
Investigații *in vitro* și *in vivo* pentru determinarea mecanismelor antimicrobiene, antiparazitare și antivirale ale unor amestecuri antimicrobiene

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand: **Igori Balta**

Conducătorii științifici:

Prof. dr. Adriana Criste

Prof. dr. Nicolae Corcionivoschi



(REZUMAT)

Introducere

Anual, bolile cauzate de patogeni zoonotici transmiși prin intermediul alimentelor afectează aproximativ 226 de milioane de oameni. Astfel de infecții cauzate de agenți patogeni precum *Campylobacter*, *Listeria*, *Salmonella*, respectiv specii de *Clostridium*, ori de agenți parazitari sau virali care cauzează sindromul respirator și de reproducție porcin, bronșita infecțioasă, boala Newcastle, gripa aviară, gripa porcină, infecția cu coronavirus bovin, dar și alte boli parazitare, sunt asociate cu rate ridicate de morbiditate la nivel mondial, atât la om, cât și la animale (HELLGREN, 2019).

Genul *Campylobacter* înglobează agenți patogeni de origine alimentară responsabili de gastroenterita auto-limitativă la om, infecție care din cauza posibilității dezvoltării de complicații și sechele, necesită uneori tratament antimicrobian (LOPES, 2021). În Uniunea Europeană, campilobacterioza este cea mai frecvent raportată zoonoză la om, cu un număr mare de cazuri confirmate inclusiv în rândul celor mai importante categorii de animale, precum rumegătoarele mici, porcii, puii de carne, bovinele și animalele de companie (EFSA, 2022). Bacteria este adaptabilă într-un mod unic la nișe variate, provocând astfel gastroenterite severe, fiind, în unele cazuri, dificil de tratat datorită rezistenței crescute la anumite antibiotice.

În contextul în care frecvența infecțiilor virale întâlnite la om și la animalele de fermă se caracterizează printr-o continuă creștere, și datorită capacității agenților patogeni de a suferi modificări genetice într-o perioadă relativ scurtă de timp, necesitatea dezvoltării de produse farmaceutice noi care să sporească eficacitatea tratamentului antiinfecțios devine esențială (FARHADI, 2019).

Protozoarele unicelulare aparținând încrengăturii Apicomplexa, mai exact speciile incluse în genul *Eimeria*, provoacă infecții severe animalelor, asemeni coccidiozei, depistate în special în rândul păsărilor și al bovinelor (MORGOGLIONE, 2020). La nivel global, doar în industria avicolă, coccidioza

aviară este responsabilă pentru pierderi economice de peste 3 miliarde de dolari (ABDULLAHI, 2020). Mai mult decât atât, *Eimeria bovis* denotă o importanță majoră prin prisma asocierii sale cu tiflocolita severă la viței (LÓPEZ-OSORIO, 2018). În strânsă legătură cu agenții patogeni, utilizarea excesivă și nejustificată a antibioticelor în medicina veterinară și umană, dar și măsurile deficitare aplicate în prevenirea răspândirii bolilor infecțioase au cauzat creșterea semnificativă a rezistenței la compuși antimicrobieni. De asemenea, cu scopul atenuării riscurilor și consecințelor viitoare, atât abuzul administrării de antibiotice, cât și rezistența bacteriană astfel dobândită, intensifică necesitatea producerii sau a identificării de noi compuși antimicrobieni. Lipsa motivației și finanțării privind explorarea și descoperirea de noi compuși bioactivi în natură, concomitent cu nevoia de noi clase de antibiotice, reprezintă o altă problemă curentă.

Biotehnologia modernă, un domeniu în plină dezvoltare, propune alternative sustenabile la antibiotice. Cumulativ, dovezile sugerează că metaboliții naturali ai plantelor exercită proprietăți antibacteriene, antivirale, antioxidante și antiparazitare. Conform studiilor recente, amestecurile conținând compuși antimicrobieni, acizi organici și extracte din plante au demonstrat efecte promițătoare în ceea ce privește controlul dezvoltării agenților patogeni în practicile agricole și industriale. Printre aplicațiile acestor mixturi se numără utilizarea lor ca aditivi furajeri în alimentația animalelor, dovedind efecte benefice asupra sănătății intestinale, cu rol în potențarea sistemului imunitar și favorizarea creșterii în greutate, dar și în prevenirea infecțiilor cauzate de microorganismele patogene. Amestecurile din compuși antimicrobieni pot fi utilizate ca soluții de igienizare în industria alimentară, înlocuind astfel substanțele chimice nocive și alte soluții sintetice. Studiile actuale au mai arătat că amestecurile cu compuși antimicrobieni naturali care conțin extracte din plante și acizi organici pot reduce colonizarea, respectiv infecția epitelială la diferite gazde (de exemplu, monogastrice, rumegătoare și crustacee). Amestecurile cu constituenți antimicrobieni au fost recent raportate ca noi căi de acțiune în procesul antiinfecțios, dovedind potențial în fortificarea integrității epitelului gastrointestinal al gazdei și reprimarea mai multor factori asociați cu virulența bacteriană, factori precum motilitatea, sinteza polizaharidelor, pompele de eflux, aderența și invazia. Reducerea expresiei acestor factori poate atenua riscul și severitatea bolii declanșate de agenții patogeni. Cu toate acestea, majoritatea mecanismelor biologice și modul în care aceste substanțe inactivează factorii de virulență ai patogenilor rămân încă nedescifrate. Înțelegerea mecanismului biologic prin care compușii antimicrobieni derivați din surse naturale reduc infecțiile și scad inflamația epitelială este vitală atât în ceea ce privește stabilirea celor mai eficace

practici, cât și în garantarea faptului că efectul antibacterian specific este fezabil în mod constant. Explorarea și caracterizarea efectelor mixturilor antimicrobiene naturale asupra unui agent microbial/virus distinct conferă doar un fragment din imaginea de ansamblu a problemei.

De exemplu, tulpinile de *Campylobacter* pozitive pentru sistemul de secreție de tip VI (T6SS) sunt responsabile de gastroenterită, ele fiind, totodată, identificate în mod uzual la pacienții imunocompromiși. Prin urmare, devine obligatorie dezactivarea sau declanșarea funcționalității mecanismului molecular T6SS din produsele alimentare de origine animală, ca de exemplu carnea de pasăre. Un studiu recent a concluzionat că activitatea antimicrobiană a unui amestec conținând acid lactic și citric, extract de citrice, oregano și extract de semințe de struguri, poate perturba patogenitatea tulpinilor de *Campylobacter* pozitive pentru T6SS, sugerând o opțiune alternativă ca practică aplicată în controlul campilobacteriozei. *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* și *Clostridium perfringens* sunt cunoscute pentru potențialul lor de a afecta joncțiunile celulare, barierele epiteliale și de a iniția eliberarea peroxidului de hidrogen atât în spațiile intracelulare, cât și în cele extracelulare (BALTA, 2021). Creșterea peroxidului de hidrogen la nivelul citoplasmatic activează calea kinazei extracelulare reglementate de semnalul (ERK), care este responsabilă pentru generarea citokinelor pro-inflamatorii. Cascada ERK este implicată în episoadele pro-inflamatorii, fiind de regulă asociată cu inițierea infecției bacteriene. De exemplu, s-a constatat că un amestec constituit din compuși antimicrobieni conținând maltodextrină, acid citric, citrat de sodiu, acid malic, citrice și extract de măslina are efect inhibitor asupra internalizării bacteriene, demonstrând activitate de restaurare a structurilor epiteliale afectate în urma invaziei de *Salmonella*, *Clostridium* și *Campylobacter* (BALTA, 2021). Tratarea celulelor infectate cu concentrații scăzute ale amestecului menționat a indus o reducere a producției de peroxid de hidrogen, indicând un efect care păstrează echilibrul redox intestinal după expunerea la *Vibrio parahaemolyticus*, *C. jejuni*, *S. enterica* și *C. perfringens*. Mai mult decât atât, efectul antiparazitar a fost demonstrat într-un mod similar prin metode *in vitro*, ilustrând un potențial anti-criptosporidial remarcabil. Rezultatele cercetărilor privind o infecție *ex vivo* au relevat o scădere notabilă a oocisturilor de *Cryptosporidium parvum* (STRATAKOS, 2017). În mod notabil, administrarea amestecului ca supliment furajer a condus la reducerea manifestărilor de criptosporidioză la viței și la scăderea incidențelor diareice.

Identificarea de compuși biologic activi cu efecte antivirale va duce la o mai bună înțelegere a modului în care substanțele antimicrobiene naturale

inhibă virusurile și bolile cauzate de acestea. Tangeretin este o flavonă polimetoxilată care se găsește în cojile de citrice și care se caracterizează printr-un efect inhibitor asupra accesului viral în celule, blocând fuziunea virală, iar extractele de citrice au demonstrat activitate în medii diverse împotriva virusului gripei aviare (AIV), virusului bolii Newcastle (NDV) și a virusului bursitei infecțioase (IBDV) (TANG, 2018). Mai mult, vaccinurile care conțin molecule derivate din citrice au fost mai eficiente în stimularea sistemului imunitar, provocând și mai puține efecte secundare (PENNISI, 2017). Maltodextrinele, polizaharide vegetale utilizate în mod obișnuit ca aditivi alimentari, au fost utilizate ca nanoparticule în vaccin și s-a observat intensificarea activității antivirale împotriva virusului gripal (MIYAZAKI, 2017). De exemplu, acidul lactic a fost raportat ca inhibitor al replicării virale cauzat de infecția cu gripa A (H1N1). Totodată, acidul citric reprezintă un inhibitor natural puternic cu activitate antivirală și pentru virusul care cauzează febra aftoasă (FMDV) (HONG, 2015).

Odată cu creșterea cererii de produse alimentare fără antibiotice, devine absolut necesară eliminarea agenților patogeni alimentari de la diferite niveluri ale procesului tehnologic, utilizând intervenții care să evite atât utilizarea antibioticelor, cât și a produselor derivate din substanțe chimice. Progresele în cercetarea multidisciplinară dezvăluie potențial în deschiderea unor noi căi privind combinarea de compuși antimicrobieni diferiți sau de complexe antimicrobiene diverse care să producă o acțiune sinergică sau aditivă cu eventuale efecte antimicrobiene împotriva patogenilor, favorizând, de asemenea, rentabilitatea din punct de vedere economic. Pentru a valida această ipoteză și pentru o clarificare mai directă a mecanismelor antimicrobiene intrinseci, abordarea predominantă în acest domeniu constă, de regulă, în combinarea experimentelor pe modelele *in vitro* cu studii de confirmare aplicând metode *ex-vivo* și *in vivo*.

Scopuri și obiective

Prin urmare, această teză de doctorat propune să elucideze mecanismele biologice prin care amestecurile de substanțe antimicrobiene atenuează patogenitatea agenților parazitari, virali și a bacteriilor patogene alimentare utilizând infecții *in vitro*, infecții pe modele de animale și experimente *ex-vivo*.

Relevanța practică a acestei teze constă în posibilitatea obținerii și evaluării noilor produse care conțin substanțe antimicrobiene naturale, pentru a îmbunătăți siguranța alimentară, activitatea avicolă și alte sectoare agricole. Aceste produse derivate din extracte de plante și amestecate cu acizi organici sunt concepute în principal ca aditivi suplimentari care pot avea un impact pozitiv atât asupra animalelor, cât și a fermierilor. Am arătat potențialul mixturilor constituite din compuși biologic activi de a reduce colonizarea microbiotei la animale cu patogeni precum *Campylobacter*, *Salmonella*, *Clostridium*, precum și alți agenți zoonotici care, în ultimele decenii, au provocat o serie de focare de boli de origine alimentară însoțite de tulburări gastrointestinale severe. În al doilea rând, studiul nostru a arătat clar că amestecurile de compuși antimicrobieni au redus patogenitatea virală *in vitro* și au sporit eficacitatea vaccinării puilor *in vivo* prin stimularea sistemului imunitar printr-un mecanism care implică producția de acizi grași cu lanț scurt și creșterea expresiei MnSOD. Datele *in vitro* și *in vivo* demonstrează că amestecul de substanțe antimicrobiene inhibă infecțiile parazitare prin mecanisme care reduc virulența patogenului și atenuează manifestările inflamatorii ale gazdei.

Pentru a atinge scopul cercetării tezei, au fost definite mai multe obiective:

01 Obiectivul inițial al tezei a fost efectuarea unei revizuirii profunde a literaturii cu privire la principalele efecte ale unor amestecuri cu compuși antimicrobieni naturali împotriva speciilor *Campylobacter* și asemănărilor acestora cu specii aparținătoare genurilor *Salmonella*, *Listeria* și *Clostridium*, inclusiv agenții patogeni virali și paraziți. De asemenea, am revizuit cele mai recente progrese în dezvoltarea acestei tematiche, fie studiile folosind modele *in vitro*, cât și *in vivo*, concentrându-mă asupra mecanismelor biologice prin care compușii antimicrobieni își exprimă efectul antipatogen.

02 Al doilea obiectiv a constat în investigarea posibilelor mecanisme biologice care stau la baza activității antibacteriene și antipatogene a unui amestec din substanțe antimicrobiene împotriva *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* și *Clostridium perfringens* în celulele renale canine Madin-Darby Canine (MDCK). Mai mult decât atât, am emis și ipoteza că

antimicrobienele ar putea preveni ulterior stresul oxidativ indus de bacteriile menționate, putând restabili integritatea structurii celulare (joncțiunile celulare, zonula occludens-1 și ocludina) deteriorate în urma expunerii la acești patogeni.

03 Al treilea obiectiv prezentat în această teză a fost testarea *in vitro* a capacității unui alt amestec antimicrobian de a inhiba virusurile care provoacă bronșită infecțioasă (B1648), boala Newcastle (ATCC, 699), gripa aviară (H9N2, ATCC, VR-1642), sindromul reproductiv și respirator porcin (ATCC, VR-2386) și coronavirusul bovin (ATCC, VR-874). În al doilea rând, folosind un model *in vivo* cu pui de carne comercial, eficacitatea amestecului antimicrobian a fost testată împotriva bronșitei infecțioase induse artificial, prin suplimentarea apei potabile cu amestecul menționat.

04 Cel de-al patrulea obiectiv din teză a avut ca scop investigarea *in vitro* și *in vivo* a efectului antiparazitar al unui amestec de compuși antimicrobieni, împotriva *Eimeria tenella* și *Eimeria bovis*. De asemenea, în urma rezultatelor noastre *in vitro*, am examinat și impactul amestecului asupra infecției induse artificial cu *E. tenella* la puii de carne comerciali, folosind substanțe ca acid citric, citrat de sodiu, silicagel, acid malic, extract de citrice și măslina.

Analiza literaturii de specialitate, prezentată în această teză, a fost publicată într-un articol de tip Review în jurnalul Food Control (indexat ISI, având IF 6.652), iar rezultatele obținute în timpul perioadei de doctorat au fost publicate în trei articole (două în Scientific Reports Nature, ISI indexat cu IF 4.379; unul în jurnalul Gut Pathogens, indexat ISI cu IF 5.323). Unul dintre articolele originale nu a fost menționat în teză, însă a fost publicat în International Journal of Food Microbiology, jurnal indexat ISI cu IF 5.911. Mai mult, există articole trimise și în curs de revizuire la reviste indexate ISI, precum și articole care așteaptă publicarea în reviste indexate BDI.

Teza este structurată în două părți, unde prima parte include „INTRODUCERE” și „REVIZUIREA LITERATURII”, descriind incursiunea noastră în rolul compușilor antimicrobieni naturali și perspectivele lor moleculare, mecanice și anti-patogene împotriva diferiților agenți patogeni. Cel mai interesant este că prima parte a cercetării originale se bazează pe primul manuscris publicat. Acesta descrie cele mai recente descoperiri din tematica aleasă, examinând noile intervenții antimicrobiene care vizează combaterea transmiterii și colonizării speciilor *Campylobacter* și aspectele sale comune cu alte bacterii și alți patogeni. În această parte, analizăm, de asemenea, cele mai recente rezultate științifice, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, concentrându-ne pe mecanismele biologice prin care compușii antimicrobieni naturali își exercită efectul antipatogen. A doua parte a tezei este compusă din cinci Capitole, "Capitolul II, Capitolul III, Capitolul IV,

Capitolul V și Capitolul VI" și reflectă munca doctorală de cercetare în conexiunea cu trei manuscrise separate care arată și discută rezultatele obținute pe parcursul studiului de doctorat.

Primul Capitol (Capitolul III.) conform rezultatelor obținute descrie efectele antiinfecțioase și antiinflamatorii *in vitro* ale unui amestec cu substanțe antimicrobiene care conține maltodextrină, citrat de sodiu, acid citric, acid malic, extract de citrice și extract de măslină (Auraguard) împotriva infecțiilor cauzate de *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* și *Clostridium perfringens*. Capitolul III. este împărțit în alte 6 subcapitole care acoperă o secțiune de Introducere și scop (3.1.), Materiale și metode (3.2.), Rezultate (3.3.), Discuție (3.4.) și Concluzii (3.5.). Subcapitolul Materiale și metode (3.2.) este împărțit în zece subsecțiuni (de la 3.2.1. la 3.2.10.), iar secțiunea de Rezultate este segregată în alte șase subcapitole (de la 3.3.1. la 3.3.6.). Ulterior, acest capitol a fost legat de al treilea meu manuscris publicat. S-a stabilit că, concentrațiile minime subinhibitorii au fost determinate pentru *Campylobacter jejuni* (0,25%), *Salmonella enterica* (0,50%) și *Clostridium perfringens* (0,50%) necesare pentru testele de infecție *in vitro* a liniei celulare MDCK. Amestecul testat a redus semnificativ virulența celor trei agenți patogeni față de celulele MDCK și a restabilit integritatea joncțiunilor celulare prin creșterea rezistenței transepiteliale (TEER) precum și arătând niveluri mai mari de expresie ale ZO-1 (zonula occludens 1) și ale ocludinei. Acest studiu a identificat, de asemenea, calea de semnalizare ERK (kinază extracelulară reglementată) ca un mecanism cheie în blocarea producției de citokine pro-inflamatorii (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) în celulele infectate. Reducerea producției și eliberării de peroxid de hidrogen (H₂O₂) în celulele MDCK infectate, în prezența amestecului antimicrobian a fost de asemenea asociată cu mai puțin tetratationat format prin oxidarea tiosulfatului (p <0,0001). Acest studiu descrie pentru prima dată că amestecurile cu potențial antimicrobian pot preveni formarea de substraturi utilizate de patogenii bacterieni (precum tetratationatul) pentru a crește și supraviețui în medii anaerobe. Mai mult, oferim informații suplimentare despre mecanismele de invazie a patogenilor prin reabilitarea structurilor celulare și le descriem capacitatea de blocare a căii kinazei ERK-MAPK responsabilă pentru eliberarea citokinelor inflamatorii.

Următorul Capitol (Capitolul IV.) legat de rezultatele obținute, descrie activitatea antivirală a unui amestec de compuși antimicrobieni naturali, aplicând atât metode *in vitro*, cât și un model *in vivo* cu pui de carne. Analog capitolelor anterioare, Capitolul IV. este divizat în șase subcapitole care expun secțiunile Introducere și scop (4.1.), Materiale și metode (4.2.), Rezultate (4.3.), Discuție (4.4.) și Concluzii (4.5.). Subcapitolul Materiale și

metode (4.2.) este grupat în unsprezece subsecțiuni (de la 4.2.1. la 4.2.11.), iar Rezultate (4.3.) include patru subcapitole (de la 4.3.1. la 4.3.4.). Capitolul patru cumulează datele din al treilea manuscris publicat și a demonstrat *in vitro* că amestecurile antimicrobiene aplicate au exprimat activitate antivirală împotriva tuturor celor cinci virusuri testate în toate fazele procesului de infecție a celulelor gazdă. *In vivo*, amestecul antimicrobian a redus încărcătura virală din țesuturile traheale și pulmonare. De asemenea, în cadrul grupului experimental E2 căruia i s-a aplicat tratamentul cu amestecul descris, s-a observat o reducere semnificativă atât a manifestărilor clinice ale infecției, cât și a ratei de mortalitate. Toate aceste efecte au fost însoțite de o reducere semnificativă a nivelului de citokine pro-inflamatorii și de creștere a nivelurilor de imunoglobuline IgA și acizi grași cu lanț scurt în trahee și în plămâni. Studiul nostru a demonstrat că amestecurile cu substanțe antimicrobiene naturale, previn infecția virală în culturile de celule *in vitro*. În al doilea rând, *in vivo*, s-a observat o creștere a eficienței vaccinării, asigurându-se prevenirea infecțiilor virale secundare printr-un mecanism care implică creșteri semnificative în ceea ce privește producția acizilor grași cu lanț scurt și a imunoglobulinelor IgA. Sugestiv, acest studiu arată în mod clar că atât compuşii analizați, cât și amestecul AuraShield, reduc patogenitatea virală *in vitro* și sporesc eficacitatea vaccinării *in vivo*, stimulând sistemul imunitar printr-un mecanism care implică producția de acizi grași cu lanț scurt și creșterea expresiei MnSOD.

În ultimul Capitol (Capitolul V.) al tezei am demonstrat potențialul anti-Eimeria al amestecului (Auraguard) care conține componente precum clorură de sodiu, acid citric, maltodextrină, citrat de sodiu, silicagel, acid malic, extract de citrice și măslină prin testarea individuală a fiecărui compus, atât *in vitro*, cât și *in vivo*. De asemenea, Capitolul V. este divizat în șase subcapitole, și anume Introducere și scop (5.1.), Materiale și metode (5.2.), Rezultate (5.3.), Discuții (5.4.) și Concluzii (5.5.). Mai mult decât atât, subcapitolul 5.2. (Materiale și metode) este împărțit în zece subsecțiuni (de la 5.2.1. la 5.2.10.), iar subcapitolul 5.3. (Rezultate) și în cinci subsecțiuni (de la 5.3.1. la 5.3.5.). Acest capitol a fost interconectat cu ultimul meu manuscris și a demonstrat faptul că amestecul investigat reduce semnificativ ($p < 0,05$), atât individual, cât și combinat, capacitatea paraziților *E. tenella* și *E. bovis* de a infecta celulele epiteliale MDBK și CLEC-213. Totodată, eficiența de reducere a virulenței s-a dovedit similară cu cea a medicamentului anticoccidial Robenidină. În al doilea rând, prin aplicarea unui model *in vivo* la puii de carne, am demonstrat faptul că Auraguard reduce ($p = 0,001$) nivelurile de *E. tenella* din cecum și fecale excretate, precum și stresul oxidativ inflamator, îmbunătățind răspunsul imun prin reducerea stresului oxidativ și intensificând expresia de Mn-SOD și producția de acizi grași cu

lanț scurt. Nivelurile imunoglobulinelor IgA și IgM au crescut semnificativ în țesuturile cecale ale subiecților care au primit o concentrație de 0,5% Auraguard, creștere asociată cu ameliorarea manifestărilor clinice de la nivelul leziunilor tisulare ($p < 0,0001$). Această abordare profilactică a intensificat efectul antiparazitar *in vivo*, iar rezultatele au indicat faptul că administrarea începând cu zilele 0, 5 și 10 după ecloziune a avut ca efect ameliorarea manifestărilor clinice la nivel tisular ($p < 0,0001$) și a nivelurilor de excreție a paraziților ($p = 0,002$).

Concluzii generale și sugestii

1. Cererea crescândă pentru produsele alimentare fără antibiotice urgentează necesitatea eliminării agenților patogeni zoonotici alimentari de la diferite niveluri ale procesului tehnologic în producția alimentelor, prin aplicarea de intervenții care exclud utilizarea antibioticelor.

2. Primul studiu a descris pentru prima dată faptul că amestecurile de compuși antimicrobieni pot preveni formarea substraturilor care facilitează creșterea și supraviețuirea patogenilor bacterieni în medii anaerobe, precum tetracionatul. Am oferit informații suplimentare privind mecanismele de invazie a patogenilor prin restaurarea structurilor celulare și am descris capacitatea lor de a bloca calea kinazei ERK-MAPK responsabilă pentru eliberarea citokinelor inflamatorii.

3. Studiul actual elucidează mecanismul biologic care stă la baza efectelor anti-patogene și antiinflamatorii ale amestecurilor de substanțe antimicrobiene naturale. Am constatat că acest tip de amestecuri naturale au inhibat internalizarea bacteriană prin restaurarea structurilor epiteliale deteriorate de invazie. În al doilea rând, ele acționează printr-un mecanism antiinflamator care implică dezactivarea căii de semnalizare ERK prin defosforilare. Arătăm, de asemenea, că aceste mecanisme sunt similare la speciile patogene, deoarece efectele au fost observate în cazul infecțiilor cu *C. jejuni*, *S. enterica* și *C. perfringens*.

4. Studiul nostru a demonstrat că amestecurile naturale, cum ar fi AuraShield, pot preveni infecția virală în culturi de celule *in vitro*.

5. În modelul *in vivo*, s-a observat o creștere a eficienței vaccinării, asigurându-se prevenirea infecțiilor virale secundare printr-un mecanism care implică creșteri semnificative în ceea ce privește producția acizilor grași cu lanț scurt și imunoglobulinelor IgA. În consecință, în cadrul grupului experimental E2 căruia i s-a aplicat tratamentul cu amestecul descris, s-a observat o reducere semnificativă atât a manifestărilor clinice ale infecției, cât și a ratei mortalității.

6. Acest studiu a demonstrat că amestecurile de acizi organici cu extracte de citrice și mășline au redus sporularea *in vitro* a paraziților *E. tenella* și *E. bovis*. Rezultatele sugerează că aceste amestecuri modulează răspunsul imun al gazdei, reduc evenimentele oxidative din organismul gazdei supuse infecției parazitare, atenuază semnele clinice și inhibă dezvoltarea paraziților asociați cu coccidioza.

7. Aceste date indică faptul că amestecurile elaborate și descrise pot avea un impact semnificativ asupra răspunsurilor imune ale puilor de carne și ar putea fi aplicate ca alternative eficiente la nivel de fermă, luând în considerare și faptul că fiecare compus antimicrobian exercită un mod unic de acțiune.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdullahi, A. Y., et al., Effects of Dietary Supplement of Organic Acids Induced Protective Immunity against Coccidiosis. Iranian Journal of Applied Animal Science, (2020), 10(1), 119-129.
2. Agnetti, J., et al., Clinical impact of the type VI secretion system on virulence of *Campylobacter* species during infection. BMC Infect Dis, 2019. 19(1): p. 237.
3. Balta, I., et al., Antiviral activity of a novel mixture of natural antimicrobials, *in vitro*, and in a chicken infection model *in vivo*. Scientific Reports, 2020. 10(1): p. 16631.
4. Balta, I., et al., Mixtures of natural antimicrobials can reduce *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* and *Clostridium perfringens* infections and cellular inflammatory response in MDCK cells. Gut Pathogens, 2021. 13(1): p. 37.
5. Balta, I., et al., The effect of natural antimicrobials against *Campylobacter* spp. and its similarities to *Salmonella* spp, *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio* spp., *Clostridium* spp. and *Staphylococcus* spp. Food Control, 2021. 121: p. 107745.
6. Balta, I., et al., The effect of natural antimicrobials on the *Campylobacter coli* T6SS+/- during *in vitro* infection assays and on their ability to adhere to chicken skin and carcasses. International Journal of Food Microbiology, 2021. 338: p. 108998.
7. Balta, I., et al., The *in vitro* and *in vivo* anti-virulent effect of organic acid mixtures against *Eimeria tenella* and *Eimeria bovis*. Scientific Reports, 2021. 11: 16202.
8. Ch Stratakos, A., et al., The *in vitro* and *ex vivo* effect of Auranta 3001 in preventing *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* infection. Gut Pathogens, 2017. 9(1).
9. Corcionivoschi, N., et al., Mucosal Reactive Oxygen Species Decrease Virulence by Disrupting *Campylobacter jejuni* Phosphotyrosine Signaling. Cell Host & Microbe, 2012. 12(1): p. 47-59.
10. Durand, G.A., et al., Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. Int J Antimicrob Agents, 2019. 53(4): p. 371-382.
11. EFSA. (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA Journal, 20(12), e07666.
12. Farhadi, F., et al., Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. Phytotherapy Research, 2019. 33(1): p. 13-40.
13. Hellgren, J., et al., Occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium* and *Enterobacteriaceae* in raw meat-based diets for dogs. Veterinary Record, 2019. 184(14).

14. Hong, J.-K., et al., Inactivation of Foot-and-Mouth Disease Virus by Citric Acid and Sodium Carbonate with Deicers. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(21), 2015, 7610-7614. <https://doi.org/10.1128/AEM.01673-15>
15. Kelly, C., et al., The In Vitro and In Vivo Effect of Carvacrol in Preventing *Campylobacter* Infection, Colonization and in Improving Productivity of Chicken Broilers. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2017. 14(6): p. 341-349.
16. Komura, M., et al., Inhibitory effect of grapefruit seed extract (GSE) on avian pathogens. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2019.
17. Lopes, G. V., et, Virulence factors of foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 161, 105265.
18. López-Osorio, S., et al., Concomitant in vitro development of *Eimeria zuernii*- and *Eimeria bovis*-macromeronts in primary host endothelial cells. *Parasitology International*, 67(6), 2020, 742-750. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.07.009>
19. Miyazaki, T., Protective effects of lactic acid bacteria on influenza A virus infection. *AIMS Allergy and Immunology*, 2017. 1: p. 138-142.
20. Miyazato, S., et al., Continuous intake of resistant maltodextrin enhanced intestinal immune response through changes in the intestinal environment in mice. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 2015.
21. Morgoglione, M. E., et al., A 10-Year Surveillance of *Eimeria* spp. in Cattle and Buffaloes in a Mediterranean Area [Original Research]. *Frontiers in veterinary science*, 7(410). <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00410>
22. Pennisi, M., et al., Combining agent based-models and virtual screening techniques to predict the best citrus-derived vaccine adjuvants against human papilloma virus. *BMC Bioinformatics*, 18(16), 2017, 544. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1961-9>
23. Pinkerton, L., et al., Attenuation of *Vibrio parahaemolyticus* Virulence Factors by a Mixture of Natural Antimicrobials. *Microorganisms*, 2019. 7(12): p. 679.
24. Sima, F., et al., A Novel Natural Antimicrobial Can Reduce the in vitro and in vivo Pathogenicity of T6SS Positive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Chicken Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 2018. 9(2139).
25. Sima, F., et al., The effect of an antimicrobial mixture on *Cryptosporidium*. *AgroLife Scientific Journal*, 2019. 8(1): p. 227-232.
26. Stratakos, A.C., et al., In vitro and in vivo characterisation of *Listeria monocytogenes* outbreak isolates. *Food Control*, 2020. 107: p. 106784.
27. Stratakos, A.C., et al., The Antimicrobial Effect of a Commercial Mixture of Natural Antimicrobials Against *Escherichia coli* O157:H7. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2018. 16(2): p. 119-129.
28. Tang, K., et al., Tangeretin, an extract from Citrus peels, blocks cellular entry of arenaviruses that cause viral hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 2018. 160: p. 87-93.
29. World Health, O., WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. 2015, Geneva: World Health Organization.