
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Fitoterapii alternative în condiționarea microbiomului de portaj și a răspunsului imun la suine

Doctorand **Laura Andreea Rusu**

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



În România, creșterea porcilor în ferme mici, cu sisteme extensive, este prevalentă datorită tradițiilor și preferinței pentru autoaprovizionare.

Totuși, acest tip de creștere implică multiple riscuri, inclusiv probleme de bunăstare animală și biosecuritate, care pot afecta sănătatea porcilor și a îngrijitorilor.

Factorii externi, precum contactul cu mediul și suprapopularea, cresc susceptibilitatea la boli. De asemenea un rol important îl joacă și microbiomul de portaj, a cărui floră bacteriană, în condiții corespunzătoare își poate modifica patogenitatea și să determine îmbolnăviri. Caracterizarea acestuia și a gradului de antibioretistență a tulpinilor izolate are un rol important în terapia și prevenția bolilor, cât și în stabilirea implicării acestora ca rezervor de gene de rezistență.

Pentru a proteja sănătatea porcilor și a reduce utilizarea excesivă a antibioticelor, cercetările se concentrează pe utilizarea plantelor medicinale cu efecte imunostimulante și antimicrobiene, oferind alternative naturale în prevenția și tratamentul bolilor.

Teza de doctorat intitulată "Fitoterapii alternative în condiționarea microbiomului de portaj și a răspunsului imun la suine", este structurată în două părți, fiecare cuprinzând o serie de capitole, concepute conform normelor în vigoare.

Partea 1 intitulată "Stadiul actual al cunoașterii" este divizată în trei capitole și descrie informațiile din literatura de specialitate cu privire la conceptul de microbiom de portaj și a componenței sale la suine, particularitățile sistemului imun al suinelor, descrierea influenței mediului asupra stării de sănătate a porcinelor, precum și descrierea unor plante cu rol medicinal, privind componența acestora și potențialul lor antimicrobian și imunostimulator.

Primul capitol furnizează informații din literatură privind descrierea generală a microbiomului de portaj al porcinelor, componența sa la nivelul învelișului cutanat, precum și la nivelul mucoaselor cele mai studiate și detaliate în literatura de specialitate (mucoasa bucală și palatină, și mucoasa intestinală).

Cel de-al doilea capitol prezintă informații din literatura de specialitate cu privire la sistemul imun și particularitățile acestuia la suine, precum și rolul unor factori de mediu în influența răspunsului imun al porcinelor.

În **capitolul al treilea** sunt prezentate informații cu privire la utilitatea utilizării plantelor medicinale în terapie și a potențialului lor imunostimulator și antimicrobian.

Partea a doua este reprezentată de contribuția personală și este structurată în 6 capitole care conțin rezultatele cercetărilor proprii conform scopului și obiectivelor prezentate.

În **Capitolul 4** se regăsesc date legate de scopul utilizării unor plante medicinale, precum cățina, gălbenelele, cimbrul, usturoi, coriandru sau dovleac, în experimentul realizat și identificarea compușilor activi ale acestora, pentru stabilirea

utilității lor în fitoterapie. S-a determinat astfel concentrația în polifenoli a unui sirop de cătină luat în studiu, cât și compoziția compușilor bioactivi și concentrația acestora din extracte alcoolice de gălbenele, cimbru, usturoi, coriandru și dovleac. Datorită conținutului în polifenoli, tocoferoli, steroli, sulfoxide și flavone metoxilate (în concentrații specifice fiecărei plante) a plantelor studiate, ce sunt compuși bioactivi cunoscuți pentru efectele lor antioxidante, imunostimulante și antimicrobiene, s-a decis introducerea în studiu al acestora, pentru a stabili efectele fitoterapiei la porci.

În **capitolul 5** sunt prezentate date despre originea probelor, a protocolului fitoterapeutic abordat, precum și s-a evaluat imunitatea mediată celular *in vitro* la suine, înainte și după aplicarea schemelor de fitoterapie, pentru a putea evalua efectul imunostimulator al plantelor medicinale luate în studiu. Acest capitol cuprinde etapele de descriere a protocolului experimental, urmat de rezultate și discuții.

Într-o primă etapă s-au recoltat probe de sânge de la 9 suine clinic sănătoase, de aceeași vârstă, crescute în sistem extensiv, în gospodării diferite, ce concomitent au fost supuse terapiei cu sirop de cătină (denumit lot A). Pentru o mai bună analiză a datelor, acestea au fost împărțite în 2 grupuri, unul tratat (n = 5) și celălalt martor (n = 4). În cea de a doua etapă au fost incluși în studiu 30 de porci clinic sănătoși, provenind din aceeași exploatare, de la care au fost recoltate probe de sânge (denumit lot B). Concomitent aceștia au fost tratați cu pudră de gălbenele și cimbru. Pentru o mai bună coroborare a datelor, porcinele au fost lotizate în tratați (n = 15) și martori (n = 15). De asemenea fiecare lot a fost divizat în grupe de vârstă: purcei, grăsuți și scroafe. Toate probele intrate în lucru au fost identificate individual, în funcție de segmentul de testare și grupa de vârstă, urmat de număr curent, pentru a evita confuzia.

Acest protocol a evaluat răspunsul proliferativ *in vitro* al leucocitelor mononucleare la mitogeni vegetali (extracte vegetale), care stimulează nespecific aceste celule, prin măsurarea consumului de glucoză ca indicator al activității celulare.

Astfel au fost recoltate probe de sânge de la toți porcii luați în studiu și supuse testului de transformare leucocitară blastică, prin care s-a măsurat procentul de stimulare al unor extracte vegetale. În cazul lotului A au fost utilizate 7 extracte vegetale alcoolice (*Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea*, *Hippophae rhamnoides*, *Thymus vulgaris*, *Vaccinium myrtillus*, *Sylibum marianum*, *Arnica montana*) și 2 extracte hidro-alcoolice (*Hippophae rhamnoides*, *Betula* spp.), iar în cazul lotului B au fost utilizate 5 extracte vegetale (*Calendula officinalis*, *Satureja hortensis*, *Allium sativum*, *Coriandrum sativum* și *Cucurbita pepo*) a căror compoziție a fost studiată anterior. Indicii de stimulare/inhibare (BTI%) au fost stabiliți prin măsurarea concentrației de glucoză rămase în mediul de testare.

În cazul lotului A s-a observat la testarea înaintea administrării siropului de cătină un răspuns de stimulare a extractelor vegetale, valorile cele mai crescute fiind în cazul *Echinacea purpurea* (71.42%). De asemenea solventul a influențat răspunsul față

de mitogene, extractul alcoolic fiind mai activ decât cel hidro-alcoolic (în cazul cătinei folosite *in vitro* – 61.76% extract alcoolic și 60.88% extract hidro-alcoolic). Cel mai slab efect stimulatv l-a prezentat extractul alcoolic de *Arnica montana*, cu un procent de stimulare de 54.06%. Testul a fost repetat și după aplicarea protocolului terapeutic, pentru a putea observa dacă cătina are impact asupra răspunsului imun.

La a doua testare se poate observa o creștere a indicelui de blastizare spontană, răspunsul la mitogenele clasice a crescut, iar extractele vegetale utilizate *in vitro* au stimulat un răspuns crescut în special față de *Echinacea purpurea* (84.85%, comparativ cu un procent de 70.42% la prima testare). Cel mai slab răspuns a putut fi observat la extractul de *Thymus vulgaris*, cu un procent de stimulare de 68.73%.

Analiza statistică a datelor obținute indică că tratamentul cu cătină a dus la o creștere semnificativă a procentului de stimulare, în timp ce rezultatele obținute la lotul martor nu au prezentat relevanță statistică.

Tabelul 1. Semnificația statistică a creșterii BTI la grupul tratat după terapia cu sirop de cătină, comparativ cu martori

		M	PHA	Alc	Ea	Ep	Cat1	Thy	Vm	Sy	Ar	Cat2	Mest
T	t	0.02	0.03	0.13	0.03	0.02	0.01	0.02	0.01	0.15	0.04	0.01	0.16
	Semn.	sign	sign	non-sign	sign	sign	sign	sign	sign	non-sign	sign	sign	non-sign
C	t	0.28	0.2	0.1	0.32	0.01	0.42	0.19	0.31	0.48	0.27	0.25	0.15
	Semn.	non-sign	non-sign	non-sign	non-sign	sign	non-sign	non-sign	non-sign	non-sign	non-sign	non-sign	non-sign

Legenda: T=tratată, C=control

Indicii de blastizare corespunzători lotului B, au fost testați pe grupe de vârstă, suinele fiind divizate în 3 categorii: porcei, grăsuți și scoafe. Testarea s-a efectuat înainte de administrarea *in vivo* a produselor din plante cu rol medicinal, pentru a observa dacă extractele de plante luate în studiu au un efect pozitiv asupra indicilor de blastizare.

În cazul probelor recoltate de la porcei s-a observat un răspun pozitiv la mitogenul clasic, însă toate extractele de plante, cu excepția *Calendula officinalis*, au prezentat un efect inhibitor. La grăsuți rezultatele BTI față de mitogenele extractelor vegetale sunt mai mari decât în cazul porceilor, însă mai mici decât cele a mitogenului clasic. La această categorie extractul de usturoi a stimulat creșterea celulară în comparație cu controlul netratat, dar nesemnificativ în comparație cu solventul control. Valorile BTI la scoafe au fost sub cele ale martorului netratat pentru toate extractele de plante testate. Datorită activității slabe de stimulare a mitogenelor obținute din extractele vegetale studiate, testarea acestora post-tratament nu s-a mai realizat.

Rezultatele au indicat diferențe semnificative statistic între grupele de vârstă, la valori p foarte scăzute pentru majoritatea extractelor de plante, indicând o dependență clară de categoria de vârstă.

Tabelul 2. Valori P pentru semnificația statistică a diferențelor dintre categoriile experimentale

	M	PHA	Alco	<i>Calendula</i>	<i>Satureja</i>	<i>Allium</i>	<i>Coriandrum</i>	<i>Cucurbita</i>
Purcei vs. grăsuți	0.00016	0.017	0.000016	0.18 NS	0.00002	0.00002	0.0002	0.0022
Grăsuți vs. scoafe	0.1982 NS	0.8285 NS	0.0066	0.0359	0.0071	0.0013	0.0003	0.0001
Purcei vs. scoafe	0.06573 NS	0.0254	0.0238	0.14094	0.00347	0.04609	0.28475 NS	0.10603 NS

Legenda: NS=ne semnificativ

Comportamentul de stimulare *in vitro* a extractelor vegetale în urma aplicării protocolului terapeutic la lotul A, dovedește efectul imunostimulant al cătinei și este încurajator pentru eventuala asociere a unor extracte. În ceea ce privește lotul B, s-a observat că la grăsuți și scoafe extractele de usturoi și cimbru au prezentat cea mai mare îmbunătățire a răspunsului celular *in vitro*. Comparând rezultatele obținute la grăsuți și scoafe cu cele ale purceilor mai puțin receptivi, s-a observat că toate plantele au acționat într-o manieră dependentă de vârstă.

În **capitolul 6** sunt descrise metodele de izolare și identificare a microbiomului de portaj al suinelor, de la nivel cutanat și al mucoasei bucale. Totodată s-a observat influența plantelor utilizate asupra microbiomului. Studiul a fost realizat în 2 etape, ante și post tratament fitoterapeutic. Pentru izolarea tulpinilor s-au utilizat ca medii de cultură bulionul nutritiv și agarul nutritiv. După izolare s-au efectuat colorații Gram pentru stabilirea caracterelor morfologice și s-au efectuat testele catalazei și oxidazei, pentru stabilirea caracterelor biochimice ale coloniilor izolate.

Pentru stabilirea speciei bacteriene s-au utilizat teste microbiologice speciale, precum testul API, testul Remel RapID ONE și testul Remel RapID Staph Plus.

În cazul lotului A, pe baza caracterelor morfologice și a testelor speciale, s-au identificat următoarele tulpini bacteriene, la testarea înainte de administrarea siropului de cătină: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warneri* și *Kytococcus sedentarius*. Testarea după administrarea siropului de cătină a rezultat în izolarea de specii bacteriene cu aceleași caractere morfo-funcționale, deducând că siropul de cătină nu a avut impact asupra microbiomului de la nivel cutanat.

În cazul lotului B, pe baza caracterelor morfo-funcționale și a testelor speciale, s-au izolat în ziua 0 de testare tulpini bacteriene din încrengătura *Bacillota*, într-o proporție de 57.89% din totalul tulpinilor izolate, încrengătura *Pseudomonadota*, în proporție de 40.78% și încrengătura *Actinomycetota*, în proporție de de 1.31%. Cele mai frecvent izolate tulpini bacteriene se încadrează în genurile *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Streptococcus* și *Staphylococcus*.

De asemenea s-a efectuat recoltare de probe și izolare în ziua 14 de la debutul experimentului și s-au observat schimbări ale florei microbiene de la nivel bucal. În cazul suinelor ce au primit pudră de gălbenele și cimbru s-a remarcat scăderea proporției de tulpini izolate din încrengătura *Bacillota*. De asemenea s-a remarcat creșterea ponderii izolatelor bacteriene din încrengătura *Pseudomonadota*, consecință a scăderii celor din încrengătura *Bacillota*.

Pentru a observa dacă acest trend inhibitor al plantelor medicinale se păstrează la suinele tratate, s-a efectuat prelevare de probe și izolare bacteriană și în ziua 28 a experimentului. În ziua 28 s-a observat o revenire la ponderile inițiale ale tulpinilor bacteriene din cele 3 încrengături menționate. Rezultă astfel caracterul inhibitor temporar al administrării de gălbenele și cimbru în hrana porcinelor.

Analizând comparativ statistic valorile ponderilor tulpinilor izolate în ziua 0 față de celelalte etape de recoltare și izolare, reiese un rezultat de 0.274 între ziua 0 și 14, și 0.362 între ziua 0 și 28. Valorile obținute nu au relevanță statistică, datorită caracterului temporar și selectiv asupra tulpinilor izolate a plantelor medicinale utilizate.

În **capitolul 7** este prezentată tehnica de evaluare a susceptibilității la antibiotice a tulpinilor izolate, antibioticele utilizate în acest studiu, rezultatele testelor de susceptibilitate inițială la antibioticele utilizate, definirea profilul de antibioticorezistență al bacteriilor izolate și monitorizarea reprofilării acestuia în cazul suinelor ce au făcut parte din loturile tratate.

În cadrul acestui studiu a fost testată inițial susceptibilitatea la antibiotice a tuturor tulpinilor bacteriene izolate de pe pielea porcilor și a mucoasei cavității bucale, prin metoda difuzimetrică Kirby-Bauer. Ulterior s-a efectuat testarea susceptibilității la antibiotice a tulpinilor izolate de la nivelul mucoasei bucale a suinelor din lotul B, grupa tratați, în ziua 14 de experiment, când au fost observate modificări ale componenței microbiomului de portaj de la acest nivel.

În cazul lotului A s-au aplicat 9 tipuri de antibiotic: gentamicină-GN, tulatromicină-TUL, cefotaxime-CTX, doxiciclină-DO, streptomycină-S, amoxicilină cu acid clavulanic-AMC, marbofloxacină-MAR, oxitetraciclină-T și tilozină-TY. În cazul lotului B s-au aplicat 7 tipuri de antibiotic: amoxicilină-AMX25, ampicilină-AMP30, cloramfenicol-C30, oxitetraciclină-T30, tulatromicină-TUL30, eritromicină-E30 și

enrofloxacină-E5. Acestea au fost selectate în funcție de utilizarea lor în arealul de testare.

În cazul lotului A a fost observată prezența de colonii bacteriene rezistente, însă dacă se efectuează analiza indicelui MAR, egal cu 33,33%, nu se poate conchide prezența în număr crescut de tulpini rezistente. Totuși, la analiza pe clasă de antibiotic, se remarcă o eficiență scăzută a oxitetraciclinei, unde 75% din tulpini sunt rezistente. Dintre toate tulpinile izolate *Shigella* spp. s-a dovedit a fi cea mai rezistentă, fiind clasată ca tulpină cu rezistență multidrog (MDR), prezentând risc pentru animale și îngrijitori. Totodată toate tulpinile izolate s-au dovedit a fi rezistente la diferite clase de antibiotice, cu indici MAR variind între 0.22 și 0.33.

În cazul lotului B în ziua 0 de testare a fost remarcată prezența de tulpini rezistente, dar și tulpini sensibile la antibioticele testate. Făcând analiza pe clase de antibiotic, s-a putut observa că cele mai potente antimicrobiene au fost cloramfenicolul și enrofloxacina, cu un procent de rezistență de 0%. În schimb în cazul eritromicinei s-a putut observa un procent de rezistență de 63.63%. Dintre tulpinile izolate cele mai rezistente au fost *Enterobacter* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Rahnella aquatilis* și *Vibrio parahaemolyticus*. Indicele MAR calculat pentru testele de susceptibilitate la antibiotice în ziua 0 a fost de 0.225 (procent de 22.72%).

În ziua 14 s-au efectuat testări în vederea stabilirii nivelului de antibioticorezistență a tulpinilor izolate de la porcinele a căror hrană a fost suplimentată cu gălbenele și cimbru. Precum în ziua 0, cele mai potente antibiotice au fost cloramfenicolul și enrofloxacina, cu procent de rezistență de 0%. Spre deosebire de ziua 0 s-a remarcat creșterea procentului de rezistență în cazul ampicilinei, cu un procent de rezistență de 58.82%. În cazul eritromicinei rezultatele au fost asemănătoare cu ziua 0. Cea mai rezistentă tulpină izolată a fost *Citrobacter freundii*. Indicele MAR calculat în ziua 14 a fost de 0.23, cu 0.005 mai mare decât în ziua 0, diferență nesemnificativă statistic. Aceste rezultate sunt datorate efectului selectiv al plantelor medicinale, inhibând tulpinile Gram pozitive, ce a favorizat dezvoltarea tulpinilor Gram negative.

Concluziile generale care se desprind din lucrarea intitulată: "Fitoterapii alternative în condiționarea microbiomului de portaj și a răspunsului imun la suine", se regăsesc în **capitolul 8**.

Bogăția în principii active a plantelor medicinale luate în studiu a plecat pentru utilizarea lor sub diferite forme, pentru stabilirea utilității lor în terapie, fie ca antimicrobiene, fie ca imunomodulatoare.

Au fost observate diferențe în cazul reactivității leucocitelor față de tratamentul *in vitro* cu extracte alcoolice ale plantelor luate în studiu. În timp ce extractele de cătină au avut un potent efect stimulator, rezultatele obținute în cazul celorlalte extracte vegetale nu indică un efect stimulator puternic.

Au fost observate diferențe ale microbiomului de portaj, dependent de localizarea acestor tulpini la nivelul organismului (înveliș cutanat sau mucoasă bucală), dar și de localizarea fermelor luate în studiu. Componența microflorei bacteriene a depins de vârsta animalelor, de momentul recoltării probelor și de terapia aplicată porcinelor.

Cu toate că indicele MAR nu a fost crescut (indice MAR lot A egal cu 0.275, indice MAR lot B în ziua 0 egal cu 0.225 și indice MAR lot B în ziua 14 egal cu 0.23), se poate observa o rezistență crescută a unor specii bacteriene la anumite antimicrobiene, ce sugerează un risc crescut pentru suine și îngrijitori. În mod similar, acestea ar putea reprezenta o sursă pentru contaminarea ulterioară și răspândirea rezistenței în jurul fermelor de porci.

Rezistența crescută observată față de oxitetraciclina cu o rezistență de 75% și tilozina cu o rezistență de 50% în cazul tulpinilor izolate de la lotul A; eritromicină cu o rezistență de 58.258%, ampicilina cu o rezistență de 58.82% în cazul tulpinilor izolate de la lotul B impun excluderea din terapia curentă a acestora.

În timp ce cățina nu a produs modificări la nivelul florei microbiene de la nivel cutanat și a nivelului de antibioticorezistență, administrarea de pudră de *Calendula officinalis* și *Satureja hortensis* a determinat modificări post administrare asupra florei de la nivel bucal și al antibioticorezistenței.

Capitolul 9 subliniază originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei:

Este un prim studiu care a investigat și caracterizat componența microbiomului de portaj de la nivel cutanat și al mucoasei bucale de la suine clinic sănătoase, din arealul de studiu, evaluând răspunsul și modificările survenite de acesta în cazul introducerii în dieta porcinelor a unor plante medicinale (cătină, gălbenele, cimbru).

Această cercetare pune la dispoziție date cruciale privind profilul de rezistență a bacteriilor ce fac parte din flora normală de la nivel cutanat și al mucoasei bucale de la suine crescute în sistem extensiv, necesare gestionării eficiente a infecțiilor apărute în ferme și în prevenirea transmiterii de agenți patogeni, purtători de gene de rezistență, dar și modificările survenite de acestea în cazul administrării de plante cu rol medicinal.

Studiul este inovativ prin evidențierea variabilității efectului antimicrobian și imunostimulator al acestor plante, având în vedere că s-a pronunțat un puternic efect imunostimulant al căținei și un efect antimicrobian selectiv și temporar al gălbenelelor și cimbrului.