



# Raport/Studiu

## Obținerea unui model de rezistență la agenți antimicrobieni *in vivo*

efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Colectiv de redacție:

Coordonatori: Prof. dr. Gabriela Tănăsie

Membri: Doctorand Gaspar Cristina și Dr. Ioan Huțu

Data finalizării: 15.11.2020

### **Acknowledgements**

Activities under this work were carried out in the *Oncogen Research Center* - financed by project "*A bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance*", in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD-2017.



## 1. Modelul mamar murin – studiul strategiilor de control în infecțiile glandei mamare

Modelul mamar murin este utilizat cu succes, atât în studiul patogenezei mamitelor, cât și pentru evaluarea diferitelor strategii de control în infecțiile glandei mamare. În Figura 1 este ilustrată o prezentare generală a diferitelor măsuri curative și preventive, testate de-a lungul timpului, pe acest model animal.

Indiferent de compusul studiat, cea mai frecvent utilizată cale de administrare este cea intramamară. Însă a fost testată și ruta parenterală (subcutanată, intramusculară sau intraperitoneală), pentru a evalua capacitatea diferiților agenți antimicrobieni de a se concentra la locul infecției (Brouillette E, et al., 2004). În cazul modelului murin, calea parenterală este mai ușor de abordat, întrucât administrarea intramamară poate fi îngreunată de formarea unui dop de keratinocite la nivelul orificiului papilar (Notebaert S. et al., 2006). În schimb, în urma investigațiilor bibliografice întreprinse, nu am identificat niciun studiu care să abordeze calea cutanată (ex. unguente) sau metoda scufundării mamelonului în soluția de cercetat, ca și potențială cale de administrare a preparatelor de interes, la modelul mamitic murin.

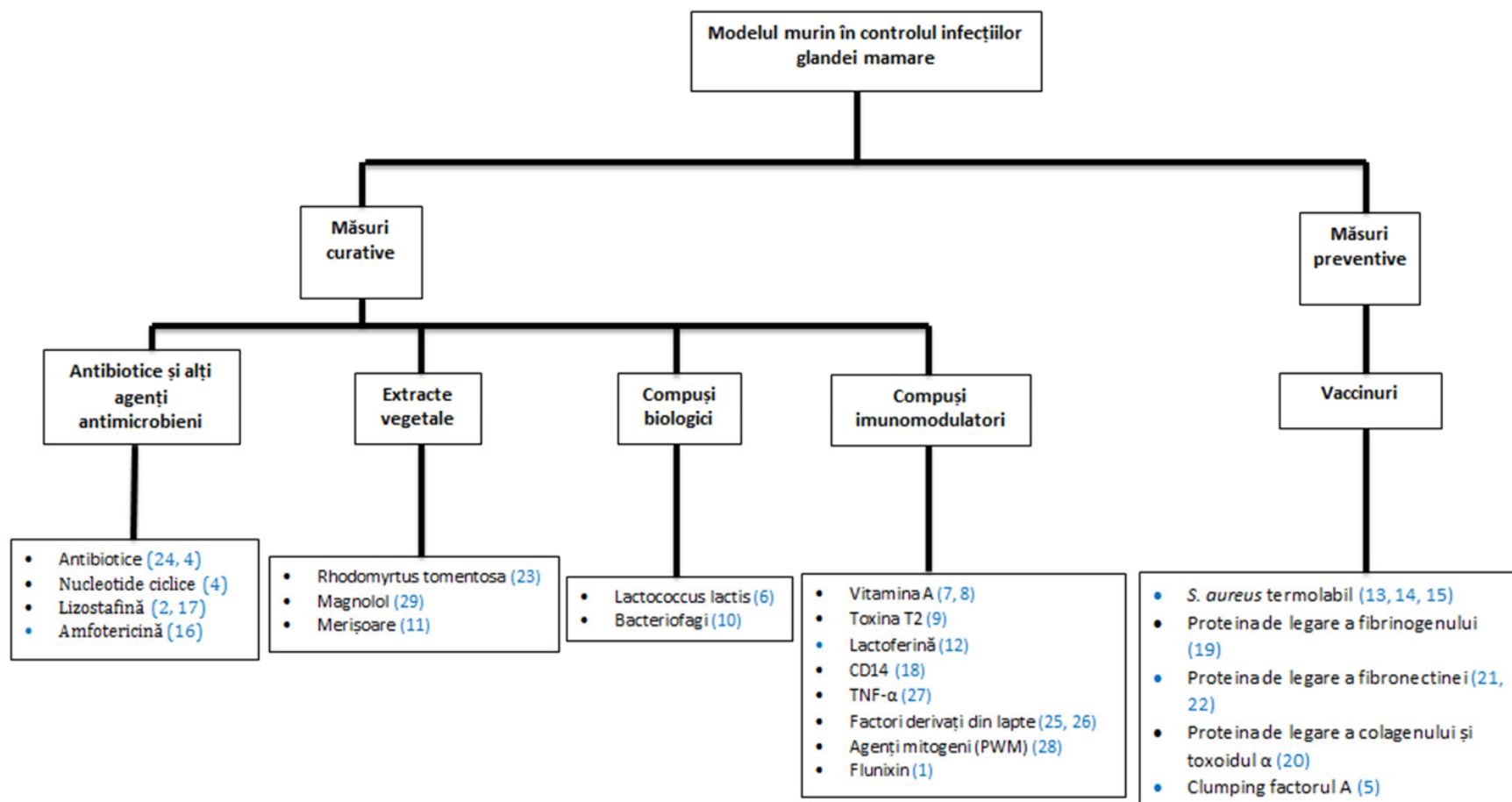
### 1.1. Antibiotice și alți compuși antimicrobieni

Într-o valoroasă și cuprinzătoare sinteză a literaturii de specialitate, Notebaert S. și Meyer E. (2006) prezintă numeroase studii care au utilizat modelul mamitic murin pentru testarea eficacității diferitelor antibiotice (Notebaert S. et al., 2006).

În afară de antibiotice, acest model a servit la testarea și a altor agenți cu proprietăți bactericide și chiar și a unui antifungic (Guhad FA et al., 1999). Alte studii prezintă nucleotidele ciclice, precum acidul 3', 5' – biguanilic, ca fiind eficiente în tratarea mamitelor la șoareci, întrucât acești compuși ciclici interferează principalele căi de semnalizare ale bacteriilor (Brouillette E, et al., 2005).

Cercetări interesante au fost efectuate și de Bramley și colab. (1990), asupra lizostafinei, o enzimă secretată de *Staphylococcus simulans* și care pare să aibă potențial considerabil în tratarea mamitei stafilococice. Această enzimă hidrolizează peptidoglicanii care se găsesc în peretele celular al stafilococilor. În urma inoculării intramamare, s-a redus considerabil numărul bacteriilor patogene recuperate din glanda mamară, precum și intensitatea modificărilor histopatologice asociate (Bramley A.J. et al., 1990). Mai mult decât atât, se pare că inducerea secreției intramamare de lizostafină, la șoarecii transgenici, îi protejează împotriva infecției cu *S. aureus* (Kerr D.E. et al., 2001).

R. 2.6.3 Obținerea unui model de rezistență la agenți antimicrobieni *in vivo*



**Figura 1.** Strategii curative și preventive utilizate în controlul mamitelor, folosind modelul murin (adaptare după [Notebaert S. et al., 2006](#))

## 1.2. Extracte vegetale

Utilizarea extractelor vegetale în tratarea mamitelor, la modelul murin, nu este un subiect abordat de foarte mulți cercetători. Magnololul este un compus polifenolic extras din coaja tulpinii de magnolie (*Magnolia sp.*), care s-a dovedit că prezintă activitate antiinflamatorie. Inoculat la șoarecii cu mamită, a redus considerabil distrucțiile tisulare asociate procesului inflamator, prin atenuarea inflamației indusă de lipopolizaharidele bacteriene, ca urmare a suprimării procesului de semnalizare celulară dependent de protein-kinaza activată de mitogenul TLR4/NF-kB (Wei W., et al., 2015).

S-a demonstrat, de asemenea, că fracțiunea FC111 a extractului de merișoare (*Vaccinium macrocarpon Ait*), obținută din reziduurile rezultate în urma stoarcerii fructelor pentru extragerea sucului, afectează sinteza peptidoglicanilor din peretele celular al *S. aureus* și acționează în sinergie cu antibioticele  $\beta$ -lactamice, în modelul mamitic murin. Acest compus, ușor de obținut din reziduurile de presă, poate găsi aplicații interesante în sectorul agroalimentar și poate contribui la reducerea utilizării antibioticelor în sectorul veterinar (Diarra M.S., et al., 2013).

Extractul alcoolic din fruzele unei plante din familia Myrtaceae (*Rhodomyrtus tomentosa*) a dovedit proprietăți antibacteriene surprinzătoare *in vitro*, însă în urma inoculării la un model mamitic murin, s-a demonstrat că efectul antibacterian este mult diminuat, probabil din cauza neutralizării compușilor activi de către cazeina din lapte (Mordmuang A., et al., 2019).

## 1.3. Compuși biologici

În ultimul timp, tot mai multe studii au investigat potențialul culturilor vii de *Lactococcus lactis*, inoculate intramamar, ca și alternativă la terapia cu antibiotice a mamitei la speciile de rumegătoare crescute pentru producția de lapte. Însă rezultatele prezentate în literatură, cu privire la eficacitatea și siguranța acestui procedeu, sunt controversate. Un studiu recent, efectuat pe un model mamitic murin, demonstrează că inoculele concentrate de *L. lactis* (cultură de 24 h, așa cum erau inoculate în cadrul altor studii, la vaci), administrate intramamar, pot induce un răspuns inflamator supurativ, devenind astfel, dintr-un organism considerat „sigur” și larg utilizat în industria laptelui, un potențial patogen (Camperio C., et al., 2017).

În schimb, da Silva Duarte și colab. (2018), folosesc cu succes inocularea intramamară a bacteriofagului *T4virus* vB\_EcoM-UFV13, în gestionarea mamitei colibacilare, la un model murin (da Silva Duarte V., et al., 2018).

## 1.4. Compuși imunomodulatori

### R. 2.6.3 Obținerea unui model de rezistență la agenți antimicrobieni *in vivo*

Literatura de specialitate abundă nu doar în informații cu privire la utilizarea compușilor care inhibă creșterea microorganismelor sau au acțiune bactericidă, la modelele mamitice murine, ci și în rezultate ale testării agenților care fortifică imunitatea gazdei, prin acțiunea lor imunomodulatoare. Se pare că retinoizii influențează pozitiv mecanismele de apărare ale gazdei. Astfel, șoarecii care au primit o dietă suplimentată cu vitamina A, au dezvoltat o mamită mai puțin severă în urma inoculării intramamare a agentului bacterian inductor, comparativ cu lotul martor (Chew B.P., et al., 1984). În plus, animalele cu deficit de vitamina A au exprimat leziuni histopatologice ale glandei mamare, mai pronunțate (Chew B.P., et al., 1985).

Un alt imunomodulator ar putea fi toxina T2, produsă în mod natural de speciile de *Fusarium*. Administrarea acestei micotoxine la șoareci a redus virulența lui *S. aureus* și a *E. coli* și a limitat reacțiile inflamatorii. Autorii sugerează că la baza acestor observații stă activarea macrofagele (Cooray R., et al., 1990). Același mecanism, potențat și de alterarea capacității de a adera la matricea extracelulară, explică acțiunea lactoferinei în inhibarea patogenului *S. aureus* de a invada celulele epiteliale mamare (Diarra M.S., et al., 2003).

O altă abordare interesantă o constituie inocularea *E. coli* împreună cu forma solubilă a receptorului lipopolizaharidic CD14, studiu în urma căruia s-a observat reducerea inflamației țesutului mamar, probabi datorită infiltrării timpurii cu neutrofile (Lee J.W., et al., 2003). Observații similare s-au desprins și în urma inoculării intramamare a factorului de necroză tumoră alfa și ulterior, a unei tulpini patogene de *S. aureus* (Sanchez M.S., et al., 1994).

## 1.5. Vaccinuri

O altă strategie de control a mamitelor este reprezentată de prevenția prin vaccinare. Din păcate, produsele comerciale disponibile pentru bovine, au o eficacitate limitată, mai ales împotriva mamitei cu stafilococ auriu. Departe de a preveni instalarea bolii, acestea sunt cel mult capabile să îmbunătățească rata de vindecare și să diminueze severitatea infecției. Modelul murin este unul satisfăcător și pentru cercetările efectuate în această direcție (Brouillette E., et al., 2002; Garcia V. et al., 1996; Gomez M.I., et al., 1998; Gomez M.I., et al., 2002; Mamo W, et. al., 1994; Mamo W, et. al., 2000; Mamo W, et. al., 1995; Mamo W, et. al., 1994)

## Bibliografie

1. Anderson JC. Flunixin fails to enhance cloxacillin in treatment of experimental staphylococcal mastitis in mice. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1986; 9: 333-336.
2. Bramley AJ and Foster R. Effects of lysostaphin on *Staphylococcus aureus* infections of the mouse mammary gland. *Research in Veterinary Science* 1990; 49: 120-121.
3. Brouillette E, Grondin G, Lefebvre C, Talbot BG, Malouin F. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol.* 2004;101(4):253-62. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.04.008.
4. Brouillette E, Hyodo M, Hayakawa Y, Karaolis DK and Malouin F. 3',5'-cyclic diguanylic acid reduces the virulence of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* strains in a mouse model of mastitis infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2005;49:3109-3113.
5. Brouillette E, Lacasse P, Shkreta L, Belanger J, Grondin G, Diarra MS, Fournier S and Talbot BG. DNA immunization against the clumping factor A (C1fA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 2002; 20: 2348-2357.
6. Camperio C, Armas F, Biasibetti E, et al. A mouse mastitis model to study the effects of the intramammary infusion of a food-grade *Lactococcus lactis* strain. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184218. doi:10.1371/journal.pone.0184218
7. Chew BP, Luedecke LO and Holpuch DM. Effect of dietary vitamin A on resistance to experimental *Staphylococcus mastitis* in mice. *Journal of Dairy Science* 1984; 67: 2566-2570.
8. Chew BP, Zamora CS and Luedecke LO. Effect of vitamin A deficiency on mammary gland development and susceptibility to mastitis through intramammary infusion with *Staphylococcus aureus* in mice. *American Journal of Veterinary Research* 1985; 46: 287-293.
9. Cooray R and Jonsson P. Modulation of resistance to mastitis pathogens by pretreatment of mice with T-2 toxin. *Food and Chemical Toxicology* 1990; 28: 687-692.
10. da Silva Duarte, V., Dias, R.S., Kropinski, A.M. et al. Genomic analysis and immune response in a murine mastitis model of vB\_EcoM-UFV13, a potential biocontrol agent for use in dairy cows. *Sci Rep.* 2018;8:6845. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24896-w>
11. Diarra MS, Block G, Rempel H, et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of cranberry press cake extracts alone or in combination with  $\beta$ -lactams against *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:90. doi:10.1186/1472-6882-13-90
12. Diarra MS, Petitclerc D, Deschenes E, Lessard N, Grondin G, Talbot BG and Lacasse P. Lactoferrin against *Staphylococcus aureus* mastitis. Lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonisation by *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2003; 95: 33-42.
13. Garcia V, Gomez M, Iglesias M, Sanjuan N, Gherardi M, Cerquetti MC and Sordelli D. Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus*: microbiological and immunological studies in a mouse mastitis model. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1996; 14: 45-51.
14. Gomez MI, Garcia VE, Gherardi MM, Cerquetti MC and Sordelli DO. Intramammary immunization with live attenuated *Staphylococcus aureus* protects mice from experimental mastitis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1998; 20: 21-27.
15. Gomez MI, Sordelli DO, Buzzola FR and Garcia VE. Induction of cell-mediated immunity to *Staphylococcus aureus* in the mouse mammary gland by local immunization with a live attenuated mutant. *Infection and Immunity* 2002; 70: 4254-4260.

### R. 2.6.3 Obținerea unui model de rezistență la agenți antimicrobieni *in vivo*

---

16. Guhad FA, Jensen HE and Hau J. Experimental murine mycotic mastitis: a sensitive and lenient model for studies of antifungal chemotherapy. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1999; 26: 125-130.
17. Kerr DE, Plaut K, Bramley AJ, Williamson CM, Lax AJ, Moore K, Wells KD and Wall RJ. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. *Nature Biotechnology* 2001; 19: 66-70
18. Lee JW, Paape MJ and Zhao X, Recombinant bovine soluble CD14 reduces severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in mice. *Veterinary Research* 2003; 34: 307-316.
19. Mamo W, Boden M and Flock JI. Vaccination with *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins (FgBPs) reduces colonisation of *S. aureus* in a mouse mastitis model. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1994; 10: 47-53.
20. Mamo W, Froman G and Muller HP. Protection induced in mice vaccinated with recombinant collagen-binding protein (CnBP) and a-toxoid against intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Immunology* 2000; 44: 381-384.
21. Mamo W, Jonsson P and Muller HP. Opsonization of *Staphylococcus aureus* with a fibronectin-binding protein antiserum induces protection in mice. *Microbial Pathogenesis* 1995; 19: 49-55.
22. Mamo W, Jonsson P, Flock II, Lindberg M, Muller HP, Wadstrom T and Nelson L. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with *S. aureus*. *Vaccine* 1994; 12: 988-992.
23. Mordmuang A, Brouillette E, Voravuthikunchai SP, Malouin F. Evaluation of a *Rhodomyrtus tomentosa* ethanolic extract for its therapeutic potential on *Staphylococcus aureus* infections using *in vitro* and *in vivo* models of mastitis. *Veterinary Research*. 2019;50(1):49. DOI: 10.1186/s13567-019-0664-9.
24. Notebaert S, Meyer E. Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis. A review. *Vet Q*. 2006;28(1):2-13. doi: 10.1080/01652176.2006.9695201. PMID: 16605156.
25. Owens WE and Nickerson SC. Evaluation of an anti-inflammatory factor derived from hyperimmunized cows. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1989; 190: 79-86.
26. Owens WE, Nickerson SC and Washburn PJ. Effect of a milk-derived factor on the inflammatory response to *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1992; 30: 233-246.
27. Sanchez MS, Ford CW and Yancey RJ, Jr. Efficacy of tumor necrosis factor- $\alpha$  and antibiotics in therapy of experimental murine staphylococcal mastitis. *Journal of Dairy Science* 1994; 77: 1259-1266.
28. Sordillo LM and Nickerson SC. Morphological changes caused by experimental *Streptococcus uberis* mastitis in mice following intramammary infusion of pokeweed mitogen. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1986; 182: 522-530.
29. Wei W, Dejie L, Xiaojing S, Tiancheng W, Yongguo C, Zhengtao Y, Naisheng Z. Magnolol inhibits the inflammatory response in mouse mammary epithelial cells and a mouse mastitis model. *Inflammation*. 2015;38(1):16-26. doi: 10.1007/s10753-014-0003-2.