
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Impactul mamitelor, a patogenilor și a stresului oxidativ asupra componentelor nutritive și funcționale din laptele de capră

Doctorand **Cristiana-Ștefania Novac**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Sanda Andrei**



INTRODUCERE

Laptele de capră se situează pe locul patru din punct de vedere al producției de lapte la nivel mondial, după laptele de vacă, bivoliță și oaie. Creșterea caprelor are o mare importanță economică îndeosebi în regiunile unde condițiile climatice nu sunt favorabile creșterii bovinelor (AMIGO și FONTECHA, 2011). La nivelul Uniunii Europene, conform Eurostat, în 2022 România ocupa locul trei la numărul de capete, după Grecia și Spania. Cererea de produse lactate de capră este în creștere, acestea fiind preferate tocmai pentru beneficiile lor nutriționale, printre care se numără digestibilitatea mai crescută față de laptele de vacă și proprietățile hipoalergenice (MILLER și LU, 2019). Deși compoziția generală a laptelui de capră este influențată de numeroși factori neinfecțioși, impactul proceselor inflamatorii infecțioase este de departe cel mai important. Astfel, inflamația glandei mamare atrage după sine numeroase modificări în compoziția laptelui (LEITNER și colab., 2004).

Deoarece literatura științifică este bogată în studii care interesează în special laptele de vacă, prezenta lucrare vine în completarea informațiilor cu privire la impactul proceselor inflamatorii ale glandei mamare asupra componentelor nutritive din laptele de capră, un produs alimentar din ce în ce mai popular la nivel național, dar și mondial. Mai mult decât atât, cercetările prezentate pe parcursul acestei teze implică evaluarea mamitei subclinice la capre, un subiect vast și complex care are încă multe de oferit cercetătorilor. Includerea în studiu a caprelor autohtone carpatine a dorit readucerea în prim-plan a acestei rase, precum și actualizarea datelor privind compoziția laptelui atât la animale clinic sănătoase, cât și la femele afectate de mamită subclinică, cu speranța ca informațiile oferite vor fi în folosul comunității științifice și dezvoltării industriei lactatelor de capră la nivel național.

IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Mamitele se soldează cu modificări ale numărului de celule somatice, precum și creșterea activității enzimelor inflamatorii. În funcție de severitatea leziunilor, pot apărea modificări ale parametrilor fizico-chimici și biochimici ai laptelui, precum și formarea în exces a speciilor reactive de oxigen, care duc la instalarea consecutivă a stresului oxidativ, cu creșterea nivelului de oxidare a unor constituenți, precum proteine sau acizi grași.

Ipoteza de lucru a acestei teze a fost reprezentată de demonstrarea prezenței modificărilor la nivelul parametrilor fizici și biochimici ai laptelui de capră, apărute în urma instalării proceselor inflamatorii subclinice. Astfel, prin intermediul determinărilor efectuate și a protocoalelor utilizate, s-a urmărit completarea și actualizarea bagajului de cunoștințe științifice privind laptele de capră.

În vederea confirmării acestei ipoteze, a fost formulat următorul **obiectiv general**:

- ✓ Stabilirea corelațiilor care există între severitatea infecției mamare, tipul de patogeni, starea de inflamație indusă de mamitele subclinice, și profilul parametrilor biochimici, respectiv indicii stresului oxidativ și nitrozativ în lapte de capră.

Pentru atingerea obiectivului general, prezenta teza a fost structurată în patru studii originale, bazate pe o serie de **obiective specifice**:

- ✓ Analiza microflorei și calității igienice a laptelui crud de capră recoltat din tancuri din ferme situate în județul Alba, județul Sălaj și județul Cluj.
 - Recoltarea probelor comune de lapte (din tanc) din 18 ferme din Transilvania;
 - Caracterizarea microflorei laptelui, urmărind identificarea genurilor și speciilor bacteriene și stabilirea calității igienice a laptelui analizat prin determinarea numărului total de germeni (NTG).
- ✓ Identificarea și descrierea componenței microflorei bacteriene a laptelui crud de capră recoltat de la animale clinic sănătoase și testarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor bacteriene izolate
 - Prelevarea probelor individuale de lapte de capră de la animale clinic sănătoase (fără semne de mamită) din cadrul unei ferme din zona Transilvaniei, județul Mureș;
 - Evaluarea componenței microflorei laptelui prin izolarea și identificarea speciilor bacteriene, folosind două metode de identificare: sistemul Vitek® 2 Compact și prin analiza moleculară a izolatelor, folosind secvențierea genei 16S;
 - Determinarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor bacteriene izolate în vederea stabilirii gradului de antibioretistență;
- ✓ Analiza numărului total de celule somatice (NCS), evaluarea lactocitosedimentului și determinarea compoziției generale a laptelui provenit de la capre din rasa Carpatină
 - Determinarea numărului total de celule somatice din laptele de capră recoltat anterior și evaluarea citologică a sedimentului laptelui, având ca scop diferențierea și caracterizarea populației celulare, precum și evaluarea influenței microorganismelor asupra structurii sedimentului;
 - Analiza parametrilor fizico-chimici generali ai laptelui de capră;
 - Stabilirea de asocieri privind prezența patogenilor și NCS, respectiv evaluarea influenței patogenilor asupra compoziției generale a laptelui.
- ✓ Stabilirea de corelații între profilul microflorei din lapte și parametrii biochimici ai laptelui de capră
 - Evaluarea activității în lapte a unor markeri enzimatici ai inflamației, reprezentați de lactat dehidrogenază și β -glucuronidază;
 - Determinarea activității indicilor stresului oxidativ, reprezentați de: catalază, glutation-peroxidază, indice de peroxidare a lipidelor, status antioxidant total, precum și evaluarea degradării oxidative a ADN-ului prin măsurarea 8-hidroxideoxiguanozinei;
 - Evaluarea prezenței oxidului nitric ca marker al stresului nitrozativ;
 - Evaluarea profilului proteic a probelor de lapte de capră incluse în studiu, folosind electroforeza în sistem microfluidic.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat intitulată „Impactul mamitelor, a patogenilor și a stresului oxidativ asupra componentelor nutritive și funcționale din laptele de capră” este

alcătuită, conform normelor de redactare, din două părți: Partea I - Stadiul actual al cunoașterii și Partea a II-a - Contribuția personală, cuprinzând un total de 153 pagini, 49 de figuri, 21 tabele și 185 de referințe bibliografice.

PARTEA I - Stadiul actual al cunoașterii

Această primă parte cuprinde 4 capitole care sintetizează informații actuale referitoare la laptele de capră și mamitele la această specie.

Capitolul I este intitulat „Compoziția laptelui de capră” și prezintă, în detaliu, aspecte legate de constituția fizico-chimici și biochimici ai laptelui de capră.

Capitolul II, denumit „Mamitele la capre”, cuprinde două subcapitole, „Aspecte generale” și „Etiologia mamitelor bacteriene”.

Capitolul III, intitulat „Modificări induse de mamite asupra principalilor parametri biochimici în laptele de capră” cuprinde 6 subcapitole: „Proteine”, „Glucide”, „Lipide”, „Enzime”, „Conductivitate electrică”, „Număr de celule somatice”.

Capitolul IV este denumit „Stresul oxidativ” și este organizat în 2 subcapitole: „Generalități” și „Modificări induse de mamite asupra indicilor stresului oxidativ în laptele de capră” care reunesc informații relevante cu privire la prezența stresului oxidativ în procese inflamatorii ale glandei mamare.

PARTEA a II-a - Contribuții personale

Partea a II-a este structurată în 8 capitole, în care sunt prezentate ipoteza de lucru și obiectivele lucrării, materialele și metodele folosite, rezultatele obținute pentru fiecare studiu în parte, concluzii generale, recomandări, precum și elemente de originalitate ale tezei.

Capitolul V este intitulat „Ipoteza de lucru și obiectivele cercetării” și prezintă ipoteza de lucru, obiectivul general, precum și obiectivele specifice ale prezentei lucrări.

Capitolul VI este denumit „Materiale și metode - aspecte generale”, fiind structurat în 4 subcapitole în care sunt descrise modul de organizare al investigațiilor, materialul biologic folosit, investigațiile realizate în cadrul fiecărui studiu și metodele de analiză statistică utilizate.

Capitolul VII este intitulat „Studiu privind caracterizarea microflorei laptelui de capră provenit din ferme din Transilvania”, fiind alcătuit din 5 subcapitole, studiul concentrându-se pe investigarea laptelui crud de capră provenit din tancurile a 18 ferme, cu scopul de a descrie microflora bacteriană, precum și de a evalua calitatea igienică a laptelui.

Capitolul VIII este denumit „Evaluarea microflorei laptelui crud de capră și testarea sensibilității la antibiotice” și cuprinde 5 subcapitole în care sunt prezentate succint obiectivele studiului, materiale și metode folosite, rezultate și concluzii parțiale. Capitolul urmărește identificarea speciilor bacteriene din lapte de capră, rasa Carpatină, recoltat dintr-o fermă privată și evaluarea prezenței fenomenului de antibioretistență prin efectuarea de antibiograme prin metodă difuzimetrică.

Capitolul IX este intitulat „Evaluarea parametrilor fizico-chimici generali și igienico-sanitari ai laptelui de capră” și prezintă aspecte legate de numărul de celule somatice, citologia laptelui și principalii parametri fizico-chimici, precum și influența patogenilor asupra compoziției laptelui.

Capitolul X, denumit „Evaluarea parametrilor biochimici și a indicilor stresului oxidativ și nitrozativ din laptele de capră” este structurat în 5 subcapitole și prezintă date legate de impactul microorganismelor asupra indicilor enzimatici inflamatori și ai stresului oxidativ în laptele de capră. Tot în acest capitol este prezentat profilul proteic al laptelui, cu modificările care apar în timpul unei mamite subclinice, precum și diferite corelații între parametrii analizați.

Capitolul XI, „Concluzii generale și recomandari”, include principalele concluzii desprinse din cele 4 studii originale, precum și o serie de recomandări.

Capitolul XII este intitulat „Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei” și include principalele elemente de originalitate ale prezentei teze legate de investigarea impactului mamitelor subclinice asupra componentelor nutritive și funcționale ale laptelui de capră.

REZULTATELE CERCETĂRII

Cap. VII - Studiu privind caracterizarea microflorei laptelui de capră provenit din ferme din Transilvania”

Examen bacteriologic

Toate cele 36 de probe de lapte din tanc au fost pozitive pentru creștere bacteriană, cu o prevalență ridicată a bacteriilor Gram pozitive. Prevalența cea mai crescută a înregistrat-o genul *Staphylococcus* (25%), urmat de *Escherichia* (15%), *Micrococcus* (14%), *Raoultella* (2%), *Trueperella* (2%) și *Enterococcus* (1%). Următoarele specii bacteriene au fost identificate (Vitek® 2 și API® Staph): *S. xylosum*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *Kocuria varians*, *Kocuria rosea*, *Aerococcus viridans*, *Streptococcus uberis*, *B. licheniformis*, *E. durans*, *E. faecium* și *Micrococcus luteus*. Din categoria bacteriilor Gram negative, au fost identificate următoarele specii: *E.coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Raoultella planticola*, *Aeromonas sobria* (fig. 1).



Fig. 1 Aspecte culturale: A - *E. coli* (agar sânge), B - *Klebsiella* spp. (MacConkey), C - *Aeromonas* spp. (agar sânge)

Număr total de germeni

Probele recoltate din fermele din județul Alba au înregistrat cele mai mari valori, însă nicio probă din cadrul acestui studiu nu a depășit normele prevăzute de Reg. CE 853/2004 privind comercializarea laptelui crud provenit de la alte specii decât cel de vacă, fiind așadar potrivit consumului uman.

Cap. VIII - Evaluarea microflorei laptelui crud de capră și testarea sensibilității la antibiotice

Examen bacteriologic. Analiză moleculară.

S-a pus în evidență un procent ridicat de probe pozitive (86.84%), cu o prevalență crescută a bacteriilor din genul *Staphylococcus* (32 izolate), *Enterococcus* (24 izolate) și *Bacillus* (18 izolate), cele mai frecvent izolate specii fiind *E.durans*, *B. licheniformis* și *S. aureus*. Alte genuri bacteriene identificate au fost *Macroccoccus*, *Aerococcus* și *Streptococcus*, însă cu o prevalență mai scăzută. Din categoria stafilococilor, în studiul de față s-a raportat pentru prima dată izolarea speciei *Staphylococcus petrasii* ssp. *jettensis* din lapte de capră. Singurele bacterii Gram negative identificate au fost *Moraxella osloensis* și *Aeromonas hydrophila*, sugerând implicarea scăzută a acestei categorii în etiologia mamitelor subclinice la capre.

Testarea sensibilității la antibiotice

În ceea ce privește sensibilitatea generală la antibiotice, în studiul de față s-a observat o eficiență crescută a florenicolului, urmat de neomicin și gentamicin, un procent ridicat de rezistență înregistrându-se în cazul bacitracinului (100% din izolate), cefquinome, oxitetraciclină și amoxicilina cu acid clavulanic.

Majoritatea microorganismelor testate, 38.10%, au fost rezistente la agenții aparținând a patru clase de antimicrobiene, iar rezistența cea mai mare, la câte un agent din șapte clase, a fost observată pentru 2.38 % din tulpinile testate, demonstrând prezența izolatelor MDR în laptele de capră.

Capitolul IX - Evaluarea parametrilor fizico-chimici generali și igienico-sanitari ai laptelui de capră

Analiza numărului de celule somatice (NCS) a pus în evidență diferențe semnificative între categoriile analizate, precum și influența diferitelor microorganisme asupra acestui parametru. Astfel, numărul cel mai scăzut de celule somatice a fost înregistrat în cazul laptelui negativ din punct de vedere microbiologic, iar valoarea medie cea mai ridicată a fost constatată în cazul infecției cu *S. aureus*, demonstrând evoluția unui proces inflamator subclinic (Tabel 1).

Tabel 1

Rezultate NCS pe categorii microbiologice

Categorie	NCS ($\times 10^3$ cel./mL)	Log ₁₀ NCS	Diferență statistică ($p \leq 0.05$)
N	236.4 ± 64.1	5.36 ± 0.11	SNA, B, SA
SNA	710.52 ± 458.02	5.76 ± 0.27	N, E, SA
E	251.75 ± 112.7	5.36 ± 0.17	SNA, B, SA, A
B	709.83 ± 385.91	5.79 ± 0.22	N, E, SA
SA	4377.83 ± 1426.65	6.62 ± 0.12	N, SNA, E, B, A
A	871.90 ± 1478.12	5.64 ± 0.54	E, SA

N - probe microbiologic negative, SNA - stafilococi non-aureus, E - enterococi, B - bacterii din genul *Bacillus*, SA - *S. aureus*, A - alți patogeni

Din punct de vedere citologic, laptele din categoria N a înregistrat valori procentuale ale subpopulațiilor celulare care se încadrează în intervalele de referință ale speciei, cu o procent ridicat de neutrofile și macrofage, urmat de limfocite și celule epiteliale. De asemenea, s-au pus în evidență numeroase particule citoplasmatică și alte resturi celulare frecvent întâlnite în laptele de capră.

La analiza statistică comparativă a categoriilor de lapte, s-a observat un procent de neutrofile crescut în probele de lapte pozitive din punct de vedere microbiologic, cu creștere marcantă în cazul infecției cu *S. aureus* (Tabel 2). Similar s-a constatat o scădere a procentului de limfocite și macrofage pentru categoriile SNA, E, B, SA și A.

Tabel 2

Valorile procentuale ale citosedimentului pentru fiecare categorie de probe

Category	N %	B %	E %	L %	M %	CE %
N	42.50 ± 1.17	0.08 ± 0.04	0.8 ± 0.42	18.10 ± 1.52	29 ± 1.24	9.5 ± 0.70
SNA	53.91 ± 6.02	0.06 ± 0.04	1.91 ± 1.50	16.29 ± 3.96	19.82 ± 6.10	8.45 ± 1.28
E	49.91 ± 5.43	0.05 ± 0.05	1.82 ± 1.64	17.91 ± 2.25	21.82 ± 5.41	8.08 ± 1.08
B	51.44 ± 3.97	0.03 ± 0.05	1.77 ± 1.35	16.61 ± 2.68	21.60 ± 3.58	8.55 ± 1.14
SA	71.00 ± 1.09	0.01 ± 0.04	3.16 ± 0.98	9.83 ± 1.32	8.68 ± 1.64	7.16 ± 0.98
A	48.22 ± 3.86	0.04 ± 0.05	1.55 ± 1.13	17.11 ± 4.13	24.43 ± 2.83	8.66 ± 1.11

N-neutrofile, B-bazofile, E-eozinofile, L-limfocite, M-macrofage, CE-celule epiteliale

Analiza parametrilor fizico-chimici generali ai laptelui (proteine totale, lipide, lactoză, substanță uscată negrasă, densitate, pH) nu a pus în evidență diferențe statistice semnificative între categorii, sugerând faptul că mamita subclinică la capre nu modifică marcant compoziția fizico-chimică generală a laptelui. Singurul parametru care a prezentat modificări a fost conductivitatea electrică, mai crescută în cazul probelor de lapte din categoria E și SNA comparativ cu N, demonstrând aflusul crescut de electroliți în lapte în timpul proceselor inflamatorii.

Cap. X - Evaluarea parametrilor biochimici și a indicilor stresului oxidativ și nitrozativ din laptele de capră

Indici enzimatici inflamatorii

Laptele mamitic prezintă o activitate enzimatică inflamatorie (lactat dehidrogenază și β -glucuronidază) mult mai accentuată ($p \leq 0.05$) comparativ cu laptele sănătos, activitate direct proporțională cu patogenitatea bacteriilor, aspecte corelate pozitiv și cu NCS (fig. 2).

Indicii stresului oxidativ și nitrozativ

Enzimele antioxidante, catalază (CAT) și glutatión-peroxidază (GPx), au înregistrat o activitate semnificativ crescută ($p \leq 0.05$) în laptele de capră din care s-au izolat microorganismele, având cel mai ridicat nivel în infecția cu *S. aureus*. Statusul antioxidant total (TAS) este mai scăzut în caz de mamită subclinică, indicând faptul că statusul antioxidant al laptelui de capră poate fi influențat semnificativ atât de prezența agenților bacterieni, cât și de patogenitatea acestora (fig. 3).

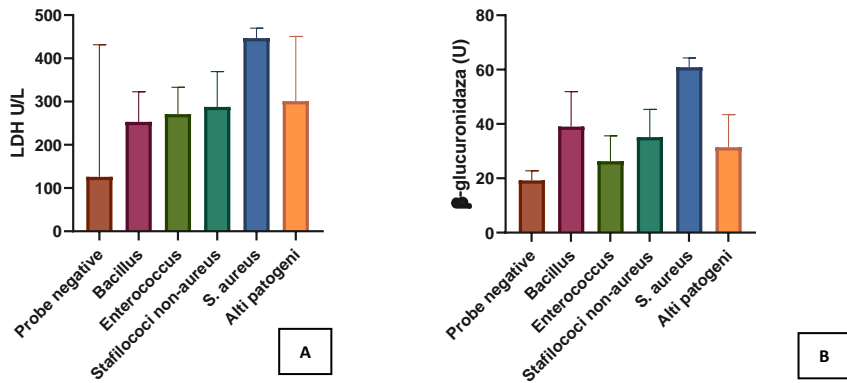


Fig. 2 Modificări ale LDH (A) și β-glucuronidazei (B) în lapte în funcție de statusul bacteriologic

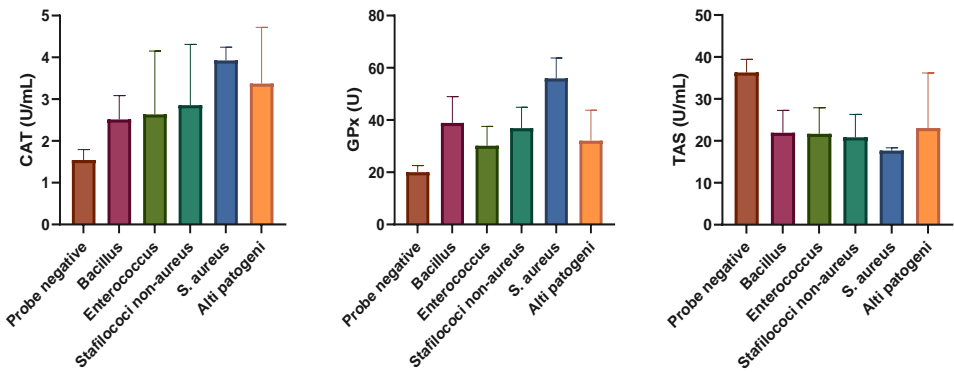


Fig. 3 CAT, GPx și TAS în laptele de capră

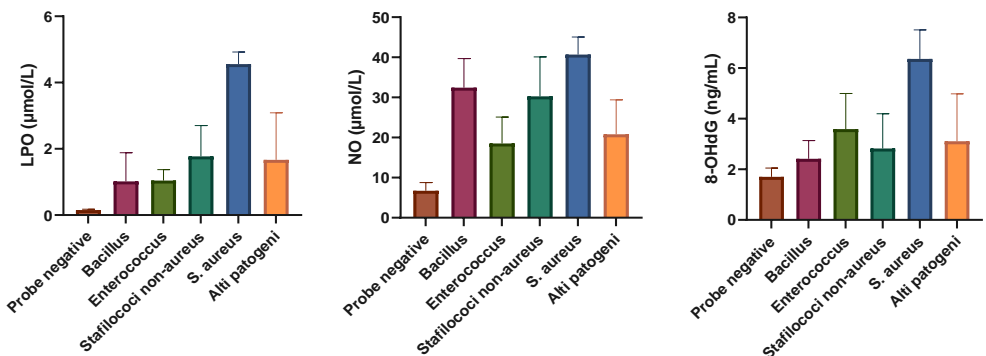


Fig. 4 LPO, NO și 8-OHdG în laptele de capră

Probele de lapte pozitive din punct de vedere microbiologic se asociază cu valori medii semnificativ mai crescute ($p \leq 0.05$) ale peroxidilor lipidici (LPO), oxidului nitric (NO) și hidroxideoxiguanozinei (8-OHdG), sugerând instalarea stresului oxidativ și derularea proceselor de oxidare ale biomoleculilor în contextul inflamației subclinice (fig. 4).

Profilul proteic al laptelui de capră

Din categoria proteinelor solubile s-au identificat următoarele proteine majore: α -lactalbumină (α -LA), β -lactoglobulină (β -LG), precum și proteine minore: imunoglobuline (Ig), serum albumină (SA) și lactoferină (Lf). Cazeinele identificate au fost reprezentate de α s-cazeine (α s-CN), β -cazeină (β -CN) și κ -cazeină (κ -CN).

Profilul proteic a pus în evidență concentrații mai mari de lactoferină, serum albumină și imunoglobuline în laptele mamitic. Dintre cazeine, doar β -CN a înregistrat variații între categoriile analizate, cu valori medii mai scăzute în cazul laptelui din care s-au izolat stafilococi, sugerând faptul că această fracție este mai susceptibilă la acțiunea proteazelor proprii din lapte, cât și a celor bacteriene. α s-CN și κ -CN nu au prezentat variații semnificative între categoriile de probe.

Mamita subclinică nu influențează notabil nivelul β -LG și α -LA în laptele de capră.

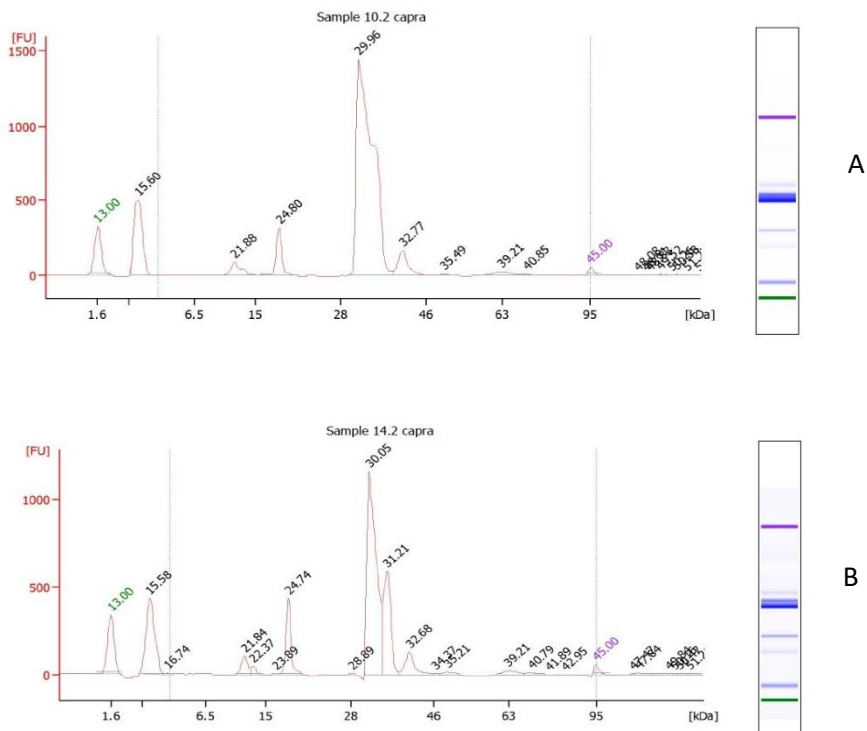


Fig. 5 A- Electroforegramă probă de lapte negativă, B - probă de lapte - *S. aureus*

În final, lucrarea de față a demonstrat influența proceselor inflamatorii mamare asupra constituenților laptelui, procese care se soldează cu instalarea stresului oxidativ și oxidarea biomoleculilor. Toate aceste modificări sunt mult mai pregnante în cazul infecției cu microorganisme cu patogenitate crescută, cum este *S. aureus*.

RECOMANDĂRI

Având în vedere datele prezentate pe parcursul acestei teze, se recomandă efectuarea de investigații suplimentare atât asupra laptelui sănătos, cât și a laptelui mamitic de la capre aparținând unor populații mai diverse, din rase, stări fiziologice și condiții de mediu diferite, prezenta lucrare deschizând noi linii de cercetare în domeniul mamitelor la rumegătoare mici. Așadar, recomandăm următoarele:

- ✓ Efectuarea de examene microbiologice ale laptelui și testarea sensibilității la antibiotice în cazul confirmării unei mamite bacteriene, pentru evitarea eșecului terapiei și fenomenului de antibiorezistență.
- ✓ Folosirea metodelor de biologie moleculară în vederea identificării speciilor bacteriene cu o mai mare acuratețe.
- ✓ Efectuarea de investigații complementare ale laptelui ca tehnici adjuvante în diagnosticul mamitei.
- ✓ Evaluarea indicilor enzimatici inflamatori și ai stresului oxidativ în lapte ca metodă predictivă a unei infecții intramamare, mai ales în cazul patogenilor majori.
- ✓ Completarea cunoștințelor cu studii realizate pe o populație mai numeroasă, care să permită evaluarea detaliată a impactului fiecărei specii bacteriene izolate asupra componentelor laptelui și indicilor stresului oxidativ și nitrozativ.
- ✓ Continuarea cercetărilor în domeniul mamitei la caprine și dezvoltarea a noi tehnici de diagnostic pentru această afecțiune.

BIBLIOGRAFIE

1. AMIGO, L. și FONTECHA, J., 2011. Goat milk. 2: 484–493 in Encyclopedia of Dairy Science. JW Fuquay and PF Fox, Ed. *Elsevier Ltd*.
2. LEITNER, G., MERIN, U., SILANIKOVE, N., 2004. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1719-1726.
3. MILLER, B.A., LU, C.D., 2019. Current status of global dairy goat production: An overview. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 32(8), 1219.