

Universitatea de Științe Vieții “Regele Mihai I” din Timișoara



Facultatea de Medicină Veterinară

*POP M. MIREL*

# TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI MICROBIOLOGICE ȘI IMUNOLOGICE  
LA CERBUL LOPĂȚAR (*DAMA DAMA*)

Conducător Științific  
Prof. Dr. TÎRZIU EMIL

Timișoara  
2023

University of Life Sciences “King Michael I<sup>st</sup>” from Timișoara



Faculty of Veterinary Medicine

*POP M. MIREL*

# DOCTORAL THESIS

MICROBIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL  
RESEARCH TO THE FALLOW DEER (*DAMA DAMA*)

Research Coordinator

**Prof. Dr. TÎRZIU EMIL**

Timișoara  
2023

## Rezumatul tezei de doctorat

### CERCETARI MICROBIOLOGICE ȘI IMUNOLOGICE LA CERBUL LOPATAR (*DAMA DAMA*)

#### Prezenta teză conține:

Rezumatele în limba Română și Engleză

Introducere

Partea I-a - Studiu bibliografic: 35 de pagini

Partea a II-a - Cercetări proprii: 93 de pagini

Tabele: 47

Figuri: 63

Surse bibliografice: 261

Lista lucrărilor științifice publicate

#### Scopul și obiectivele cercetării

În regulamentul din 4 iunie 2008 privind autorizarea, organizarea și practicarea vânătorii, incluse în Ordinul nr. 353/2008, aprobat la data 03-iulie-2008, în dispozițiile generale se menționează că vânătoarea este acțiunea de pândire, căutare, stârnire, urmărire, hăituire sau orice altă activitate având ca finalitate capturarea vânatului ori uciderea acestuia, desfășurată de una sau de mai multe persoane care dețin dreptul legal de a practica vânătoarea, în conformitate cu prevederile Legii vânătorii și a protecției fondului cinegetic nr. 407/2006, cu modificările și completările ulterioare.

Pentru continua dezvoltare a sectorului vânătorec, este necesar să se cunoască cât mai bine biologia speciilor de interes vânătorec, flora microbiană cu impact asupra sănătății animalelor, dar și metodele moderne de creștere, gospodărire și recoltare, astfel încât să se pună cât mai bine în valoare această bogăție naturală a țării.

În România, datorită condițiilor de mediu favorabile, se găsesc numeroase specii de vânat, specifice fiecărei zone de vegetație și fiecărei regiuni. De exemplu, numai în Delta Dunării, există peste 200 de specii de vânat acvatic, iar la munte, dar și în regiunea de câmpie, se găsesc un număr mare alte specii, dintre care putem menționa: căpriorul (*Capreolus capreolus*), cerbul (*Cervus elaphus*), cerbul lopătar (*Dama dama*), mistrețul (*Sus scrofa*), iepurele (*Lepus europaeus*), fazanul (*Phasianus colchicus*), potârnichea (*Perdix perdix*) ș.a. La acestea se adaugă și speciile de vânat răpitor, cum ar fi: lupul (*Lupus canis*), vulpea (*Vulpes vulpes*), pisica sălbatică (*Felis silvestris silvestris*), nevăstuica (*Mustela nivalis*).

Dintre speciile menționate mai sus, conform datelor oficiale, pe teritoriul țării noastre, cerbul lopătar este una dintre speciile larg răspândite în partea de vest, cu mențiunea că s-au făcut populări și repopulări și în alte 27 de județe. De exemplu, pe fondul de vânătoare de la Socodor, Arad, sunt peste 1.000 de exemplare, fiind rezervația de cerbi lopătari cu cea mai numeroasă populație de cerbi aflată în libertate din Europa, iar pe teritoriul comunei Luncoiul de Jos, Hunedoara, se află, de asemenea, un număr de 45 de capete de cerb lopătar, pe o suprafață de 600 de hectare, alcătuind Rezervația cinetică Valea Lungă.

De altfel, cerbul lopătar (*Dama dama*), alături de alte cervide, dar și iepurele, mistrețul, fazanul, reprezintă specii de vânat de o importanță majoră la noi în țară, fiind vânat pentru carnea lor ce posedă calități dietetice indiscutabile. Cu toate acestea, carnea provenită de la vânat poate prezenta, uneori, un risc zoonotic major, atât pentru consumator cât și pentru vânător. De exemplu, dintre germeni microbieni și parazitari cu potențial zoonotic, care pot produce îmbolnăviri grave la om, în urma consumului de carne de vânat, putem menționa: *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. multocida*, *Listeria* sp., *F. tularensis*, *Y. enterocolitica*, virusul hepatitei E, *Trichinella* ș.a. În acest context, considerăm necesar să se cunoască flora microbiană și riscul la care este expus omul când consumă carnea de vânat, în general, și de cerb lopătar în special. Flora bacteriană poate deveni din fiziologică, patologică reprezentând atât pentru om, cât și pentru animale, un risc major pentru sănătate.

Cercetările privind microflora de portaj și riscul pe care aceasta îl reprezintă este deosebit de important întrucât și carnea de vânat trebuie să respecte aceleași norme microbiologice, solicitate la carnea provenită de la animalele de fermă. În prezent există un număr relativ mic de cercetări, atât în ceea ce privește flora microbiană existentă la speciile de cervide, cât și cu privire la bolile întâlnite la aceste animale, atât în țara noastră cât și pe plan internațional. Cunoașterea profilului microbian și al statusului imun la cerbul lopătar sunt de un real folos pentru o mai bună înțelegere a riscului la care este supusă această categorie de animale, dar și omul.

Dintre bolile virale putem menționa în special boala hemoragică epizootică (EHD), boala „limbii albastre” și febra catarală malignă. Alături de bolile infecțioase cu etiologie virală, există și un număr mare de boli bacteriene prezente în efectivele acestei specii. Dintre acestea menționăm tuberculoza și paratuberculoza, boli întâlnite destul de frecvent în populațiile de cerb lopătar, dar și la alte animale de vânat. Salmoneloza, constituie o altă boală cu origine bacteriană, semnalată la unele specii de cervide. Infecțiile cauzate de *E. coli* producătoare de Shiga toxină (STEC), constituie a treia zoonoză, cel mai frecvent raportată în Uniunea Europeană, după campilobacterioză și salmoneloza. Pasteureloza, este o altă boală infecțioasă bacteriană care apare la speciile de rumegetoare sălbatice.

Având în vedere existența unei populații numeroase a acestei specii, în fondurile de vânătoare din țara noastră, în lucrarea de față ne-am propus să realizăm o evaluare a florei bacteriene, prezentă la cerbul lopătar, inclusiv a fenomenului de rezistență antimicrobiană la principalele specii de bacterii izolate. Nu în ultimul rând, având în vedere inexistența unui studiu privind microflora de portaj și corelarea acesteia cu sistemul imun al speciei studiate, ne-am propus o evaluare a principalilor efectori imuni nespecifici, atât celulari cât și moleculari.

Toate aceste direcții de cercetare au permis conturarea studiului de față, care are ca obiectiv general studiul florei microbiene și a unor efectori imuni nespecifici la cerbul lopătar. Dintre obiectivele specifice ale acestei cercetări, menționăm:

- izolarea și identificarea principalelor specii bacteriene de la masculi și femele de cerb lopătar, din probe recoltate din cavitatea nazală și rect, imediat după împușcarea animalelor;
- studiul comportamentului bacteriilor izolate pe medii uzuale, standardizate, dar și pe medii selective pentru principalele grupe de germeni;
- studiul comportamentului biochimic al tulpinilor bacteriene izolate, pe medii multitest;
- identificarea și încadrarea tulpinilor bacteriene izolate în specii, genuri și familii cu ajutorul unor metode moderne, respectiv a sistemului Vitek2 Compact;
- cercetări privind comportamentul unora dintre speciile bacteriene izolate față de substanțele antimicrobiene;
- caracterizarea moleculară a unor tulpini de *E. coli*, izolate din probe recoltate de la animale din fondul de vânătoare Socodor, prin tehnica reacției în lanț a polimerazei (PCR);
- evaluarea statusului imun nespecific, prin determinarea unor efectori celulari și moleculari, pe probe de sânge recoltate de la masculi și femele de cerb lopătar, imediat după împușcare.

## **Partea I**

### **Stadiul actual al cunoașterii**

Este extinsă pe 35 de pagini (27,34% din teză), fiind structurată pe cinci capitole, care includ nouă subcapitole

#### **Capitolul 1. Încadrarea taxonomică, nomenclatura și răspândirea cerbului lopătar (*Dama dama*)**

Cuprinde informații referitoare la încadrarea taxonomică și răspândirea geografică a cerbului lopătar în țara noastră. Conform datelor din literatura de specialitate, în România, există peste 3.200 de mamifere, încadrate în clasa *Mammalia*, din care aproximativ 30 sunt specii de interes vânătoresc, 11 dintre acestea fiind protejate datorită scăderii semnificative a efectivelor în Europa sau pe celelalte continente. Dintre speciile de interes vânătoresc, cele mai importante sunt încadrate în următoarele familii: *Cervidae*, include rumegetoarele cu coarne caduce, dintre care putem menționa: cerbul comun (*Cervus elaphus* L.), cerbul lopătar (*Dama dama* L.), căpriorul (*Capreolus capreolus* L.), elanul (*Alces alces* L.), cerbul Sika (*Cervus nipon* T.), cerbul de Virginia (*Cervus virginianus* B.) și cerbul Axis (*Cervus axis* E.); *Bovidae*, încadrează tot rumegetoare, dar cu coarne persistente, dintre care cele mai importante specii sunt: capra neagră (*Rupicapra rupicapra* L.), capra-de-stâncă (*Capra ibex* L.), capra-de-Spania (*Capra pyreneica* S.), muflonul (*Ovis musimon* P.) și zimbrul (*Bison bonasus* L.).

Familia *Cervidae* include patru subfamilii: *Cervinae*, cu genurile *Dama*, *Axis*, *Cervus* și *Elaphurus*; *Hydropotinae* din care face parte genul *Hydropotes*; *Muntiacinae* cu genurile *Elaphodus*, *Muntiacus* și *Megamuntiacus* și subfamilia *Odocoileinae*, care cuprinde genurile *Odocoileus*, *Blastocerus*, *Ozotoceros*, *Hippocamelus*, *Mazama*, *Pudu*, *Alces*, *Rangifer* și *Capreolus*.

Cerbul lopătar (*Dama dama*) este un erbivor din regnul *Animalia*, încregătura *Chordata*, care face parte din clasa *Mammalia*, ordinul *Artiodactyla*, subordinul *Ungulata*, familia *Cervidae*, subfamilia *Cervinae*, tribul *Cervini*, genul *Dama*, specia tip *Dama dama*. Ordinul *Artiodactyla*, cuprinde copitate care calcă pe două sau pe

patru degete, în ultimul caz două dintre acestea fiind atrofiate. La noi în țară sunt întâlnite trei specii: cerbul comun (*Cervus elaphus* L.), căpriorul sau țapul (*Capreolus capreolus* L.) și cerbul lopătar (*Dama dama* L.).

Cerbul lopătar este o specie de cervide mediteraneană, originară din Asia Mică, care a fost colonizată de către romani în Peninsula Iberică, Galia și insulele Britanice încă din secolele III și IV d. Ch. În Europa centrală a fost aclimatizat în secolul XVI, iar în prezent este răspândit insular în toată Europa.

În România există o populație destul de numeroasă de cerb lopătar, repartizată în principalele fonduri de vânătoare din întreaga țară. Conform datelor din literatura de specialitate, încă din anul 1904, a fost creată prima rezervație de vânat, în partea de sud-vest a României, fiind aduse animale din Austria, Republica Cehă și alte țări central-europene. În anul 1968, Micu și col., afirmă că, la nivel național, existau peste 4000 de indivizi, iar populația s-a nivelat la aproximativ 6000 de indivizi între 2000 și 2006. Densitatea de efectiv nu este reglementată prin ultimele instrucțiuni, dar se apreciază că este cuprinsă între 20 și 100 indivizi la 1.000 ha, în funcție de bonitatea terenului.

## **Capitolul 2. Descrierea și caracterizarea cerbului lopătar (*Dama dama*)**

În primul subcapitol "*Descrierea speciei studiate*" sunt prezentate principalele caracteristici ale speciei, atât cele specifice masculilor, cât și cele specifice femelelor. În cadrul speciei, masculul este denumit lopătar sau taur, femela ciută de lopătar, iar puiul până la un an vițel. Este o specie de vânat cu întreținere facilă și ieftină, extrem de căutată de vânători, atât pentru carnea sa cât mai ales pentru trofee. Carnea este de calitate superioară, bogată în proteine, cu un conținut redus de colesterol. Perioada de rut (boncănit) este în luna octombrie, iar fătările în luna mai-iunie. Sistemul de împerechere este poligam, masculii emit sunete, „boncănesc”, doar în timpul sezonului de reproducere deoarece structura socială variază de la solitară, în timpul anotimpurilor în care nu se împerechează, la o structură de turmă, în timpul sezonului de împerechere. Femelele ajung la maturitatea sexuală la vârsta de un an și cinci luni, iar masculii la doi ani și jumătate. În România, împerecherea are loc de la jumătatea lunii octombrie până la jumătatea lunii noiembrie.

În subcapitolul "*Comportamentul alimentar al speciei*" sunt prezentate principalele aspecte privind preferințele și obiceiurile alimentare ale speciei, dependent și de disponibilitatea resurselor. Astfel, conform datelor din literatura de specialitate cerbii lopătari preferă o varietate mare de vegetație, de la iarbă de pășune, la crengi, rogoz, dar mănâncă și din copaci și arbuști, inclusiv lăstari tineri, ghindă de fag, castane, ghindă, rădăcini, legume, flori, iar din culturi, frunze uscate, scoarță de copaci și mușchi, ciuperci și licheni.

Capitolul se încheie cu subcapitolul "*Comportamentul social al speciei*" în care ne sunt prezentate informații specifice masculilor, dar și femelelor. Astfel, specia preferă comportamentul de grup, în unele zone fiind observate turme de până la treizeci de indivizi, iar în alte zone, animalele prezentând un comportament mai puțin sociabil. De asemenea s-a constatat și o variație sezonieră a mărimii grupului, existând situații în care femelele, puii lor și tineretul de până la un an, formează grupuri cunoscute sub numele de turme de căprioare, în timp ce masculii maturi formează grupuri de burlaci. Cerbii lopătari prezintă simțuri precum: mirosul, auzul și văzul, foarte bine dezvoltate, dar comunică prin limbajul corpului, miros și sunete.

## **Capitolul 3. Flora bacteriană de portaj la cerbul lopătar (*Dama dama*)**

Sunt prezentate succint principalele specii bacteriene cu implicații în etiologia unor boli infecțioase, întâlnite la aceste animale, dar și pe cele cu risc zoonotic care pot contribui la transmiterea unor boli infecțioase la om sau animalele domestice, atât prin contact direct cât și indirect. Menționăm, de asemenea, în abordarea "One Health", importanță deosebită a faunei sălbatice și al mediului sălbatic în întreținerea și diseminarea unor zoonoze bacteriene.

Dintre agenți etiologici, implicați în apariția unor zoonoze bacteriene, menționăm, în special, bacteriile încadrate în genurile: *Pasteurella*, *Leptospira*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Yersinia* și *Listeria*. O prezență constantă în efectivele de rumegătoare sălbatice o au și bacteriile aparținând genului *Staphylococcus*, respectiv *S. aureus*, *S. sciuri* subsp. *sciuri* și *S. xylosum*. De asemenea, conform unor date din literatura de specialitate, dintre animalele de vânat, cerbul, caprioarele și mistreții, sunt considerate importante rezervoare de germeni patogeni, de origine alimentară, care pot provoca boli grave la om și pot contamina produsele alimentare proaspete.

## **Capitolul 4. Aspecte privind imunitatea la cerbul lopătar (*Dama dama*)**

În subcapitolul "*Generalități privind principalii efectori imunitari*" sunt prezentate aspecte privind sistemul imunitar la cervide și aspecte privind mecanismele imunitare înnăscute și dobândite cu rol în asigurarea

imunostaziei la aceste animale. Menționăm că, și la aceste animale sălbatice, imunocompetența este influențată de numeroși factori, endogeni și exogeni, dintre care putem menționa aportul alimentar, condițiile de mediu, inclusiv anotimpul, stresul, sexul etc. Există păreri conform cărora, imunocompetența prezintă un dimorfism sexual accentuat, respectiv femelele prezintă o imunoreactivitate generală crescută, în comparație cu masculii. Elementele structurale ale sistemului imun la rumegătoare, domestice sau sălbatice, sunt similare cu cele de la majoritatea speciilor de mamifere și includ atât organe și țesuturi, cât și celule și molecule, implicate în răspunsul imun specific și nespecific. De asemenea, sunt prezentate aspecte generale privind organele limfoide primare și secundare, respectiv principalele celule și molecule (imunoglobuline) care realizează funcția imună la cervide. În finalul capitolului sunt prezentate aspecte "la zi", privind răspunsul imunitar la cerbul lopătar.

### **Capitolul 5. Valorile principalilor parametri hematologici și biochimici la cerbul lopătar**

În primul subcapitol "Valorile principalilor parametri hematologici" sunt prezentate valorile principalilor parametri hematologici la rumegătoarele sălbatice, în general, și la cerbul lopătar (*Dama dama*) în special. În urma investigațiilor de laborator au fost stabilite, de către mai mulți cercetători, valorile acestor parametri, după cum urmează: eritrocite  $9,2 \pm 0,2 \times 10^6/\text{mm}^3$ , hematocrit  $46,7 \pm 0,6\%$ , hemoglobină  $16,4 \pm 0,3 \text{ g}/100 \text{ ml}$ , concentrația medie a hemoglobinei eritrocitare  $35,1 \pm 0,2\%$  și leucocite totale  $3,0 \pm 0,1 \times 10^3/\text{mm}^3$ .

Având în vedere interesul deosebit pentru managementul și starea de sănătate a animalelor de reproducție, aparținând genului *Dama*, considerăm extrem de importantă și cunoașterea compoziției biochimice sangvine, condiție necesară pentru recunoașterea și diagnosticul bolilor și problemelor de sănătate care afectează populația de cerbi din mediul silvatic, dar și din crescătorii. Astfel în subcapitolul "Valorile principalilor parametri biochimici la cerbul lopătar" sunt prezentate valori, extrem de interesante, ale acestor parametri, după cum urmează: aspartat aminotransferaza ( $145,6 \pm 73,5 \text{ U/L}$ ), alanin aminotransferaza ( $49,4 \pm 13,5 \text{ U/L}$ ), lactat dehidrogenaza ( $1155 \pm 535 \text{ U/L}$ ), glutamiltransferaza ( $38,7 \pm 19,9 \text{ U/L}$ ), uree ( $6,23 \pm 2,39 \text{ mmol/L}$ ), creatinina ( $150,9 \pm 36,5 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ), proteinele totale ( $60,9 \pm 7,7 \text{ g/L}$ ), albumina ( $38,3 \pm 8,6 \text{ g/L}$ ) și glucoza ( $5,1 \pm 3,9 \text{ mmol/L}$ ).

Valorile obținute au prezentat diferențe semnificative, de la o probă la alta, dependent atât de vârsta animalelor, cât și de sex (masculi și femele). Alături de factorii menționați mai sus, care influențează uneori semnificativ valorile principalilor parametri biochimici, un rol important în evoluția acestora revine și tehnicilor de prelevare a probelor, dar și diferențelor individuale dintre animale, inclusiv a unor factori, interni și externi, cum ar fi: factorii genetici, de mediu, nutriționali, fiziologici, inclusiv stresul la care sunt supuse animalele în momentul recoltării probelor.

### **Partea a II-a. Cercetări proprii**

Această parte se extinde pe 93 de pagini (72,66% din teză) și include patru capitole mari, la care se adaugă concluziile generale.

Cercetările proprii au fost cuprinse în cinci capitole:

6. Cercetări privind flora bacteriană cu potențial patogen la cerbul lopătar (*Dama dama*)
7. Cercetări privind comportamentul unor tulpini bacteriene, izolate de la cerbul lopătar, față de substanțele antimicrobiene
8. Monitorizarea rezistenței genotipice la antimicrobiene, prin tehnici de biologie moleculară, a unor tulpini de *E. coli* izolate de la cerbul lopătar prin tehnica reacției în lanț a polimerazei (PCR)
9. Cercetări privind nivelul unor efectori imuni nespecifici la cerbul lopătar

Fiecare capitol este structurat în patru subcapitole:

- Scop și obiective;
- Materiale și metode;
- Rezultate și discuții;
- Concluzii.

### **Capitolul 6. Cercetări privind flora bacteriană cu potențial patogen la cerbul lopătar (*Dama dama*)**

#### ***Obiectivul studiului***

Cercetările au vizat izolarea și identificarea principalelor specii bacteriene de la cerbi și ciute, aparținând speciei *Dama dama*, cu potențial patogen pentru această specie, pentru om și animale, precum și în contaminarea cărnii.

### ***Materiale și metode***

Cercetările s-au desfășurat pe parcursul a patru ani, în perioada 2017 - 2021, luându-se în studiu un număr de 240 probe, recoltate de la 120 de animale, în duplicat. Recoltarea probelor s-a făcut de la cerbi și ciute, de vârste diferite, imediat după împușcare, din trei fonduri de vânătoare, din partea de sud-vest a României, respectiv două fonduri de vânătoare din județul Arad, Socodor și Chișineu-Criș - Sălișteanca și unul din județul Timiș (Nadăș).

Determinările au fost făcute în laboratorul disciplinei de Microbiologie și Imunologie, din cadrul Facultății de Medicină veterinară Timișoara. Menționăm că, metodologia de lucru a fost cea standard, în cazul însămânțărilor primare, respectiv în/pe medii uzuale simple, din care s-au făcut reînsămânțări pe medii de cultură selective, atât pentru bacterii Gram negative, cât și Gram pozitive. Pentru identificarea bacteriilor Gram negative au fost utilizate mediile Levine și Rambach, iar pentru cele Gram pozitive, mediile Oxford și Chapman. Ulterior, din coloniile izolate, dezvoltate pe suprafața mediilor selective, au fost efectuate reînsămânțări pe agar cu sânge, în vederea obținerii unor culturi pure, de 24 ore, necesare pentru identificarea speciilor bacteriene cu echipamentul Vitek2 Compact.

### ***Rezultate obținute***

La examenul bacterioscopic al frotiurilor s-au pus în evidență germeni de formă bacilară și cocobacilară, dispuși izolat, sau în grămezi neregulate, cultură pură, colorați atât Gram pozitiv cât și Gram negativ. De asemenea, în frotiurile efectuate de pe suprafața mediului Chapman, s-a evidențiat prezența unor bacterii în formă de coci, dispuși izolat sau în grămezi neregulate, aspect caracteristic speciilor aparținând genului *Staphylococcus*. Coroborând principalele aspectele culturale, dezvoltate pe mediile de cultură selective, cu aspectele morfologice, puse în evidență la examenul bacterioscopic, am putut confirma prezența unor specii de colibacili și stafilococi, respectiv a speciilor: *E. coli*, *Staphylococcus* spp., dar și *Pseudomonas* spp.

În urma examenului caracterelor morfologice și culturale, dezvoltate de bacteriile însămânțate, din cele 240 de probe, au fost identificate 221 de tulpini bacteriene (92.08%), 19 probe (7.92%) fiind sterile, încadrate în 13 genuri, respectiv cinci Gram negative (*Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Providencia* și *Pseudomonas*) și opt Gram pozitive (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Rothia*, *Kocuria*, *Gemella* și *Listeria*).

Cu sistemul Vitek2 Compact au fost obținute următoarele rezultate: dintre cele 104 tulpini Gram negative, majoritatea (81.73%) au aparținut speciei *E. coli*, zece tulpini unor specii aparținând genului *Salmonella* (9.62%), celelalte, izolate și identificate mai rar, fiind *P. oleovorans* (0.96%), *Providencia rettgeri* (0.96%), *Enterobacter aerogenes* (0.96%) și *Enterobacter* spp. (1.92%). Bacteriile Gram pozitive au aparținut, majoritatea, unor specii încadrate în genul *Staphylococcus*, respectiv: *S. lentus* (29.06%), *S. vitulinus* (14.53%) și *S. aureus* (12.82%), la care s-au adăugat și alte specii, cum ar fi: *L. monocytogenes* (4.27%), *A. viridans* (4.27%), *E. faecium*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Gemella* sp. *Rothia dentocariosa* și *Kocuria kristinae*.

## **Capitolul 7. Cercetări privind comportamentul unor tulpini bacteriene, izolate de la cerbul lopătar, față de substanțele antimicrobiene**

### ***Obiectivul studiului***

Obiectivul fundamental al acestui capitol a vizat evaluarea nivelurilor de rezistență la substanțele antimicrobiene a unor tulpini de *E. coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. etc., izolate din cavitatea nazală și din rect de la cerbi și ciute, de vârste diferite, imediat după împușcare, din trei fonduri de vânătoare din sud-vestul țării.

### ***Materiale și metode***

Testarea susceptibilității antimicrobiene a tulpinilor bacteriene s-a realizat, într-o primă etapă prin metoda disc-difuzimetrică Kirby și Bauer, utilizată conform ghidurilor CLSI (2018), folosind culturi proaspete de 18-24 de ore pe agar nutritiv. Pentru acuratețea rezultatelor a fost utilizată o tulpină martor pozitiv *E. coli* ATCC 25922 și un martor negativ. Metodă permite o evaluare semicantitativă a sensibilității la substanțele antimicrobiene a bacteriilor aerobe, a bacteriilor patogene cu creștere rapidă, și a unor bacterii mai pretențioase la condițiile de cultivare. În acest scop se folosesc microcomprimate impregnate cu substanțe antibacteriene, în anumite concentrații, aplicate ulterior pe suprafața mediului, inoculat anterior cu suspensia bacteriană din tulpina supusă testării.

Pentru testarea susceptibilității au fost luate în studiu numai specii Gram negative. Din zona Socodor au fost luate în studiu cinci tulpini de *E. coli*, trei aparținând genului *Enterobacter*, o tulpină de *P. oleovorans* și una de

*P. rettgeri*, iar din celelalte două fonduri de vânătoare (Chișineu Criș - Sălișteanca și Nadăș), câte cinci tulpini de *E. coli* din fiecare zonă, respectiv câte trei de *Salmonella* spp. și două de *Enterobacter* spp.

În a doua etapă, studiul susceptibilității la acțiunea principalelor clase de substanțe antimicrobiene a fost realizat cu sistemul Vitek-2. Au fost testate 32 tulpini de *E. coli*, 11 tulpini aparținând genului *Enterobacter*, șase tulpini de *Salmonella* spp. și câte o tulpină de *P. oleovorans* și *Providencia rettgeri*. Dintre speciile Gram pozitive au fost testate 45 de tulpini, respectiv 11 de *S. sciuri*, zece de *S. lentus*, șapte de *S. vitulinus*, opt de *S. xyloso* și o tulpină de *S. aureus*. La acestea s-au mai adăugat patru tulpini de *Aerococcus viridans*, trei tulpini de *Kocuria* spp. și o tulpină de *Enterococcus faecium*.

#### **Rezultate și obținute**

Rezultate privind susceptibilitatea antimicrobiană a unor specii bacteriene, prin metoda difuzimetrică, au fost diferite, dependent de fondul de vânătoare din care au fost recoltate probele și specia bacteriană testată. Astfel, la *E. coli*, izolată de la animalele din fondul de vânătoare Socodor, comparativ cu tulpinile izolate din fondurile de vânătoare, Chișineu Criș - Sălișteanca și Nadăș, s-a constatat o rezistență semnificativă la majoritatea substanțelor antimicrobiene testate, cuprinsă între 50 și 90%. Toate cele cinci tulpini de *E. coli*, izolate din fondul de vânătoare Socodor, au fost rezistente (100%), la ampicilină, amoxicilină/acid clavulanic, ciprofloxacina și azitromicina. În schimb, *Pseudomonas oleovorans* a fost sensibilă la toate substanțele antimicrobiene testate (100%), *Enterobacter* spp., la nouă din zece substanțe (90%), iar *Providencia rettgeri*, sensibilă la opt substanțe (80%).

Rezultatele obținute cu sistemul Vitek 2, dependent de fondul de vânătoare, au arătat că susceptibilitatea cea mai concludentă a fost înregistrată la speciile izolate din zona Nadăș, urmată de cele izolate din zona Chișineu Criș - Sălișteanca. În schimb la cele zece tulpini de *E. coli*, izolate de la animale din zona Socodor, s-a constatat o rezistență de 87,5% la șapte beta-lactamine (ampicilină, amoxicilină/ acid clavulanic, cefalexin, cefalotin, cefquinonă, cefoperazonă, ceftiofur), singura substanță la care toate tulpinile au fost sensibile fiind imipenemul. La aminoglicozide, tulpinile de *E. coli* au fost sensibile la amikacina (100%), la neomicina au fost sensibile șapte, iar la gentamicina și flumechină cinci au fost sensibile și cinci rezistente.

Pe categorii de substanțe, cele mai eficiente antibiotice au fost următoarele: din clasa beta-lactamelor, amikacina și imipenem la care au fost sensibile toate cele 47 de tulpini luate în studiu (100%), urmate de nitrofurantoin, la care au fost sensibile 45 de tulpini (95,74%), neomicina, 44 de tulpini (93,62%), ceftiofur, 43 de tulpini (91,49%), trimetoprim/sulfametoxazol și marbofloxacina, la care au fost sensibile 42 de tulpini (89,36%). Rezultatele privind susceptibilitatea antimicrobiană a unor specii Gram pozitive, au fost asemănătoare cu cele obținute la speciile Gram negative, cu mențiunea că și la acestea s-a constatat o susceptibilitate variabilă de la o tulpină la alta și de la o specie bacteriană la alta.

În concluzie, se poate afirma că, deși din probe de la cervide se pot izola și germeni cu potențial patogen, la care este prezent și fenomenul de rezistență la substanțele antimicrobiene, majoritatea rezultatelor indică faptul că speciile de cervide nu constituie un rezervor infecțios important nici pentru agenții patogeni umani, nici pentru microorganismele rezistente la antibiotice incluse în studiu.

## **Capitolul 8. Monitorizarea rezistenței genotipice la antimicrobiene, prin tehnici de biologie moleculară, a unor tulpini de *E. coli* izolate de la cerbul lopătar prin tehnica reacției în lanț a polimerazei (PCR)**

### **Obiectivul studiului**

Obiectivul fundamental al cercetării a constat în investigarea prezenței și modelele de rezistență genotipică, la anumite substanțe antimicrobiene, ale unor tulpini de *E. coli* izolate de la ciute și cerbi de lopătar (*Dama dama*) dintr-un fond de vânătoare din vestul României.

### **Materiale și metode**

Studiul a fost realizat în perioada aprilie - mai 2022, pe un număr de patru tulpini de *E. coli*, izolate de la masculi și female de cerb lopătar (*Dama dama*), din fondul de vânătoare Socodor, identificate anterior prin metode de diagnostic bacteriologic, clasice și moderne. Tehnica PCR a avut ca target evidențierea genelor *TEM* și *SHV* a unor tulpini de *E. coli* care oferă rezistență genotipică pentru beta-lactamaze cu spectru extins, după tehnica descrisă de Rasheed și col. (2000).

### **Rezultate obținute**

Prezența bacteriilor purtătoare de gene de rezistență antimicrobiană (AMR), în fauna sălbatică, constituie un indicator important al faptului că bacteriile rezistente, de origine umană sau animală, sunt răspândite în toate mediile naturale. Pe baza analizei genelor blaTEM și respectiv blaSHV, la toate cele patru izolate luate în studiu (V1-V4), tehnica reacției în lanț a polimerazei (PCR) a dezvăluit dimensiuni ale fragmentelor amplificate de



aproximativ 858 pb TEM și respectiv 1016 pb SHV. Mărimea acestor benzi, de o grosime consistentă și cu o strălucire evidentă, a confirmat faptul că tulpinile de *E. coli* izolate de la cerbul lopătar, caracterizate din punct de vedere a rezistenței genotipice, includ gene de rezistență și că aceste gene sunt ușor de amplificate.

În concluzie, putem afirma că tehnica reacției în lanț a polimerazei, în care s-au utilizat amorse specifice pentru decelarea genelor de rezistență la tulpini de *E. coli*, izolate de la ciute și cerbi aparținând speciei *Dama dama*, poate fi considerată una cu o specificitate și sensibilitate crescută pentru acest scop.

## **Capitolul 9. Cercetări privind nivelul unor efectori imuni nespecifici la cerbul lopătar**

### ***Obiectivul studiului***

Obiectiv principal al studiului a vizat evaluarea principalilor efectori imuni nespecifici, umorali (lizozim și properdină serică) și celulari, la rumeătoarele sălbatice (masculi și femele de cerb lopătar - *Dama dama*), comparativ cu cele de la rumeătoarele domestice (viței).

### ***Materiale și metode***

Cercetările s-au efectuat în perioada ianuarie - februarie 2021, pe 30 de probe biologice (sânge), respectiv 20 obținute de la zece cerbi și zece ciute de cerb lopătar (*Dama dama*), precum și zece probe recoltate de la viței în vârstă de aproximativ doi ani. De la rumeătoarele sălbatice, probele de sânge au fost prelevate în vacuainere cu EDTA, din vena jugulară, imediat după sacrificarea animalelor.

Examenul hematologic cantitativ a fost realizat cu ajutorul analizorului hematologic automat MB-1830 (Maysun Technology Co., Ltd., R.P. China), un echipament de uz veterinar și uman, care permite determinarea următorilor parametri hematologici: numărul total de leucocite; numărul de limfocite, monocite și granulocite; numărul de eritrocite; hematocritul (Ht); concentrația hemoglobinei (Hb); volumul eritrocitar mediu (VEM); hemoglobina eritrocitară medie (HEM); concentrația eritrocitară medie (CHEM); coeficientul de variație a dimensiunii eritrocitelor (RDW); numărul de plachete și volumul plachetar mediu (MPV).

Examenul hematologic calitativ s-a realizat pe frotiuri sangvine examinate la microscop, în vederea determinării formulei leucocitare. Frotiurile au fost realizate prin metoda clasică, iar pentru colorare s-au folosit două metode, respectiv metoda May-Grünwald-Giemsa, în tehnică standard și metoda Diff-Quik, în tehnică standard.

Concentrația lizozimului seric a fost determinată prin metoda difuzimetrică preluată, de la S.N. Institutul Pasteur S.A., iar concentrația properdinei serice a fost stabilită cu ajutorul metodei colorimetrice.

### ***Rezultate obținute***

Parametrii hematologici investigați au atins valori apropiate la cerb și ciută, diferențele constatate între masculi și femele nefiind semnificative. Dintre aceștia, numărul de leucocite, limfocite și monocite, determinate la cele trei categorii de animale, a prezentat diferențe semnificative între rumeătoarele sălbatice și cele domestice. Astfel, monocitele și leucocitele au prezentat valori semnificativ mai mari la rumeătoarele sălbatice (cerb lopătar și ciută), comparativ cu cele domestice. Prezența unui număr mai mare de leucocite, la cerb și ciută, s-a corelat cu un număr mai mic de limfocite, raportul fiind inversat la viței. Valoarea medie a limfocitelor la ciută a fost de  $30.08 \pm 24.7\%$  celule, comparativ cu viței la care s-a înregistrat o valoare de  $51.81 \pm 4.28\%$ . În schimb, numărul de neutrofile a fost semnificativ mai mare atât la ciută ( $49.32 \pm 15.07\%$ ), cât și la cerb ( $49.69 \pm 7.25\%$ ), comparativ cu valorile înregistrate la viței, unde valoarea medie a neutrofilelor a fost mai mică cu aproximativ zece procente, respectiv  $40.53 \pm 4.34\%$ .

Lizozimul seric a înregistrat diferențe foarte mari de la un animal la altul și de la o categorie de rumeător la alta, cu mențiunea că coeficientul de variabilitate a fost cuprins între 6.34 și 14.67%. La cerbul lopătar valoarea medie a lizozimului seric a fost de  $75.75 \pm 10.54$  mg/100 cm<sup>3</sup> ser cu un coeficient de variabilitate de 14.67%. La ciută, valorile lizozimului seric au înregistrat diferențe semnificative față de cerb, de aproximativ zece mg/100 cm<sup>3</sup>, media valorilor înregistrate fiind de  $84.4 \pm 7.62$  mg/100 cm<sup>3</sup> ser. Comparativ cu rumeătoarele sălbatice, la viței, valorile lizozimului seric au fost mult mai mici, diferența dintre valorile medii ale celor două categorii de rumeătoare fiind de  $71.36$  mg/100 cm<sup>3</sup> față de ciută și de  $62.71$  mg/100 cm<sup>3</sup> față de cerb.

Concentrația de properdină a avut o evoluție asemănătoare cu cea constatată la lizozim, cu mențiunea că valorile medii au fost semnificativ mai mari, comparativ cu cele de la lizozim, la toate cele trei categorii de animale luate în studiu.

În concluzie, analizând rezultatele înregistrate la cele două categorii de rumeătoare, domestice și sălbatice, putem afirma că atât lizozimul seric, cât și properdina, au prezentat valori mult mai mari la rumeătoarele

sălbatică, care în mod cert influențează imunitatea naturală la rumegătoarele sălbatică, ceea ce poate explica numărul extrem de redus al prezenței unor boli infecțioase la aceste animale.

Ultima parte a tezei, include în **capitolul 10**, „Concluziile generale”, aspectele practice care se deduc din cercetările efectuate, recomandările pentru practicieni și relevarea aspectelor de noutate, dintre care menționăm:

✚ Din cele trei fonduri de fonduri de vânătoare din vestul țării au fost izolate și identificate, pe baza examenelor bacteriologice, 221 de tulpini bacteriene (92.08%), 19 probe (7.92%) fiind sterile, dintr-un total de 240 probe, prelevate de la cerbi și ciute aparținând speciei *Dama dama*, imediat după împușcare.

✚ Cele 221 de tulpini bacteriene, izolate prin metodele clasice, au fost încadrate, în urma examenelor bacterioscopice, în 104 tulpini Gram negative (47.06%) și 117 tulpini Gram pozitive (52.94%).

✚ Determinările efectuate cu sistemul Vitek2 Compact, după izolarea și identificarea primară, a permis încadrarea celor 221 de tulpini izolate în 18 specii, respectiv, cinci Gram negative și 13 Gram pozitive.

✚ Cele 104 tulpini Gram negative, au fost încadrate în următoarele specii: *E. coli* (81.73%) *Salmonella* spp. (9.62%), *P. oleovorans* (0.96%), *P. rettgeri* (0.96%), *E. aerogenes* (0.96%) și *Enterobacter* spp. (1.92%).

✚ Dintre speciile genului *Pseudomonas*, specia *P. oleovorans*, implicată în unele procese patologice la om, a fost izolată pentru prima dată în țara noastră, de la un cerb lopătar.

✚ Principalele specii Gram pozitive identificate au fost: *S. lentus* (29.06%), *S. vitulinus* (14.53%) și *S. aureus* (12.82%), la care s-au adăugat și unele specii încadrate în alte genuri: *L. monocytogenes* (4.27%), *A. viridans* (4.27%), *Enterococcus faecium*, *Rothia dentocariosa* și *Kocuria kristinae*.

✚ *L. monocytogenes*, izolată din cinci probe, recoltate din cavitatea nazală, de la doi cerbi și trei ciute din zona Nadăș, alături de *E. faecium*, au fost izolate pentru prima dată la cerbii și ciutele din vestul țării.

✚ Pe baza rezultatelor obținute putem afirma că este posibil ca în populațiile de cerb lopătar, din cele trei fonduri de vânătoare luate în studiu, să circule și alte tulpini bacteriene, pentru evidențierea acestora fiind necesară efectuarea de teste serologice pe probe de sânge recoltate de la fiecare animal.

✚ În populațiile de animale sălbatică, în care este semnalată frecvent prezența umană, inclusiv o prezență constantă a animalelor domestice, în ciuda percepției unui risc scăzut de dezvoltare a rezistenței la substanțele antimicrobiene, este posibil să se dezvolte frecvent fenomene de rezistență la antibiotice.

✚ La tulpinile de *Escherichia coli*, izolate de la animalele din fondul de vânătoare Socodor, comparativ cu cele izolate din Chișineu Criș - Sălișteanca și Nadăș, s-a constatat o rezistență semnificativă la majoritatea substanțelor antimicrobiene testate, cuprinsă între 50 și 90%.

✚ Tulpinile de *Escherichia coli*, izolate de la animalele din fondul de vânătoare Socodor, au fost rezistente (100%), la ampicilină, amoxicilină/acid clavulanic, ciprofloxacina și azitromicină.

✚ Comparativ cu *E. coli*, la celelalte bacterii Gram negative s-a constatat o sensibilitate de 100% la *P. oleovorans*, 90% la *Enterobacter* spp. și 80% la *Providencia rettgeri*.

✚ Diferențele semnificative, privind fenomenul de antibierezistență, constatate între speciile izolate de la animalele din zona Socodor și speciile izolate din zonele Chișineu Criș - Sălișteanca și Nadăș, sunt o consecință a influenței factorului uman, favorizat de existența cursului de apă Crișul Alb, frecventat de un număr mare de persoane, inclusiv pescari și persoane venite pentru relaxare în apropierea râului.

✚ Prezența unor specii bacteriene rezistente la unele substanțe antimicrobiene, cum ar fi *E. coli* și *Salmonella* spp., la animalele sălbatică din anumite zone silvatică, demonstrează că fauna sălbatică are potențialul de a servi ca rezervor de germeni, inclusiv bacterii la care este prezent fenomenul de rezistență antimicrobiană.

✚ Testările privind rezistența antimicrobiană la speciile izolate de la cerbul lopătar, efectuate cu echipamentul Vitek2 Compact, au confirmat, în general, rezultatele obținute prin metoda disc-difuzimetrică Kirby-Bauer.

✚ Cea mai importantă corelație, din punct de vedere practic, a fost cea dintre comportamentul la substanțele antimicrobiene și originea tulpinilor, în sensul că tulpinile cele mai rezistente la acțiunea substanțelor antimicrobiene au fost izolate de la cerbii și ciutele din zona Socodor.

✚ La patru din cele zece tulpini de *E. coli*, izolate de la animalele din zona Socodor și testate cu echipamentul Vitek2, s-a constatat o rezistență de 87,5% la șapte beta-lactamine (ampicilină, amoxicilină/ acid clavulanic, cefalexin, cefalotin, cefquinonă, cefoperazonă, ceftiofur), singura substanță la care toate tulpinile au fost sensibile fiind imipenemul.

✚ La aminoglicozide, tulpinile de *E. coli* au fost sensibile la amikacină (100%), la neomicină au fost sensibile șapte, iar la gentamicină și flumechină cinci au fost sensibile și cinci rezistente, cu mențiunea că între cele rezistente s-au regăsit și cele care au dezvoltat o rezistență semnificativă la beta-lactamine.

✚ Pe categorii de substanțe, cele mai eficiente antibiotice au fost următoarele: din clasa beta-lactaminelor, amikacina și imipenemul, la care au fost sensibile toate cele 47 de tulpini luate în studiu (100%), urmate de nitrofurantoin, la care au fost sensibile 45 de tulpini (95,74%), neomicină, 44 de tulpini (93,62%), ceftiofur, 43

de tulpini (91,49%), trimethoprim/sulfametoxazole și marbofloxacină, la care au fost sensibile 42 de tulpini (89,36%).

🔬 Rezultatele privind susceptibilitatea antimicrobiană a unor specii Gram pozitive, izolate de la cerbii și ciutele de cerb lopătar, din cele trei fonduri de vânatoare luate în studiu, au fost asemănătoare cu cele obținute la speciile Gram negative.

🔬 Deși din probe de la cervide se pot izola și germeni cu potențial patogen, la care este prezent fenomenul de rezistență antimicrobiană, majoritatea rezultatelor indică faptul că speciile de cervide nu constituie un rezervor infecțios important nici pentru agenții patogeni umani, nici pentru microorganismele rezistente la antibiotice incluse în studiu.

🔬 Tehnica reacției în lanț a polimerazei, utilizată pentru confirmarea moleculară a genelor de rezistență la beta-lactamaze cu spectru extins, la patru din zece tulpini de *Escherichia coli*, a generat benzi de aproximativ 858 pb TEM și 1016 pb SHV.

🔬 Rezultatele prezentului studiu au demonstrat faptul că metoda PCR, având ca target genele TEM și SHV s-a dovedit una simplă, rapidă, sigură și ușor reproductibilă, evidențiindu-se totodată specificitatea acestor gene și posibilitatea utilizării lor pentru confirmarea fenomenului de antibioretistență.

🔬 Aceste rezultate confirmă ipoteză conform căreia sănătatea oamenilor, a animalelor domestice și sălbatice, precum și a ecosistemelor, sunt interconectate, consolidând importanța abordării One Health pentru o mai bună monitorizare și control a amenințărilor reale pentru sănătatea publică.

🔬 Identificarea unor gene de rezistență la *Escherichia coli* față de antimicrobienele utilizate în medicina umană, la vânatul sălbatic, deschide oportunități ulterioare de monitorizare a altor gene, la un efectiv mult mai mare.

🔬 Dintre parametrii hematologici evaluați, numărul de leucocite, alături de numărul de limfocite și monocite, de la cele trei categorii de animale (cerb, ciută, vițel), au prezentat diferențe semnificative între rumegetoarele sălbatice și cele domestice.

🔬 Dintre factorii umorali nespecifici, lizozimul și properdina au înregistrat diferențe, uneori semnificative, între masculii și femelele de cerb lopătar, valorile fiind mai mari la femele la ambii parametri investigați.

🔬 Comparativ cu rumegetoarele sălbatice, la vițel, lizozimul și properdina serică au înregistrat valori mult mai mici, chiar și de trei, patru ori, la toate anumele luate în studiu.

🔬 Pe baza rezultatelor obținute, în urma determinărilor de laborator, putem afirma că la rumegetoarele sălbatice, comparativ cu cele domestice, nivelul parametrilor imuni umorali nespecifici atinge valori mult mai mari ceea ce asigură o imunitate nespecifică extrem de eficientă în cazul unor contaminări cu microorganismele cu care vin în contact.

Elementele de originalitate ale tezei reies din faptul că aceasta este prima cercetare mai amplă privind flora bacteriană și nivelul principalilor efectori imuni nespecifici la cerbul lopătar din fondurile de vânatoare din sud-vestul României. De asemenea, este menționată prezența unor specii cu potențial patogen pentru om, izolate pentru prima dată la cerbul lopătar din țara noastră.

Un alt aspect important și original al tezei îl constituie studiul fenomenului de antibioretistență la tulpini izolate de la cerbul lopătar, atât prin metode clasice, cât și prin metode moderne, inclusiv de biologie moleculară.

Nu în ultimul rând menționăm studiile privind nivelul și evoluția principalilor efectori imun nespecifici (umorali și celulari) cu rol determinant în menținerea imunostaziei generale a acestor rumegetoare sălbatice.



## PhD Thesis Summary

### Microbiological and immunological research at fallow deer (*Dama dama*)

#### This thesis contains:

*Abstracts in Romanian and English*

*Introduction*

*Part I - Bibliographic research:* 35 pages

*Part II - Own research:* 93 pages

*Tables:* 47

*Figures:* 63

*Bibliography sources:* 261

*List of published scientific papers*

#### Purpose and objectives of the research

In the regulation of June 4, 2008 regarding the authorisation, organization and practice of hunting, included in Order no. 353/2008, approved on July 3, 2008, in the general provisions it is mentioned that hunting is the act of stalking, searching, inciting, following, stalking or any other activity with the purpose of capturing game or killing it, carried out by one or several persons who have the legal right to practice hunting, in accordance with the provisions of the Hunting Law and the protection of the hunting fund no. 407/2006, with subsequent amendments and additions.

For the continued development of the hunting sector, it is necessary to know as well as possible the biology of the species of hunting interest, the microbial flora with impact on the health of the animals, but also the modern methods of growth, husbandry and harvesting, so as to make the best use of them this natural wealth of the country.

In Romania, thanks to the favorable environmental conditions, there are numerous game species, specific to each vegetation zone and each region. For example, only in the Danube Delta, there are over 200 species of aquatic game, and in the mountains, but also in the plain region, there are a large number of other species, among which we can mention: the roe deer (*Capreolus capreolus*), the deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), wild boar (*Sus scrofa*), rabbit (*Lepus europaeus*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Perdix perdix*) etc. To these are also added the predatory game species, such as: the wolf (*Lupus canis*), the fox (*Vulpes vulpes*), the wild cat (*Felis silvestris silvestris*), the weasel (*Mustela nivalis*).

Among the species mentioned above, according to official data, on the territory of our country, the fallow deer is one of the species widespread in the western part, with the mention that populations and repopulations were also made in 27 other counties. For example, on the hunting grounds of Socodor, Arad, there are over 1,000 specimens, being the fallow deer reservation with the largest population of free-ranging deer in Europe, and on the territory of Luncoiul de Jos commune, Hunedoara, there are also a number of 45 fallow deer heads, on an area of 600 hectares, making up the Valea Lungă Kinetic Reserve.

In fact, the fallow deer (*Dama dama*), along with other cervids, but also the rabbit, the wild boar, the pheasant, represent game species of major importance in our country, being hunted for their meat, which possesses indisputable dietary qualities. However, game meat can sometimes present a major zoonotic risk, both for the consumer and the hunter. For example, among microbial and parasitic germs with zoonotic potential, which can cause serious diseases in humans, following the consumption of game meat, we can mention: *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. multocida*, *Listeria* sp., *F. tularensis*, *Y. enterocolitica*, hepatitis E virus, *Trichinella* et al. In this context, we consider it necessary to know the microbial flora and the risk to which humans are exposed when they consume game meat, in general, and fallow deer in particular. Bacterial flora can become physiological, pathological representing both humans and animals, a major health risk.

Research on portage microflora and the risk it represents is particularly important as game meat must also comply with the same microbiological standards required for meat from farm animals. Currently, there is a relatively small number of researches, both regarding the microbial flora existing in cervid species, and regarding the diseases found in these animals, both in our country and internationally. Knowing the microbial

profile and the immune status of fallow deer is of real use for a better understanding of the risk to which this category of animals, as well as humans, is subjected.

Among viral diseases we can mention in particular epizootic hemorrhagic disease (EHD), "blue tongue" disease and malignant catarrhal fever. Along with infectious diseases of viral etiology, there are also a large number of bacterial diseases present in the herds of this species. Among these we mention tuberculosis and paratuberculosis, diseases found quite frequently in fallow deer populations, but also in other game animals. Salmonellosis is another disease of bacterial origin, reported in some cervid species. Infections caused by Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) constitute the third most frequently reported zoonosis in the European Union, after campylobacteriosis and salmonellosis. Pasteurellosis is another infectious bacterial disease that occurs in wild ruminant species.

Considering the existence of a large population of this species, in the hunting grounds of our country, in this work we proposed to carry out an evaluation of the bacterial flora present in fallow deer, including the phenomenon of antimicrobial resistance in the main species of isolated bacteria. Last but not least, considering the lack of a study on portage microflora and its correlation with the immune system of the studied species, we proposed an evaluation of the main non-specific immune effectors, both cellular and molecular.

All these directions of research allowed the outline of the present study, which has as its general objective the study of the microbial flora and some non-specific immune effectors in fallow deer. Among the specific objectives of this research, we mention:

- isolation and identification of the main bacterial species from male and female fallow deer, from samples collected from the nasal cavity and rectum, immediately after shooting the animals;
- the study of the behavior of bacteria isolated on usual, standardized media, but also on selective media for the main groups of germs;
- the study of the biochemical behavior of the isolated bacterial strains, on multitest media;
- identification and classification of isolated bacterial strains into species, genera and families using modern methods, namely the Vitek2 Compact system;
- research on the behavior of some of the isolated bacterial species towards antimicrobial substances;
- molecular characterization of some strains of *E. coli*, isolated from samples collected from animals from the Socodor hunting fund, by the polymerase chain reaction (PCR) technique;
- evaluation of the non-specific immune status, by determining some cellular and molecular effectors, on blood samples collected from male and female fallow deer, immediately after shooting.

## **Part I**

### **Current state of knowledge**

It is extended on 35 pages (27.34% of the thesis), being structured on three chapters, which include nine subchapters.

#### **Chapter 1. Taxonomic classification, nomenclature and distribution of the fallow deer (*Dama dama*)**

It contains information about the taxonomic classification and geographical distribution of the fallow deer in our country. According to the data from the specialized literature, in Romania, there are over 3,200 mammals, classified in the Mammalia class, of which approximately 30 are species of hunting interest, 11 of which are protected due to the significant decrease in numbers in Europe or on other continents. Among the species of hunting interest, the most important belong to the following families: *Cervidae*, includes ruminants with deciduous horns, among which we can mention: red deer (*Cervus elaphus* L.), fallow deer (*Dama dama* L.), roe deer (*Capreolus capreolus* L.), elk (*Alces alces* L.), Sika deer (*Cervus nipon* T.), Virginia deer (*Cervus virginianus* B.) and Axis deer (*Cervus axis* E.); *Bovidae*, also includes ruminants, but with persistent horns, of which the most important species are: the black goat (*Rupicapra rupicapra* L.), the mountain goat (*Capra ibex* L.), the Spanish goat (*Capra pyreneica* S.), the mouflon (*Ovis musimon* P.) and the bison (*Bison bonasus* L.).

The family *Cervidae* includes four subfamilies: *Cervinae*, with the genera *Dama*, *Axis*, *Cervus* and *Elaphurus*; *Hydropotinae* of which the genus *Hydropotes* is a part; *Muntiacinae* with the genera *Elaphodus*, *Muntiacus* and *Megamuntiacus* and the subfamily *Odocoileinae*, which includes the genera *Odocoileus*, *Blastocercus*, *Ozotoceros*, *Hippocamelus*, *Mazama*, *Pudu*, *Alces*, *Rangifer* and *Capreolus*.

The fallow deer (*Dama dama*) is a herbivore from the kingdom *Animalia*, phylum *Chordata*, which is part of the class *Mammalia*, order *Artiodactyla*, suborder *Ungulata*, family *Cervidae*, subfamily *Cervinae*, tribe *Cervini*, genus *Dama*, type species *Dama dama*. The order *Artiodactyla* includes hooves that step on two or four toes, in the latter case two of them are atrophied. Three species are found in our country: the red deer (*Cervus elaphus* L.), the roe deer or goat (*Capreolus capreolus* L.) and the fallow deer (*Dama dama* L.).

The fallow deer is a Mediterranean cervid species, originally from Asia Minor, which was colonized by the Romans in the Iberian Peninsula, Gaul and the British Isles since the 3rd and 4th centuries AD. It was acclimatized in Central Europe in the 16th century, and it is currently spread insularly throughout Europe. In Romania there is a fairly large population of fallow deer, distributed in the main hunting funds throughout the country. According to data from the specialized literature, as early as 1904, the first game reserve was created in the southwestern part of Romania, animals were brought from Austria, the Czech Republic and other Central European countries. In 1968, Micu et al., state that, at the national level, there were over 4000 individuals, and the population leveled at approximately 6000 individuals between 2000 and 2006. The herd density is not regulated by the latest instructions, but it is estimated that it is between 20 and 100 individuals per 1,000 ha, depending on the quality of the land.

## **Chapter 2. Description and characterization of fallow deer (*Dama dama*)**

In the first sub-chapter "*Description of the studied species*" the main characteristics of the species are presented, both those specific to males and those specific to females. Within the species, the male is called a shoveler or a bull, the female is called a shoveler, and the child up to one year old is called a calf. It is a game species with easy and cheap maintenance, highly sought after by hunters, both for its meat and especially for trophies. The meat is of high quality, rich in protein, with a low cholesterol content. The rutting period is in October, and calving is in May-June. The mating system is polygamous, the males emit sounds, "munk", only during the breeding season as the social structure varies from solitary during the non-mating seasons to a herd structure during the mating season. Females reach sexual maturity at the age of one year and five months, and males at two and a half years. In Romania, mating takes place from mid-October to mid-November.

In the sub-chapter "*Eating behavior of the species*" the main aspects regarding the preferences and eating habits of the species are presented, depending also on the availability of resources. Thus, according to data from specialized literature, fallow deer prefer a wide variety of vegetation, from pasture grass, to branches, sedges, but they also eat trees and shrubs, including young shoots, beech acorns, chestnuts, acorns, roots, vegetables, flowers, and from crops, dry leaves, tree bark and moss, fungi and lichens.

The chapter ends with the subchapter "*Social behavior of the species*" in which we are presented with information specific to males and females. Thus, the species prefers group behavior, in some areas herds of up to thirty individuals have been observed, and in other areas, the animals show a less sociable behavior. A seasonal variation in group size has also been observed, with females, their cubs and young up to one year old forming groups known as deer herds, while mature males form bachelor groups. Fallen deer have senses such as: smell, hearing and sight, very well developed, but they communicate through body language, smell and sounds.

## **Chapter 3. Portage bacterial flora in fallow deer (*Dama dama*)**

The main bacterial species with implications in the etiology of infectious diseases found in these animals, as well as those with zoonotic risk that can contribute to the transmission of infectious diseases to humans or domestic animals, both through direct and indirect contact, are briefly presented. We also mention in the "One Health" approach, the special importance of wildlife and the wild environment in the maintenance and dissemination of some bacterial zoonoses.

Among the etiological agents involved in the occurrence of bacterial zoonoses, we mention, in particular, the bacteria belonging to the genera: *Pasteurella*, *Leptospira*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Yersinia* and *Listeria*. Bacteria belonging to the genus *Staphylococcus*, namely *S. aureus*, *S. sciuri* subsp. *sciuri* and *S. xylosus*. Also, according to some data from the specialized literature, game animals, deer, roe deer and wild boars are considered important reservoirs of pathogenic germs of food origin, which can cause serious diseases in humans and can contaminate fresh food products.

## **Chapter 4. "Immunity aspects in fallow deer (*Dama dama*)**

In the sub-chapter "*General information on the main immune effectors*" aspects regarding the immune system in cervids and aspects regarding the innate and acquired immune mechanisms with a role in ensuring immunostasis in these animals are presented. We mention that, also in these wild animals, immunocompetence is influenced by numerous factors, endogenous and exogenous, among which we can mention food intake, environmental conditions, including season, stress, sex, etc. There are opinions according to which immunocompetence shows an accentuated sexual dimorphism, ie females show a general increased immunoreactivity, compared to males. The structural elements of the immune system in ruminants, whether domestic or wild, are similar to those of most mammalian species and include both organs and tissues, as well as cells and molecules, involved in the specific and non-specific immune response. Also, general aspects are presented regarding the primary and secondary lymphoid organs, respectively the main cells and molecules (immunoglobulins) that carry out the immune function in cervids. At the end of the chapter, "up-to-date" aspects are presented regarding the immune response to fallow deer.

### **Chapter 5. Values of the main hematological and biochemical parameters in fallow deer**

In the first sub-chapter "*The values of the main hematological parameters*" the values of the main hematological parameters in wild ruminants, in general, and in fallow deer (*Dama dama*) in particular, are presented. Following laboratory investigations, the values of these parameters were established by several researchers, as follows: erythrocytes  $9.2 \pm 0.2 \times 10^6/\text{mm}^3$ , hematocrit  $46.7 \pm 0.6\%$ , hemoglobin  $16.4 \pm 0.3 \text{ g}/100 \text{ ml}$ , mean concentration of erythrocyte hemoglobin  $35.1 \pm 0.2\%$  and total leukocytes  $3.0 \pm 0.1 \times 10^3/\text{mm}^3$ .

Given the special interest in the management and health status of breeding animals, belonging to the genus *Dama*, we also consider it extremely important to know the blood biochemical composition, a necessary condition for the recognition and diagnosis of diseases and health problems that affect the deer population in the sylvatic environment, but also from breeders. Thus, in the sub-chapter "*The values of the main biochemical parameters in fallow deer*" extremely interesting values of these parameters are presented, as follows: aspartate aminotransferase ( $145.6 \pm 73.5 \text{ U/L}$ ), alanine aminotransferase ( $49.4 \pm 13.5 \text{ U/L}$ ), lactate dehydrogenase ( $1155 \pm 535 \text{ U/L}$ ), glutamyltransferase ( $38.7 \pm 19.9 \text{ U/L}$ ), urea ( $6.23 \pm 2.39 \text{ mmol/L}$ ), creatinine ( $150.9 \pm 36.5 \mu\text{mol/L}$ ), total proteins ( $60.9 \pm 7.7 \text{ g/L}$ ), albumin ( $38.3 \pm 8.6 \text{ g/L}$ ) and glucose ( $5.1 \pm 3.9 \text{ mmol/L}$ ).

The values obtained showed significant differences, from one sample to another, depending on both the age of the animals and the sex (males and females). Along with the factors mentioned above, which sometimes significantly influence the values of the main biochemical parameters, an important role in their evolution also belongs to sampling techniques, but also to individual differences between animals, including some internal and external factors, such as: genetic, environmental, nutritional, physiological factors, including the stress to which animals are subjected at the time of sample collection.

## **Part II. Own research**

This part extends over 93 pages (72.66% of the thesis) and includes four large chapters, to which the general conclusions are added.

The own research was included in five chapters:

6. Research on potentially pathogenic bacterial flora in fallow deer (*Dama dama*)
7. Research on the behavior of some bacterial strains, isolated from fallow deer, towards antimicrobial substances
8. Monitoring the genotypic resistance to antimicrobials, through molecular biology techniques, of some strains of *E. coli* isolated from fallow deer by polymerase chain reaction (PCR) technique
9. Research on the level of non-specific immune effectors in fallow deer

Each chapter is structured into four subchapters:

- Purpose and objectives;
- Materials and methods;
- Results and discussions;
- Conclusions.

### **Chapter 6. Research on potentially pathogenic bacterial flora in fallow deer (*Dama dama*)**

*The objective of the study*



The research focused on the isolation and identification of the main bacterial species from deer and fawns, belonging to the species *Dama dama*, with pathogenic potential for this species, for humans and animals, as well as in the contamination of meat.

#### **Materials and methods**

The research was carried out over four years, between 2017 and 2021, taking into account a number of 240 samples, collected from 120 animals, in duplicate. The samples were collected from deer and fawns, of different ages, immediately after shooting, from three hunting funds, from the south-western part of Romania, respectively two hunting funds from the counties of Arad, Socodor and Chişinău-Criş - Sălişteanca and one from Timiş County (Nadaş).

The determinations were made in the laboratory of the discipline of Microbiology and Immunology, within the Timişoara Faculty of Veterinary Medicine. We mention that the working methodology was the standard one, in the case of primary inoculations, respectively in/on simple usual media, from which re-inoculations were made on selective culture media, both for Gram negative and Gram positive bacteria. Levine and Rambach media were used to identify Gram-negative bacteria, and Oxford and Chapman media were used for Gram-positive ones. Later, from the isolated colonies, developed on the surface of the selective media, reseeded was carried out on blood agar, in order to obtain pure, 24-hour cultures, necessary for the identification of bacterial species with the Vitek2 Compact equipment.

#### **Obtained results**

During the bacterioscopic examination of the smears, bacillary and coccobacillary germs were highlighted, isolated or in irregular piles, pure culture, stained both Gram positive and Gram negative. Also, in the smears performed on the surface of the Chapman medium, the presence of cocci-shaped bacteria, isolated or in irregular piles, characteristic of species belonging to the genus *Staphylococcus*, was highlighted. Corroborating the main cultural aspects, developed on selective culture media, with the morphological aspects, highlighted during the bacterioscopic examination, we were able to confirm the presence of some species of colibacilli and staphylococci, respectively the species: *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., but also *Pseudomonas* spp.

Following the examination of the morphological and cultural characters, developed by the seeded bacteria, from the 240 samples, 221 bacterial strains (92.08%) were identified, 19 samples (7.92%) being sterile, belonging to 13 genera, respectively five Gram negative (*Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Providencia* and *Pseudomonas*) and eight Gram positives (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Rothia*, *Kocuria*, *Gemella* and *Listeria*).

With the Vitek2 Compact system, the following results were obtained: of the 104 Gram negative strains, the majority (81.73%) belonged to the *Escherichia coli* species, ten strains of some species belonging to the *Salmonella* genus (9.62%), the others, isolated and identified less often, being *Pseudomonas oleovorans* (0.96%), *Providencia rettgeri* (0.96%), *Enterobacter aerogenes* (0.96%) and *Enterobacter* spp. (1.92%). The majority of Gram positive bacteria belonged to species belonging to the genus *Staphylococcus*, respectively: *S. lentus* (29.06%), *S. vitulinus* (14.53%) and *S. aureus* (12.82%), to which other species were added, such as: *Listeria monocytogenes* (4.27%), *Aerococcus viridans* (4.27%), *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Gemella* sp., *Rothia dentocariosa* and *Kocuria kristinae*.

## **Chapter 7. Research on the behavior of some bacterial strains, isolated from fallow deer, towards antimicrobial substances**

### **The objective of the study**

The fundamental objective of this chapter was to evaluate the levels of resistance to antimicrobial substances of some strains of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. etc., isolated from the nasal cavity and rectum of deer and fawns, of different ages, immediately after shooting, from three hunting funds in the southwest of the country.

### **Materials and methods**

Antimicrobial susceptibility testing of bacterial strains was carried out, in a first step, by the Kirby and Bauer disc-diffusimetric method, used according to CLSI guidelines (2018), using fresh 18-24 hour cultures on nutrient agar. A positive control strain *Escherichia coli* ATCC 25922 and a negative control were used for the accuracy of the results. The method allows a semi-quantitative evaluation of the sensitivity to antimicrobial substances of aerobic bacteria, of fast-growing pathogenic bacteria, and of some bacteria that are more demanding on cultivation conditions. For this purpose, microtablets impregnated with antibacterial substances are used, in

certain concentrations, applied later on the surface of the environment, previously inoculated with the bacterial suspension from the strain under test.

For susceptibility testing, only Gram negative species were studied, from the Socodor area five *Escherichia coli* strains were studied, three belonging to the *Enterobacter* genus, one strain of *Pseudomonas oleovorans* and one of *Providencia rettgeri*, and from the other two hunting funds (Chişineu Criş - Sălişteanca and Nadăş), five strains of *Escherichia coli* from each area, respectively three of *Salmonella* spp. and two of *Enterobacter* spp.

In the second stage, the study of susceptibility to the action of the main classes of antimicrobial substances was carried out with the Vitek-2 system. 32 strains of *Escherichia coli*, 11 strains belonging to the genus *Enterobacter*, six strains of *Salmonella* spp., and one strain each of *Pseudomonas oleovorans* and *Providencia rettgeri* were tested. Among the Gram positive species, 45 strains were tested, respectively 11 of *Staphylococcus sciuri*, ten of *S. lentus*, seven of *S. vitulinus*, eight of *S. xylosus* and one strain of *S. aureus*. To these were added four strains of *Aerococcus viridans*, three strains of *Kocuria* spp. and one strain of *Enterococcus faecium*.

#### **Obtained results**

Results regarding the antimicrobial susceptibility of some bacterial species, by the diffusimetric method, were different, depending on the hunting ground from which the samples were collected and the tested bacterial species. Thus, in *E. coli*, isolated from the animals of the Socodor hunting fund, compared to the strains isolated from the hunting funds, Chişineu Criş - Sălişteanca and Nadăş, a significant resistance to most of the antimicrobial substances tested was found, between 50 and 90%. All five *Escherichia coli* strains isolated from the Socodor hunting stock were resistant (100%) to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin and azithromycin. In contrast, *Pseudomonas oleovorans* was sensitive to all antimicrobial substances tested (100%), *Enterobacter* spp., to nine out of ten substances (90%), and *Providencia rettgeri*, sensitive to eight substances (80%).

The results obtained with the Vitek 2 system, dependent on the hunting background, showed that the most conclusive susceptibility was recorded in the species isolated from the Nadăş area, followed by those isolated from the Chişinău Criş - Sălişteanca area. On the other hand, in the ten strains of *Escherichia coli*, isolated from animals in the Socodor area, a resistance of 87.5% to seven beta-lactams was found (ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cephalixin, cephalothin, cefquinone, cefoperazone, ceftiofur), the only substance to which all strains were sensitive being imipenem. For aminoglycosides, *Escherichia coli* strains were sensitive to amikacin (100%), to neomycin seven were sensitive, and to gentamicin and flumequine five were sensitive and five resistant.

By substance category, the most effective antibiotics were the following: from the beta-lactam class, amikacin and imipenem, to which all 47 strains studied (100%) were sensitive, followed by nitrofurantoin, to which 45 were sensitive of strains (95.74%), neomycin, 44 strains (93.62%), ceftiofur, 43 strains (91.49%), trimethoprim/sulfamethoxazole and marbofloxacin, to which 42 strains (89, 36%). The results regarding the antimicrobial susceptibility of some Gram-positive species were similar to those obtained for Gram-negative species, with the mention that a variable susceptibility was found from one strain to another and from one bacterial species to another.

In conclusion, it can be stated that, although potentially pathogenic germs can be isolated from cervid samples, in which the phenomenon of resistance to antimicrobial substances is also present, most of the results indicate that cervid species do not constitute an important infectious reservoir either for human pathogens, nor for the antibiotic-resistant microorganisms included in the study.

### **Chapter 8. Monitoring the genotypic resistance to antimicrobials, through molecular biology techniques, of some strains of *Escherichia coli* isolated from fallow deer through the polymerase chain reaction (PCR) technique**

#### ***The objective of the study***

The fundamental objective of the research was to investigate the presence and patterns of genotypic resistance, to certain antimicrobial substances, of some strains of *Escherichia coli* isolated from fawns and fallow deer (*Dama dama*) from a hunting fund in western Romania.

#### ***Materials and methods***

The study was carried out between April and May 2022, on a number of four strains of *E. coli*, isolated from male and female fallow deer (*Dama dama*), from the Socodor hunting fund, previously identified by bacteriological diagnostic methods, classic and modern. The PCR technique aimed to identify the TEM and SHV

genes of some *E. coli* strains that offer genotypic resistance to extended-spectrum beta-lactamases, according to the technique described by Rasheed et al. (2000).

#### ***Obtained results***

The presence of bacteria carrying antimicrobial resistance (AMR) genes in wildlife is an important indicator that resistant bacteria, of human or animal origin, are widespread in all natural environments. Based on the analysis of the blaTEM and respectively blaSHV genes, in all four isolates studied (V1-V4), the polymerase chain reaction (PCR) technique revealed sizes of the amplified fragments of approximately 858 bp TEM and 1016 bp SHV respectively. The size of these bands, of consistent thickness and obvious brightness, confirmed that *E. coli* strains isolated from fallow deer, characterized in terms of genetic resistance, include resistance genes and that these genes are easily amplified.

In conclusion, we can state that the polymerase chain reaction technique, in which specific primers were used to detect resistance genes in *E. coli* strains, isolated from fawns and deer belonging to the *Dama dama* species, can be considered one with a increased specificity and sensitivity for this purpose.

### **Chapter 9. Research on the level of non-specific immune effectors in fallow deer**

#### ***The objective of the study***

The main objective of the study was to evaluate the main non-specific, humoral (serum lysozyme and properdin) and cellular immune effectors in wild ruminants (male and female fallow deer - *Dama dama*), compared to those in domestic ruminants (calves).

#### ***Materials and methods***

The research was carried out between January and February 2021, on 30 biological samples (blood), respectively 20 obtained from ten deer and ten young fallow deer (*Dama dama*), as well as ten samples collected from calves aged about two years. From wild ruminants, blood samples were collected in EDTA vacutainers from the jugular vein immediately after the animals were sacrificed.

The quantitative hematological examination was performed with the help of the automatic hematological analyzer MB-1830 (Maysun Technology Co., Ltd., R.P. China), a veterinary and human equipment, which allows the determination of the following hematological parameters: the total number of leukocytes; the number of lymphocytes, monocytes and granulocytes; the number of erythrocytes; hematocrit (Ht); hemoglobin (Hb) concentration; mean erythrocyte volume (MEV); mean erythrocyte hemoglobin (HEM); mean erythrocyte concentration (CHEM); erythrocyte size variation coefficient (RDW); platelet count and mean platelet volume (MPV).

The qualitative hematological examination was performed on blood smears examined under a microscope, in order to determine the leukocyte formula. The smears were made by the classic method, and two methods were used for staining, namely the May-Grünwald-Giemsa method, in standard technique and the Diff-Quik method, in standard technique.

The serum lysozyme concentration was determined by the diffusimetric method taken from S.N. Pasteur Institut S.A., and the serum properdin concentration was established using the colorimetric method.

#### ***Obtained results***

The hematological parameters investigated reached close values in deer and fawn, the differences found between males and females not being significant. Among them, the number of leukocytes, lymphocytes and monocytes, determined in the three categories of animals, showed significant differences between wild and domestic ruminants. Thus, monocytes and leukocytes showed significantly higher values in wild ruminants (sable deer and fawn), compared to domestic ones. The presence of a higher number of leukocytes, in deer and fawn, correlated with a lower number of lymphocytes, the ratio being reversed in calves. The average value of lymphocytes in the heifer was  $30.08 \pm 24.7\%$  cells, compared to the calves where a value of  $51.81 \pm 4.28\%$  was recorded. On the contrary, the number of neutrophils was significantly higher both in the fawn ( $49.32 \pm 15.07\%$ ) and in the deer ( $49.69 \pm 7.25\%$ ), compared to the values recorded in the calves, where the average value of neutrophils was lower by approximately ten percent, respectively  $40.53 \pm 4.34\%$ .

Serum lysozyme showed very large differences from one animal to another and from one category of ruminant to another, with the mention that the coefficient of variability was between 6.34 and 14.67%. In fallow deer, the mean value of serum lysozyme was  $75.75 \pm 10.54$  mg/100 cm<sup>3</sup> serum with a coefficient of variability of 14.67%. In roe deer, serum lysozyme values recorded significant differences compared to deer, of approximately ten mg/100 cm<sup>3</sup>, the average of the recorded values being  $84.4 \pm 7.62$  mg/100 cm<sup>3</sup> serum. Compared to wild

ruminants, in calves, the serum lysozyme values were much lower, the difference between the average values of the two categories of ruminants being 71.36 mg/100 cm<sup>3</sup> compared to the deer and 62.71 mg/100 cm<sup>3</sup> compared to the deer.

The concentration of properdin had a similar evolution to that observed for lysozyme, with the mention that the average values were significantly higher, compared to those from lysozyme, in all three categories of animals studied.

In conclusion, analyzing the results recorded in the two categories of ruminants, domestic and wild, we can state that both serum lysozyme and properdin showed much higher values in wild ruminants, which certainly influence the natural immunity in wild ruminants, which which can explain the extremely low number of infectious diseases in these animals.

The last part of the thesis, includes in **chapter 10, "General conclusions"**, the practical aspects that can be deduced from the research carried out, the recommendations for practitioners and the revelation of new aspects, among which we mention:

- ✚ From the three funds of hunting funds in the west of the country, 221 bacterial strains (92.08%), 19 samples (7.92%) being sterile, out of a total of 240 samples, taken by in stags and fawns belonging to the *Dama dama* species, immediately after shooting.

- ✚ The 221 bacterial strains, isolated by classical methods, were classified, following bacterioscopic examinations, into 104 Gram negative strains (47.06%) and 117 Gram positive strains (52.94%).

- ✚ The determinations made with the Vitek2 Compact system, after isolation and primary identification, allowed the classification of the 221 isolated strains into 18 species, respectively, five Gram negative and 13 Gram positive.

- ✚ The 104 Gram negative strains were classified into the following species: *Escherichia coli* (81.73%) *Salmonella* spp. (9.62%), *Pseudomonas oleovorans* (0.96%), *Providencia rettgeri* (0.96%), *Enterobacter aerogenes* (0.96%) and *Enterobacter* spp. (1.92%).

- ✚ Among the species of the genus *Pseudomonas*, the species *P. oleovorans*, involved in some pathological processes in humans, was isolated for the first time in our country, from a fallow deer.

- ✚ The main Gram positive species identified were: *S. lentus* (29.06%), *S. vitulinus* (14.53%) and *S. aureus* (12.82%), to which were also added some species belonging to other genera: *L. monocytogenes* (4.27%), *A. viridans* (4.27%), *Enterococcus faecium*, *Rothia dentocariosa* and *Kocuria kristinae*.

- ✚ *Listeria monocytogenes*, isolated from five samples, collected from the nasal cavity, from two deer and three fawns from the Nadăș area, together with *Enterococcus faecium*, were isolated for the first time in deer and fawns from the west of the country.

- ✚ Based on the results obtained, we can state that it is possible that other bacterial strains circulate in the fallow deer populations, from the three hunting funds taken in the study, for their identification it is necessary to carry out serological tests on blood samples collected from each animal.

- ✚ In wild animal populations, where human presence is frequently reported, including a constant presence of domestic animals, despite the perceived low risk of developing resistance to antimicrobial substances, antibiotic resistance phenomena are likely to develop frequently.

- ✚ In the strains of *Escherichia coli*, isolated from the animals from the Socodor hunting fund, compared to those isolated from Chișinău Criș - Sălișteanca and Nadăș, a significant resistance to most of the antimicrobial substances tested was found, between 50 and 90%.

- ✚ *Escherichia coli* strains isolated from the animals of the Socodor hunting stock were resistant (100%) to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin and azithromycin.

- ✚ Compared to *Escherichia coli*, the other Gram-negative bacteria showed 100% sensitivity to *Pseudomonas oleovorans*, 90% to *Enterobacter* spp. and 80% to *Providencia rettgeri*.

- ✚ The significant differences, regarding the phenomenon of antibiotic resistance, found between the species isolated from the animals in the Socodor area and the species isolated from the Chișinău Criș - Sălișteanca and Nadăș areas, are a consequence of the influence of the human factor, favored by the existence of the Crișul Alb watercourse, frequented by a large number of people, including fishermen and people coming to relax near the river.

- ✚ The presence of bacterial species resistant to some antimicrobial substances, such as *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., in wild animals in certain sylvatic areas demonstrates that wildlife has the potential to serve as a reservoir of germs, including bacteria in which the phenomenon is present of antimicrobial resistance.

- ✚ Antimicrobial resistance testing of fallow deer isolates, performed with the Vitek2 Compact, generally confirmed the results obtained by the Kirby-Bauer disc diffusimetric method.

- ✚ The most important correlation, from a practical point of view, was that between the behavior to antimicrobial substances and the origin of the strains, in the sense that the strains most resistant to the action of antimicrobial substances were isolated from deer and roe deer in the Socodor area.

✚ In four of the ten strains of *Escherichia coli*, isolated from the animals in the Socodor area and tested with the Vitek2 equipment, a resistance of 87.5% to seven beta-lactams (ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cephalixin, cephalothin, cefquinone, cefoperazone, ceftiofur), the only substance to which all strains were sensitive was imipenem.

✚ For aminoglycosides, *Escherichia coli* strains were sensitive to amikacin (100%), to neomycin seven were sensitive, and to gentamicin and flumequine five were sensitive and five resistant, with the mention that among the resistant ones there were which have developed significant resistance to beta-lactams.

✚ By substance category, the most effective antibiotics were the following: from the beta-lactam class, amikacin and imipenem, to which all 47 strains studied (100%) were sensitive, followed by nitrofurantoin, to which they were sensitive 45 strains (95.74%), neomycin, 44 strains (93.62%), ceftiofur, 43 strains (91.49%), trimethoprim/sulfamethoxazole and marbofloxacin, to which 42 strains (89.36%).

✚ The results regarding the antimicrobial susceptibility of some Gram-positive species, isolated from deer and fallow deer fawns, from the three hunting funds studied, were similar to those obtained for Gram-negative species.

✚ Although potentially pathogenic germs, in which the phenomenon of antimicrobial resistance is present, can be isolated from cervid samples, most results indicate that cervid species do not constitute an important infectious reservoir for either human pathogens or antibiotic-resistant microorganisms included in the study.

✚ The polymerase chain reaction technique used for molecular confirmation of extended-spectrum beta-lactamase resistance genes in four out of ten *Escherichia coli* strains generated bands of approximately 858 bp TEM and 1016 bp SHV.

✚ The results of this study demonstrated that the PCR method, targeting the TEM and SHV genes, proved to be simple, fast, safe and easily reproducible, highlighting at the same time the specificity of these genes and the possibility of their use to confirm the phenomenon of antibiotic resistance.

✚ These results confirm the hypothesis that the health of humans, domestic and wild animals, and ecosystems are interconnected, reinforcing the importance of the One Health approach for better monitoring and control of real threats to public health.

✚ The identification of *Escherichia coli* resistance genes to the antimicrobials used in human medicine, in wild game, opens further opportunities for monitoring other genes, in a much larger herd.

✚ Among the evaluated hematological parameters, the number of leukocytes, along with the number of lymphocytes and monocytes, from the three categories of animals (deer, fawn, calf), showed significant differences between wild and domestic ruminants.

✚ Among the non-specific humoral factors, lysozyme and properdin registered differences, sometimes significant, between male and female fallow deer, the values being higher in females for both investigated parameters.

✚ Compared to wild ruminants, in calves, serum lysozyme and properdin recorded much lower values, even three, four times, in all animals studied.

✚ Based on the results obtained, following laboratory determinations, we can state that in wild ruminants, compared to domestic ones, the level of non-specific humoral immune parameters reaches much higher values, which ensures an extremely effective non-specific immunity in case of contamination with microorganisms with which come in contact

The original elements of the thesis emerge from the fact that this is the first larger research on the bacterial flora and the level of the main non-specific immune effectors in fallow deer from the hunting grounds in southwest Romania. The presence of some potentially pathogenic species for humans, isolated for the first time in fallow deer in our country, is also mentioned.

Another important and original aspect of the thesis is the study of the phenomenon of antibiotic resistance in strains isolated from fallow deer, both by classical methods and by modern methods, including molecular biology.

Last but not least, we mention the studies on the level and evolution of the main non-specific immune effectors (humoral and cellular) with a determining role in maintaining the general immunostasis of these wild ruminants.