

Impactul apiterapiei *in vitro* asupra fenomenului de antibioticorezistență la tulpinile de *Staphylococcus* spp. de la suine crescute în sistem extensiv.

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Impactul apiterapiei *in vitro* asupra fenomenului de antibioticorezistență la tulpinile de *Staphylococcus* de la suine crescute extensiv

Doctorand **Cristina Ioana Lazăr**

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



Obiectivul ONU este de a atinge o stare de sănătate optimă pentru oameni, animale și mediu, iar rezistența la antibiotice este recunoscută ca fiind o provocare "One Health", datorită apariției și diseminării rapide a bacteriilor rezistente la antibiotice în rândul oamenilor, animalelor și mediului pe scară globală (ROUSHAM, 2018). Pe lângă a fi o problemă în cadrul "One Health", AMR este de asemenea o problemă "One world". Globalizarea sistemului alimentar cu mișcarea tot mai extinsă a animalelor și a produselor agricole, combinate cu creșterea exponențială a numărului călătoriilor efectuate de oameni facilitează răspândirea și mixarea rapidă a genelor rezistente la substanțele antimicrobiene (ROBINSONA, 2016).

Agenții antimicrobieni sunt folosiți la scară largă atât în medicina veterinară cât și umană. Utilizarea intensivă a antibioticelor la animale poate promova persistența genelor de rezistență la bacterii cu potențial zoonotic sau capabile să transfere aceste gene de rezistență către agenți patogeni adaptați oamenilor, sau direct în microbiomul intestinal al acestora, prin intermediul alimentelor sau al mediului (ARGUDIN, 2017).

Deși stafilococii de origine animală, sunt comensali ai pielii și mucoaselor, aceștia nu trăiesc în izolare genetică, fiind în strânsă legătură cu o varietate de alți agenți patogeni. În acest mod, în cazul unei densități bacteriene crescute, materialul genetic poate fi transferat nu doar între stafilococii în intraspecie sau interspecie, ci și între stafilococii și alte bacterii Gram pozitive, fenomen care poartă denumirea de "schimb de genuri". Există studii care demonstrează că stafilococii pot acționa ca și donori sau receptori ai genelor de rezistență. Mai mult de atât, aceștia pot fi transferați la alte animale sau oameni, prin contact direct, sau, prin contactul cu excrețiile animalelor, prin strănut, tuse sau lins (SCHWARZ, 2018).

Prin urmare, cercetarea în domeniul și identificarea unei noi generații de antibiotice a devenit o prioritate. Cu toate acestea, testarea unui nou antibiotic înainte ca acesta să poată fi comercializat necesită o perioadă lungă de timp. Mai mult de atât limitarea utilizării lor doar la pacienții care nu răspund la produsele existente pe piață, duce la scăderea profitabilității pentru marile companii farmaceutice. Așadar dezvoltarea de noi antibiotice nu mai este considerată o activitate interesantă (COMBARROS-FUERTE, 2020).

În acest context, mierea și produsele din miere, parte importantă din punct de vedere nutritional, al proprietăților terapeutice, precum și datorită implicațiilor lor asupra sănătății și stării de igienă a oamenilor este cunoscută ca alternativă viabilă la antibiotice (STEFANIS, 2023).

Teza de doctorat intitulată "Impactul apiterapiei *in vitro* asupra fenomenului de antibioticorezistență la tulpinile de *Staphylococcus* de la suine crescute extensiv", este structurată în două părți, fiecare dintre ele cuprinzând o serie de capitole, concepute conform normelor in vigoare.

Impactul apiterapiei *in vitro* asupra fenomenului de antibioticorezistență la tulpinile de *Staphylococcus* spp. de la suine crescute în sistem extensiv.

Partea 1 intitulată "Stadiul actual al cunoașterii" este divizată în trei capitole și descrie informațiile din literatura de specialitate cu privire la apariția antibioticorezistenței, mecanismele de antibioticorezistență prezente la stafilococi, precum și produsele apicole și efectul lor antibacterian.

Primul capitol furnizează informații referitoare la apariția antibioticorezistenței, de la evoluția genelor de rezistență, până la apariția rezistenței la mai multe antibiotice (MDR).

Cel de-al doilea capitol prezintă succint, informațiile din literatura de specialitate cu privire la antibioticorezistența la stafilococi, și la mecanismele de transmitere a genelor de rezistență la aceștia.

În **capitolul al treilea** sunt prezentate informații cu privire la proprietățile antibacteriene semnificative ale produselor apicole, în special ale mierii și ale propolisului, care le transformă în candidați potențiali pentru combaterea infecțiilor bacteriene și reducerea antibioticorezistenței.

Partea a doua prezintă contribuția personală și este structurată în 7 capitole care conțin rezultatele cercetărilor proprii conform scopului și obiectivelor prezentate în **capitolul 4**.

În **Capitolul 5** se regăsesc date legate de originea probelor, protocolul de izolare și identificare a tulpinilor de *Staphylococcus* spp. În cadrul studiului au fost analizate 49 de probe provenite de pe pielea din spatele urechilor și din nările anterioare ale porcilor sănătoși crescuți extensiv, tradițional, din diferite gospodării și din care au fost izolate 40 de tulpini de *Staphylococcus* spp. Toate probele care au intrat în lucru, au fost identificate individual, iar pentru a evita confuzia, acestea au primit codificarea "PD-urmată de numărul curent, ex: PD1, PD2, PD3, etc.

Pentru izolarea tulpinilor s-au utilizat medii de cultură specifice reprezentate de agar Chapman, agar Columbia cu sânge, iar coloniile prezumtive au fost identificate pe baza caracterelor morfologice, după care s-a determinat specia bacteriană cu ajutorul dgaleriilor ApiStaph.

S-au identificat 3 specii de stafilococi, reprezentate de *Staphylococcus xylosus* izolat în procent de 47,5% din tulpinile testate, urmat de *Staphylococcus lentus* izolat în procent de 30%, și *Staphylococcus sciuri*, izolat în procent de 22,5% dintre tulpinile testate.

În **capitolul 6** este prezentată tehnica de evaluare a susceptibilității la antibiotice, antibioticele utilizate în acest studiu, precum și rezultatele testelor de susceptibilitate inițială la antibioticele utilizate toate definind profilul de antibioticorezistență al bacteriilor izolate.

În cadrul studiului au fost testată susceptibilitatea la antibiotice, pentru toate cele 40 de tulpini de stafilococi izolate de la porci, utilizându-se metoda difuzimetrică (Kirby-Bauer).

S-au aplicat 12 tipuri de antibiotice, care fac parte din clase diferite: penicilina-P10, tetraciclina-TE30, eritromicina-E30, Clindamicina-CD2, Colistin-CL25, Trimetoprim/ Sulphametoxazole-SXT25, Florfenicol-FFC30, Marbofloxacin-MAR5, Vancomicina-VA30, Meticilină-ME30, imipenemă-IPM10, Cefoxitin-FOX10.

Au fost observate cazuri multiple de rezistență la antibiotice, însă trebuie menționată o rată crescută a rezistenței la penicilină, unde 55% dintre tulpinile de stafilococi izolați au fost rezistente, urmată apoi de rezistența la tetracilină cu 30%. 10% dintre tulpinile izolate au prezentat rezistență la colistin și eritromicină, iar 7,5% au fost rezistente la Trimetoprim/ Sulphametoxazole, în timp ce la meticilină și marbofloxacin doar 2,5% dintre tulpini au fost încadrate ca fiind rezistente.

În plus, s-au identificat și tulpini cu rezistență multidrog (MDR). Indicii de rezistență multiplă la antibiotice (MAR), au fost calculați cu referire la antibioticele testate. Toate izolatele au avut un indice MAR între 0-0,58, și niciunul nu a avut un indice MAR=1.

Indicii de rezistență multiplă la antibiotice au fost sub 0,2 în 31 dintre cele 40 de tulpini de bacterii studiate. Cu toate acestea, 10% dintre tulpini au fost rezistente sau foarte rezistente (MAR 0,25; 0,33 și 0,58), prezentând un risc pentru animale, îngrijitori și mediu. În mod similar, acestea ar putea reprezenta o sursă pentru contaminarea ulterioară a contactilor și răspândirea rezistenței în jurul fermelor în care au fost crescuți porcii.

Cei mai crescuți indici MAR au fost detectați la PD40 reprezentat de *Staphylococcus lentus* (0,58), PD30 reprezentat de *Staphylococcus xylosus* (0,33) și PD7 reprezentat de o altă tulpină de *Staphylococcus lentus* (0,25).

În capitolul 7 sunt evaluate proprietățile antibacteriene ale produselor apicole testate. Au fost analizate ca atare, mierea de rapiță și mierea polifloră, iar propolisul a fost analizat în cele două concentrații diferite de 20% și 30%, determinându-se conținutului total de polifenoli și capacitatea antioxidantă.

Conținutul total de polifenoli variază semnificativ între probele de miere și propolis, cu valori cuprinse între 231,52 mg GAE/100 g și 344,29 mg GAE/100 g. Valoarea cea mai mare a fost înregistrată pentru propolis în concentrație de 20%, iar la mierea de rapiță s-a înregistrat cea mai scăzută valoare, 231,52 mg GAE/100 g.

Capacitatea antioxidantă a variat și ea, cu valori cuprinse între 94,06 RSA (%), în cazul propolisului de 20%, cea mai mică valoare fiindu-i atribuită mierii poliflore cu 18,67 RSA (%).

Impactul apiterapieii *in vitro* asupra fenomenului de antibioticorezistență la tulpinile de *Staphylococcus* spp. de la suine crescute în sistem extensiv.

S-a demonstrat științific că nivelul concentrației compușilor fenolici și activitatea antioxidantă dintr-o proba de miere sau propolis sunt corelate cu potențialul lor antimicrobian. Astfel, cu cât conținutul fenolic și activitatea antioxidantă sunt mai ridicate, cu atât este mai înalt potențialul antibacterian (ISPIRYAN, 2024).

În **capitolul 8** s-a descris testarea activității antimicrobiene a produselor apicole împotriva tulpinilor de stafilococi izolate. Acest capitol cuprinde etapele de descriere a protocolului experimental, urmat de rezultate și discuții.

Pentru a evalua activitatea antimicrobiană a produselor apicole (miere de rapiță, miere polifloră, propolis de 20% și propolis de 30%), împotriva tulpinilor de *Staphylococcus* spp., s-a realizat atât expunerea directă la produsele apicole nediluate cât și expunerea la produse apicole de concentrații diferite. Ulterior, aceste tulpini au fost testate și cu antibioticele inițiale pentru a observa eventuale schimbări în susceptibilitatea lor antimicrobiană.

În prima etapă s-a efectuat tehnica difuzimetrică în gel de agar Kirby-Bauer. Suspensia bacteriană a fost pregătită cu o densitate de 0.5 McFarland. Cu ajutorul unui tampon steril îmbibat în soluția bacteriană, excesul de lichid fiind îndepărtat, cultura bacteriană a fost însămânțată pe suprafața plăcii conținând agar Mueller Hinton, după care plăcile au fost lăsate 10 min pentru zvântarea suprafeței. După ce plăcile s-au uscat, cu ajutorul unui perforator steril (6mm diametru) s-au efectuat godeuri în agar la aproximativ 2 cm unul de celălalt.

Folosind o pipetă a fost adăugată mierea de cele două tipuri: miere de rapiță și miere polifloră și cele două concentrații diferite de propolis (de 20 și 30%) în fiecare godeu după care plăcile au fost incubate la temperatura de 37°C timp de 24 de ore.

Cea mai mare zonă de inhibiție a fost de 22mm, la tulpina de *Staphylococcus xylosus* (PD30) și 20 mm la tulpina *Staphylococcus xylosus* (PD23) expuse la mierea de rapiță, sugerând o eficacitate antimicrobiană superioară în comparație cu celelalte produse testate. În cazul mierii poliflore și al propolisul de 20% cea mai mare zonă de inhibiție a fost de 17mm, iar în cazul propolisul de 30%, cea mai mare zonă de inhibiție a fost de 16mm. Aceasta indică, comparativ, prezența în mierea de rapiță a unor compuși bioactivi puternici care pot inhiba eficient creșterea stafilococilor.

În etapa următoare a studiului s-a efectuat expunerea tulpinilor de stafilococi la 10% miere de rapiță și polifloră, și la propolis. Pentru testarea activității mierii și propolisului pe izolate bacteriene au fost folosite următoarele formule: pentru miere: 9,9ml bullion Mueller Hinton+1,1 ml miere+0,01 ml suspensie bacteriană, iar pentru propolis: 9,9ml bullion Mueller Hinton+0,01 ml propolis 20% sau 30%+ 0,01 ml suspensie bacteriană

După omogenizare acestea au fost incubate la temperatură de 37°C, timp de 24 ore, după care s-au însămânțat pe agar nutritiv și au fost testate pentru rezistența față de antibiotic, utilizând tehnica Kirby Bauer.

S-au înregistrat și analizat rezultatele obținute în urma acestor testări și s-au comparat cu rezultatele inițiale.

Nouă din cele 30 de tulpini expuse la mierea polifloră au fost inhibitate complet, 3 tulpini testate după expunerea la mierea de rapiță și la propolis 20%, au fost de asemenea inhibitate complet, iar propolisul de 30% a inhibat complet doar o singură tulpină de stafilococ.

Tabel 1 Privire generală privind compararea rezultatelor obținute față de cele inițiale.

	CL25	E30	SXT25	P10	FFC30	VA30	TE30	MAR5	FOX30	CD2	ME30
Miere de rapiță	+12 mm	+10 mm	+10 mm	+10 mm	+12 mm	+14 mm	+12 mm	+10 mm	+15 mm	+10 mm	+10 mm
Miere polifloră	+12 mm	+11 mm	+13 mm	+10 mm	+14 mm	+14 mm	+12 mm	+9 mm	+10 mm	+11 mm	+12 mm
Propolis 20%	+8 mm	+13 mm	+14 mm	+12 mm	+14 mm	+15 mm	+11 mm	+12 mm	+15 mm	+10 mm	+14 mm
Propolis 30%	+7 mm	+13 mm	+13 mm	+15 mm	+14 mm	+11 mm	+12 mm	+12 mm	+15 mm	+14 mm	+14 mm

Tabel2. Procentul de tulpini testate pentru care s-a modificat încadrarea din rezistent în sesibil

%	CL25	E30	SXT25	P10	FFC30	VA30	TE30	IPM5	MAR5	FOX30	CD2	ME30
Miere de rapiță	0	0	3,84	19,23	0	0	23,07	0	0	3,84	0	3,84
Miere poli-floră	0	0	5	40	5	0	25	0	0	5	0	5
Propolis 20%	0	0	3,84	8	0	0	19,23	0	0	3,84	0	3,84
Propolis 30%	0	0	3,57	35,71	0	0	21,42	0	0	3,57	0	3,57

Rezultatele au relevat impactul apiterapiei, în diferite concentrații, asupra susceptibilității tulpinilor de *Staphylococcus* spp. la antibiotice.

În urma tuturor testărilor s-a observat că produsele apicole utilizate în studiu, dețin capacitatea de a crește susceptibilitatea la toate antibioticele testate. Totuși nici o

Impactul apiterapiei *in vitro* asupra fenomenului de antibioticorezistență la tulpinile de *Staphylococcus* spp. de la suine crescute în sistem extensiv.

tulpină dintre cele testate care nu a dezvoltat zonă de inhibiție la antibiograma inițială, nu a devenit sensibilă sau intermediar sensibilă în urma aplicării tratamentului cu produsele apicole.

În funcție de antibioticul testat, s-au observat diferențe semnificative, astfel că la tetraciclină și vancomicină au fost înregistrate cele mai multe diferențe în ceea ce privește diametrul zonei de inhibiție a tulpinilor tratate cu produse apicole, față de antibiograma inițială.

Concluziile generale care se desprind din lucrarea intitulată: "Impactul apiterapiei *in vitro* asupra fenomenului de antibioticorezistență la tulpinile de *Staphylococcus* de la suine crescute extensiv", se regăsesc în **capitolul 9**.

Rezultatele acestui studiu au indicat că distribuția tulpinilor izolate este neașteptat de restrânsă (trei specii: *Staphylococcus xylosus* 43,34%; *Staphylococcus sciuri* 33,33%; *Staphylococcus lentus* - 26,66%).

Deși indicele MAR a fost relativ scăzut la 90% dintre tulpini (0 la 26,7%, 0,08 la 20% și 0,16 la 43,3% dintre tulpini), 10% dintre tulpini au fost rezistente sau foarte rezistente (MAR 0,25; 0,33 și 0,58) sugerând un risc crescut pentru animale, îngrijitori și mediu. În mod similar, acestea ar putea reprezenta o sursă pentru contaminarea ulterioară a contactelor și răspândirea rezistenței în jurul fermelor în care au fost crescuți porcii

Rezistența crescută observată față de penicilinei, urmată de tertraciclină se justifică, aceste antibiotic fiind cu aplicarea cea mai extinsă în diferitele patologii la suine, în timp ce pentru colistina și eritromicină rezistența a fost mai mică.

În acest studiu, expunerea *in vitro* a tulpinilor bacteriene la miere sau propolis a condus la o creștere semnificativă ($p < 0,05 - 0,001$) a dimensiunii zonei de inhibiție în comparație cu evaluarea inițială a rezistenței/sensibilității. Rezultatele au fost influențate în funcție de tipul de produs și concentrația utilizată.

Atât mierea cât și propolisul au demonstrat proprietăți antibacteriene semnificative. Ambele substanțe au reușit să inhibe creșterea stafilococilor, indicând potențialul lor în combaterea infecțiilor bacteriene.

Antibiograma efectuată înainte și după tratamentul cu miere și propolis a relevat o modificare semnificativă a sensibilității a bacteriilor testate. Tulpinile care inițial prezentau rezistență au devenit sensibile la antibioticele uzuale, sugerând că tratamentul cu miere și propolis poate reduce rezistența bacteriană

Capitolul 10 subliniază originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei:

Este un studiu care a investigat stafilococii izolați de la porcii sănătoși, evaluând inițial rezistența acestora la antimicrobiene, și ulterior tratând tulpinile cu produse apicole (miere polifloră, miere de rapiță, propolis 20% și propolis 30%), pentru a observa schimbările în rezistența lor la antibioticele inițiale. Această abordare este inovativă și

oferă contribuții semnificative în domeniul microbiologiei precum și al terapiei infecțiilor bacteriene.

Studiul se înscrie într-un context agricol specific, unde utilizarea antibioticelor este frecventă, iar supravegherea rezistenței la antimicrobiene este crucială.

Studiul oferă date importante privind profilurile de rezistență ale stafilococilor de la porci la diverse antibiotice, informațiile fiind esențiale datorită contactului strans proprietar/îngrijitor în sistemul extensive atât pentru gestionarea corectă a infecțiilor în cadrul fermelor cât și pentru prevenirea transmiterii rezistenței la oameni.

Aplicarea produselor apicole (miere polifloră, miere de rapiță și propolis) este inovativă, având în vedere proprietățile antimicrobiene cunoscute ale acestor substanțe, dar încă insuficient studiate în contextul stafilococilor rezistenți de origine animală.

Studiul este inovativ deoarece compararea efectelor celor două tipuri de miere (de rapiță și polifloră) și propolis (20%, și 30%) adaugă un element original studiului, evidențiind variațiile în eficacitatea produselor apicole
