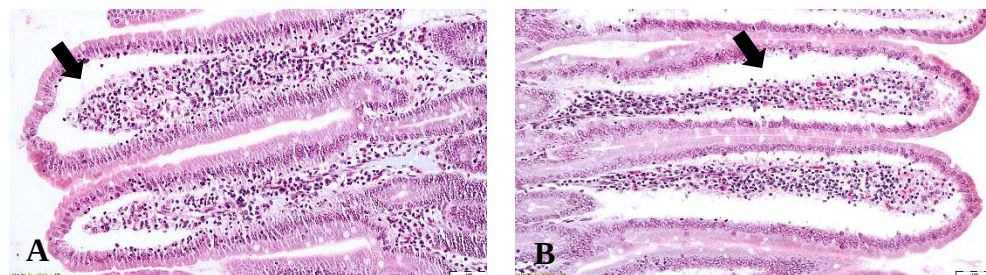


Fig. 1 Aspectul mucoasei duodenale la lotul 2 (A) și lotul 5 (B), colorație TG: prezența unor spații subepiteliale, cu menținerea integrității și coeziunii epiteliului vilozităților intestinale

La nivelul mucoasei jejunale modificările observate au fost moderate, iar la nivelul colonului modificările au fost catalogate ca slab reprezentate la toate cele 5 loturi, cu diferențe de intensitate între grupuri.

Din punct de vedere **imunohistochimic**, segmentul intestinal cu cea mai puternică intensitate a reacției, atât pentru LBP cât și pentru TLR4, a fost în mucoasa duodenală, urmată de cea jejunală (în care infiltratul limfoid aferent mucoasei este mai redus cantitativ comparativ cu duodenul), în timp ce în colon expresia celor doi markeri este semnificativ mai redusă comparativ cu segmentele anterioare (Tabel 2). În ceea ce privește detaliile reacției imunohistochimice, atât în cazul LBP cât și în cazul TLR4, imunomarcarea se evidențiază prin nuanțe de brun (de diferite intensități) strict la nivelul membranei macrofagelor aferente GALT (gut associated lymphoid tissue). De asemenea, intensitatea culorii reacției imunohistochimice este comparabilă la cei doi markeri analizați, constatându-se corelație directă a expresiei LBP cu

markerul TLR4 la fiecare segment luat în studiu. În ceea ce privește locul în care cei doi markeri sunt exprimați, aceștia au fost identificați în țesutul limfoid asociat mucoasei intestinale (GALT), preponderent în macrofagele din lamina propria.

Tabel (Table) 2

Scorul de imunopozitivitate pentru markerii LBP și TLR4 în cele 3 segmente intestinale

Lot	Segment intestinal	LBP	TLR4
Lot 1	Duoden	±	±
Group 1	Jejun	±	±
	Colon	±	±
Lot 2	Duoden	+++	+++
Group 2	Jejun	+++	+++
	Colon	+	+
Lot 3	Duoden	+++	+++
Group 3	Jejun	++	++
	Colon	+	+
Lot 4	Duoden	+++	++
Group 4	Jejun	++	++
	Colon	+	+
Lot 5	Duoden	+++	++
Group 5	Jejun	++	++
	Colon	+	+

± reacție slab pozitivă, + reacție moderat pozitivă, ++ reacție clar pozitivă, +++ reacție intens pozitivă

Evaluarea clinică a potențialului probiotic a sporilor de bacili în contextul disbiozei și endotoxemiei post-prandiale la câine

Examenul clinic

La examenul clinic din ziua 0 niciun câine nu a prezentat modificări importante ale parametrilor fiziologici. La examinarea clinică din ziua 30 acest aspect s-a menținut constant, observându-se și remiterea semnelor gastro-intestinale la câinii atribuiți lotului 2, cu disbioză intestinală aparentă.

Investigațiile paraclinice

Examenul coproparazitologic ante-tratament cu probiotic a fost negativ pentru subiecții ambelor loturi. La examenul post-tratament toate probele au fost negative, cu excepția unui subiect din lotul 2 la care au fost identificate ouă de *Uncinaria* spp./*Ancylostoma* spp.

Parametri hematologici au prezentat o remarcantă heterogenitate în cazul tuturor câinilor incluși în studiu. Cu toate acestea, diferențele înregistrate au rămas în intervalul fiziologic de referință pentru fiecare parametru.

Asemenea parametrilor hematologici, heterogenitatea a fost prezentă și în cazul celor biochimici cu unele excepții, rezultatele atât ante-tratament, cât și post-tratament încadrându-se în intervalele de referință.

Evoluția parametrilor stresului oxidativ nu sugerează o influență directă a tratamentului cu probiotic asupra indicatorilor dozați. Deși evoluția acestora a înregistrat modificări, dinamica acestora nu a fost una liniară.

Evoluția endotoxemiei: În prezentul studiu, valorile endotoxemiei au fost analizate în dinamică, atât ante-prandial, cât și după administrarea hranei la 6, respectiv 12 ore. Rezultatele obținute înainte de tratamentul cu probiotic prezintă valori mai crescute ale endotoxemiei, comparativ cu cele obținute la finalul tratamentului. De asemenea, se observă diferențe și între valorile obținute la lotul de câini sănătoși, comparativ cu lotul alcătuit din pacienți cu disbioză aparentă (Fig. 2).

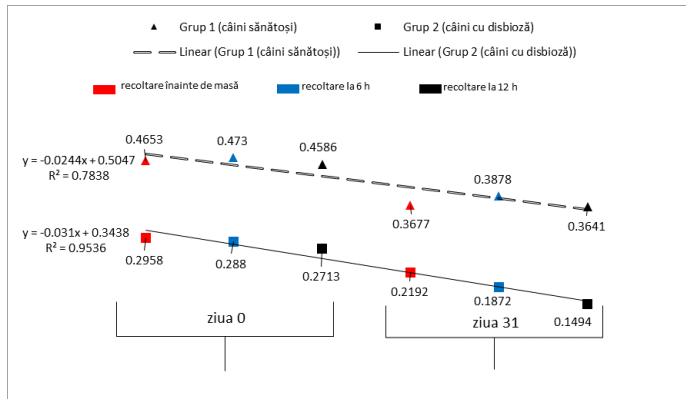


Fig. 2 Dinamica valorilor medii ale concentrațiilor de endotoxină și regresia liniară (EU/mL) pentru câinii sănătoși și câinii cu disbioză (înainte și după tratamentul cu probiotic)

Evoluția markerilor inflamației intestinale: dozarea markerilor inflamatori a fost realizată pentru grupul 2 (câini cu disbioză aparentă). Totodată a fost stabilită corelația între evoluția endotoxemiei și valorile înregistrate pentru sCD14 și IL-1 β (Tabel 3). Schimbările valorilor sCD14 sunt reprezentate de înregistrarea unei scăderi după finalizarea tratamentului cu probiotic, aspect care este direct corelat cu evoluția valorilor endotoxemiei serice. Valorile marker-ului IL-1 β au rămas relativ constante pe parcursul studiului.

Tabel (Table) 3

Endotoxina serică, CD14 solubil și IL-1 β - răspunsul pre- și post-administrare de probiotic

Parametru	Înainte de administrarea probioticului (Ziua 0)			După administrarea probioticului (Ziua 31)		
	Ante-prandial	Post-prandial		Ante-prandial	Post-prandial	
		6h	12 h		6h	12 h
Endotoxemie (EU/mL)	0.2958 ± 0.168	0.2880 ± 0.200	0.2713 ± 0.170	0.2192 ± 0.241	0.1872 ± 0.145	0.1494 ± 0.070
CD14 solubil (pg/mL)	23.6028 ± 6.99	23.2065 ± 7.275	23.3054 ± 6.011	21.1645 ± 2.110	20.5592 ± 0.993	20.7246 ± 1.1389
IL-1 β (ng/mL)	0.0447 ± 0.015	0.0410 ± 0.014	0.0486 ± 0.015	0.0410 ± 0.009	0.0458 ± 0.007	0.0453 ± 0.010

Evaluarea impactului probioticului asupra digestiei

Scorul fecalelor: la majoritatea câinilor incluși în studiu consistența și volumul fecalelor au înregistrat îmbunătățiri pe parcursul tratamentului cu probiotic, mirosul probelor nu s-a îmbunătățit considerabil, sunetele produse la nivel digestiv au fost absente, iar flatulența a fost diminuată. O schimbare importantă s-a înregistrat la nivelul cantității de fecale, care s-a diminuat considerabil după tratament.

Studiul digestibilității hranei prin cuantificarea coeficientului digestibilității aparente arată îmbunătățirea remarcabilă a capacității de digestie pentru toate componentele studiate (substanță uscată, grăsime, celuloză, substanțe extractive neazotate) cu excepția proteinelor unde valorile au scăzut pentru unul din subiecți. Creșterea digestibilității este semnificativă din punct de vedere statistic ($P < 0.001$) pentru substanța uscată, proteine și substanțe extractive neazotate (SEN).

Recomandări

Recomandăm creșterea atenției în practica medicală veterinară asupra dismicrobismului intestinal și a endotoxemiei post-prandiale naturale și utilizarea probioticelor pentru contracararea efectelor negative ale acestora.

Precizăm că administrarea probioticelor trebuie realizată în timpul administrării hranei, pentru a diminua influența negativă a pH-ului acid asupra viabilității bacteriilor. De asemenea, susținem administrarea probioticelor concomitent cu antibioticele, pentru a contracara efectele negative induse de starea de dismicrobism și nu la finalul terapiei cu antibiotic.

BIBLIOGRAFIE

- CHESA-JIMEJNEZ J., J.E. PERIS, FRANCISCA TORRES-MOLINA, L. GRANERO, 1944, Low Bioavailability of Amoxicillin in Rats as a Consequence of Presystemic Degradation in the Intestine, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 38(4), 842-847.
- JONES S.E., J. VERSALOVIC, 2009, Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors, *BMC Microbiology*, vol 9, 35.
- LEE Y.-K., K.-Y. PUONG, A.C. OUWEHAND, S. SALMINEN, 2003, Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli, *Journal of Medical Microbiology*, vol. 52 (Pt 10), 925–930.
- SCHMITZ S., J. SUCHODOLSKI, 2016, Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics- what is the evidence?, *Veterinary Medicine and Science*, vol. 2, 71- 94.
- SOO I., K.L. MADSEN, Q. TEJPAN, B.C. SYDORA, R. SHERBANIUK, B. CINQUE, L. DI MARZIO, M.G. CIFONE, C. DESIMONE, R.N. FEDORAK, 2008, VSL#3 probiotic upregulates intestinal mucosal alkaline sphingomyelinase and reduces inflammation, *Canadian Journal of Gastroenterology*, vol. 22(3), 237–242.