



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 01017

(22) Data de depozit: 16/12/2016

(41) Data publicării cererii:  
28/07/2017 BOPI nr. 7/2017

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE  
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN  
CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR  
NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• SOCIETATEA NAȚIONALĂ INSTITUTUL  
PASTEUR S.A., CALEA GIULEȘTI NR. 333,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• STAȚIUNEA DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
CREȘTEREA BOVINELOR TÂRGU  
MUREȘ, STR. MARIAFFI LAJOS NR. 9,  
SÂNGEORGIU DE MUREȘ, MS, RO;  
• OPREA AVI-COM S.R.L.,  
STR. DEALUL VIILOR NR. 5, CRĂIEȘTI,  
MS, RO

(72) Inventatori:  
• GYORKE ADRIANA, CALEA TURZII NR.  
162-168A, BL. C3, SC. 1, AP. 129,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• POP LOREDANA MARIA,  
ALEEA VIDRARU NR. 13-15, AP. 120,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• MILITARU DUMITRU, STR. MIHAI BRAVU  
NR.90-96, BL.D17, SC.B, AP.71, SECT.2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• LOBONȚIU IUSTINA,  
STR. MARRIAFFI LAJOS NR. 23,  
SÂNGEORGIU DE MUREȘ, MS, RO;  
• DRĂGAN LIVIU, BD. PANDURILOR NR. 62  
AP. 11, TÂRGU MUREȘ, MS, RO;  
• POP IOAN AUREL, ALEEA CARPAȚI,  
BL. 9, AP. 6, TÂRGU MUREȘ, MS, RO;

• OPREA OVIDIU, BD. 1848 NR. 59, AP. 18,  
TÂRGU MUREȘ, MS, RO;  
• PAȘTIU ANAMARIA IOANA,  
STR. FLORILOR NR. 192B, BL.B, AP. 24,  
SAT FLOREȘTI, COMUNA FLOREȘTI, CJ,  
RO;  
• STIRBU-TEOFĂNESCU  
BEATRICE-MARIA, STR. PROGRESULUI  
NR.20, BL. P52, SC. A, AP. 6, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• POPA ANA VIRGILIA,  
ALEEA VALEA SALCIEI NR. 2, BL. M8,  
SC. B, AP. 89, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• MIRCEAN MIRCEA,  
STR. GRIGORE ALEXANDRESCU NR. 34,  
AP. 17, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• ȘTEFĂNUȚ LAURA CRISTINA,  
STR. DONATH, BL. XV, AP. 41,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• FRISS ZSUZSA, ALEEA CARPAȚI BL. 37,  
SC. B, AP. 27, TÂRGU MUREȘ, MS, RO;  
• TĂBĂRAN FLAVIU,  
COMUNA VOIEVODENI NR. 28,  
TÂRGU MUREȘ, MS, RO; OROIAN IOAN,  
STR. MĂRĂȚI BL. 33, AP. 15,  
TÂRGU MUREȘ, MS, RO;  
• KALMAR ZSUZSA, STR. G. COȘBUC  
NR. 580, UNIREA, AB, RO;  
• PINTEA ADELA, CALEA FLOREȘTI  
NR. 77, AP. 17, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• MIRCEAN VIORICA,  
STR. GRIGORE ALEXANDRESCU NR. 34,  
AP. 17, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• COZMA VASILE, STR. DECEBAL NR. 67,  
AP. 1, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) ADITIV FURAJER PE BAZĂ DE ARTEMISIA ANNUA  
VARIETATEA GERMANĂ HIBRID A3, PENTRU PROFILAXIA  
COCCIDIOZEI LA PUII DE CARNE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la utilizarea plantei *Artemisia annua* pentru prepararea unui furaj pentru profilaxia coccidiozei la puii de carne, și ca promotor natural de creștere. Utilizarea constă în aceea că se amestecă planta *Artemisia annua* varietatea germană hibrid A3 cu o concentrație de artemisinină de 0,899 g/100 g plantă uscată, ca aditiv furajer, cu furaj uzual, în cantitate de

3,5 kg/1000 kg furaj, pentru a asigura o doză de 31,5 ppm artemisinină, care, prin administrare zilnică în doză de 5...10 ppm, conduce la eficiența antieimeriană ridicată, prin scăderea scorului lezional, creșterea sporului în greutate și a ratei de conversie a furajului.

Revendicări: 5

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



63

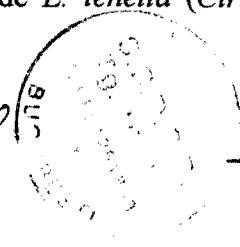
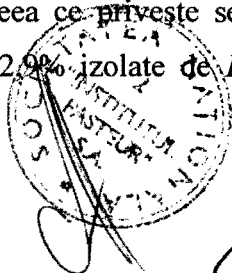
OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. a	2016 01017
Data depozit	16-12-2016

### 1. DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la utilizarea *Artemisiei annua* varietatea germană hibrid A3 ca aditiv furajer la puii broiler în scop (1) profilactic în coccidioză (coccidioză) și ca (2) promotor natural de creștere.

Eimerioza (coccidioza) este una dintre cele mai importante boli din sectorul avicol, fiind produsă de protozoare din genul *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. necatrix* și *E. brunetti*) care afectează intestinul păsărilor. La puii broiler în țara noastră au fost identificate speciile *E. acervulina* (91,3%), *E. tenella* (60,9%), *E. maxima* (21,7%) și *E. praecox* (13,0%) (Györke A, Pop L, Cozma V., 2013. *Prevalence and distribution of Eimeria species in broiler chicken farms of different capacities. Parasite. 20:50. doi: 10.1051/parasite/2013052*).

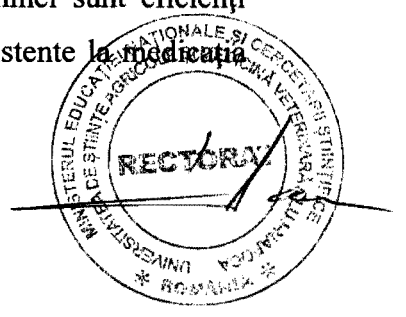
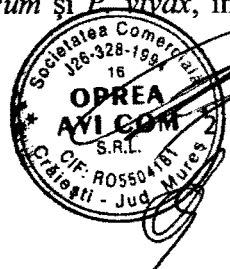
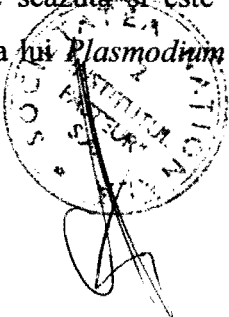
Profilaxia specifică a eimeriozei la puii broiler în sistemul intensiv de creștere (producție comercială) se realizează preponderent prin adăugarea în furaj a coccidiostaticelor (antibiotice ionofore și substanțe chimice de sinteză) și mai rar prin vaccinarea puilor cu vaccinuri vii. În anul 2006 la nivel European (UE-27) 86% din furajul produs pentru puii broiler conținea un coccidiostatic, iar 14% nu conținea coccidiostatic, puii fiind vaccinați (12%) sau netratați (2%) (Bruxelles, 5.5.2008 COM(2008)233 final. *Raport al Comisiei către Consiliu și către Parlamentul European privind folosirea coccidiostaticelor și a histomonostaticelor ca aditivi în hrana animalelor prezentat în temeiul articolului 11 din Regulamentul (CE) nr. 1831/2003 al Parlamentului European și al Consiliului din 22 septembrie 2003 privind aditivii din hrana animalelor. Anexa II – Producția de hrană pentru animale în UE-27 și folosirea coccidiostaticelor pe segmente, estimate pentru 2006*). Coccidiostaticile se administrează în furaj din prima zi de viață a puiului broiler și până la 3-5 zile înainte de abatorizare (durată de viață economică 35-45 zile). Acestea sunt utilizate și reglementate (Directiva 70/524/CEE din 23 noiembrie 1970 privind aditivii din hrana animalelor) în sistemul intensiv de creștere a puilor de carne din anul 1970. Utilizarea lor extensivă a dus la apariția de sușe chimiorezistente de *Eimeria* spp. care sunt responsabile de formele subclinice de coccidioză (Chapman H.D., 1997. *Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in Eimeria parasites of the fowl. Avian Pathol. 26(2): 221-244*). În România studiile de chimiorezistență au evidențiat heterogenitate în interiorul unei ferme în ceea ce privește sensibilitatea speciei *E. acervulina* la coccidiostatic, chimiorezistență la 42,9% izolate de *E. acervulina* și la 35,7% izolate de *E. tenella* (Ctr. RU/PO 188/2010).



*Studiul in vivo și in vitro a chimiorezistenței la coccidiostatice a izolatelor de Eimeria spp. din fermele de pui broileri în România și analiza lor genetică, dir. Györke A.).* Formele subclinice de coccidioză se manifestă în principal prin spor în greutate scăzut și consum ridicat de furaj. La nivel global pierderile economice cauzate de coccidioză sunt evaluate la peste 3 miliarde dolari anual (Dalloul R.A., Lillehoj H.S., 2006. *Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. Expert Rev Vaccines. 5(1):143-63*). La noi în țară, pierderile economice în anul 2010 cauzate de eimerioza subclinică au fost estimate la 3.162,4 €/hală a 18.000,0, fiind cauzate în principal de procentul ridicat de mortalitate și consum ridicat de furaj (Györke A., Kalmár Z., Pop L.M., Șuteu O.I., 2016. *The economic impact of infection with Eimeria spp. in broiler farms from Romania. R. Bras. Zootec., 45(5):273-280*).

În anul 2003 parlamentul european prin *regulamentul (CE) nr. 1831/2003 al Parlamentului European și al Consiliului din 22 septembrie 2003 privind aditivii din hrana animalelor* la articolul 11 stipulează “eliminarea progresivă a utilizării coccidiostaticelor și histomonostaticelor ca aditivi pentru hrana animalelor până la 31 decembrie 2012”, urmând ca “Comisia să prezinte Parlamentului European și Consiliului, înainte de 1 ianuarie 2008, un raport referitor la utilizarea acestor substanțe ca aditivi pentru hrana animalelor și soluțiile de înlocuire disponibile, însoțit, dacă este cazul, de propuneri legislative”. În raportul din 2008 către Consiliul și către Parlamentul european (Bruxelles, 5.5.2008 COM(2008)233 final) comisia concluzionează “La ora actuală, în avicultura modernă, este esențială folosirea coccidiostaticelor ca măsură preventivă în lupta împotriva coccidiozei.... Comisia Europeană va continua să monitorizeze apariția de noi substanțe și tehnici de prevenire a acestor boli.”

*Artemisia annua* este o plantă nativă din Asia utilizată în medicina tradițională chinezească pentru tratamentul malariei. Datorită proprietăților antimalarice, *A. annua* L. a fost subiectul unor investigații chimice detaliate făcută de oamenii de știință de pe întreg globul, cu scopul izolării metaboliților secundari majori și minori. Cea mai mare atenție a fost focalizată pe studiul sesquiterpenelor, deoarece artemisinina (sesquiterpenă lactonă), de asemenea cunoscută și ca arteannuina sau qinghaosu, a fost identificată ca fiind responsabilă pentru activitatea antimalarică a plantei *Artemisia annua* L. de către cercetătorii chinezi în 1972. Întrebuințarea majoră recomandată este pentru tratarea malariei. S-a demonstrat că terapia combinată bazată pe artemisinină (ACT) reduce rapid febra și parazitemia, are o toxicitate scăzută și este bine tolerată de organism. Compușii artemisininei sunt eficienți împotriva lui *Plasmodium falciparum* și *P. vivax*, incluzând tulpinile rezistente la medicația clasică.



61

Începând cu anul 1997 (Allen P.C., Lydon J., Danforth H.D., 1997. *Effects of components of Artemisia annua on coccidia infections in chickens. Poult Sci. 76(8):1156-63.*) au fost publicate o serie de studii experimentale privind eficacitatea antieimeriană a artemisininei sau a *A. annua*. Se crede că acționează prin inducerea stresului oxidativ (Allen P.C., Danforth H.D., Augustine P.C., 1998. *Dietary modulation of avian coccidiosis. Int J Parasitol. 28(7):1131-1140*) și afectează formarea peretelui oochistal prin inhibarea expresiei SERCA la nivelul macrogameților, ceea ce conduce la apariția de oochisturi neviabile și rată de sporulare scăzută (del Cacho E., Gallego M., Francesch M., Quílez J., Sánchez-Acedo C., 2010. *Effect of artemisinin on oocyst wall formation and sporulation during Eimeria tenella infection. Parasitol Int. 59(4):506-511*).

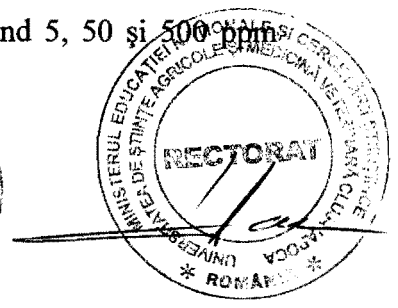
Toate studiile publicate în legătură cu utilizarea *Artemisiei annua* sau a artemisininei în coccidioză la puii broiler s-au limitat la infecții experimentale (condiții de laborator) pe un număr mic de animale și fără a evalua impactul asupra stării generale de sănătate a puilor.

Problema tehnică propusă spre rezolvare de prezenta invenție constă în utilizarea *Artemisiei annua* varietatea germană hibrid A3 ca **aditiv furajer** la puii broiler în scop (1) **profilactic în coccidioză (coccidioză)** și ca (2) **promotor natural de creștere**.

Un prim obiectiv al prezentei invenții se referă la obținerea materiei prime reprezentată de *A. annua* varietatea germană hibrid A3 și determinarea concentrației de artemisinină. Planta după cultivare și recoltare a fost uscată artificial cu aer cald la temperatura de 40-50°C, apoi tocată și cernută folosindu-se site fine, măcinată și ambalată în saci de hârtie. S-a recoltat o probă medie pentru determinarea concentrației de artemisinină prin metoda HPLC, fiind de 0,899 g/100g plantă uscată.

Un al doilea obiectiv al prezentei invenții se referă la evaluarea toxicității și reziduurilor în carcasa de pui a *A. annua* varietatea germană hibrid A3 la puii broiler. Materialul obținut prin uscare și măcinare s-a introdus în furajul combinat de pui carne în 3 doze: 55,6 g, 556,2 g și 5,56 kg/100 kg furaj, asigurând 5, 50 și 500 ppm artemisinină pentru 28 de zile.

Un al treilea obiectiv al prezentei invenții îl reprezintă identificarea dozei optime de *A. annua* varietatea germană hibrid A3 cu activitate profilactică în coccidioză la puii broiler. Au fost realizate infecții experimentale (studii la baterie și sol) cu *E. acervulina*, *E. maxima* și *E. tenella* la pui broiler la care s-a administrat furaj conținând *A. annua* varietatea germană hibrid A3 în doze de 55,6 g, 556,2 g și 5,56 kg/100 kg furaj, asigurând 5, 50 și 500 ppm artemisinină.



Al patrulea obiectiv al prezentei invenții se referă la evaluarea eficacității profilactice a *A. annua* varietatea germană hibrid A3 în coccidioză la puii broiler în condiții productive (în fermă). Pentru acest obiectiv *A. annua* varietatea germană hibrid A3 a fost introdusă în furaj în doză de 3,5 kg/tona de furaj asigurând 31,5 ppm artemisinină. Furajul a fost administrat la o hală de pui carne dintr-o fermă din prima zi de viață și până la 5 zile înainte de sacrificare.

Al cincelea obiectiv al prezentei invenții îl reprezintă evaluarea efectului *A. annua* varietatea germană hibrid A3 asupra florei intestinale la puii broiler în condiții experimentale (556,2 g/100 kg furaj asigurând 50 ppm artemisinină) și în condiții de fermă (3,5 kg/tona de furaj asigurând 31,5 ppm artemisinină).

Utilizarea *A. annua* varietatea germană hibrid A3 în profilaxia eimeriozei la puii broiler prezintă avantajul unui produs natural care nu este toxic cu efect profilactic în coccidioză la puii broiler, dar cu efecte bune și asupra sporului în greutate a puilor, acționând ca un promotor de creștere. *A. annua* varietatea germană hibrid A3 în doză de 3,5 kg/tona de furaj asigurând 31,5 ppm artemisinină este o (1) **alternativă bună la coccidiostatice în sistemul industrial clasic** de creștere a puilui de carne pentru profilaxia eimeriozei, poate fi (2) utilizată în **eimeriozele subclinice produse de sușe chimiorezistente de *Eimeria* spp.**, poate fi (3) utilizată în **sistemul ecologic de creștere a puilor de carne** pentru profilaxia eimeriozei și poate fi (4) folosită ca **promotor de creștere**.

Descrierea pe scurt a etapelor de identificare a calității profilactice în coccidioză la puilul de carne și a calității de promotor de creștere este redată în tabelul 1.

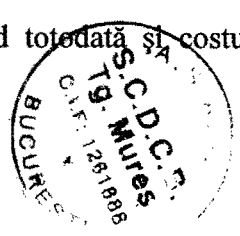
*Etapele tehnologice de obținere a efectului profilactic în coccidioză și de promotor de creștere la puilul de carne*

Tabelul 1

Etapa	Denumirea etapei
Etapa I	Cultivarea, recoltarea, uscarea și măcinarea plantei
Etapa II	Testarea toxicității plantei și a reziduurilor la puilul de carne
Etapa III	Testarea dozei optime profilactice în coccidioză prin infecții experimentale
Etapa IV	Testarea eficacității profilactice în coccidioză a plantei în condiții industriale
Etapa V	Testarea efectului plantei asupra florei intestinale la pui în condiții experimentale și industriale

**Exemplul 1**

Pentru semănat recomandăm folosirea unui substrat de pământ de turbă din comerț, sterilizat cu un pH între 5 și 6,5, amestecul cu pământ permițând apariția unor bacterii ce îngreunează obținerea unui răsad de calitate crescând totodată și costurile de obținere a



răsadului. Acoperirea tăvilor cu folie de seră după semănat asigură o densitate, uniformitate și vigoare superioară;

Repicarea în stadiul de 2-4 frunze și trecerea pe substrat hidroponic reduce cheltuielile de întreținere, favorizând obținerea unui sistem radicular viguros.

Combaterea chimică a buruienilor cu erbicide cu aplicare la sol produce fitotoxicitate culturii. Pentru o combatere bună a buruienilor recomandăm ca înainte de înființarea culturii în câmp să se execute o erbicidare totală cu erbicid pe bază de glifosat (360g/l cu o soluție în concentrație 2%). Pe vegetație combaterea buruienilor se va face prin prașile.

Lucrările de plantare, întreținerea culturii și recoltarea pot fi mecanizate în situația cultivării pe suprafețe mai mari.

Recoltarea culturilor se poate face prin tăierea acestora și imediata transportare în vederea uscării la umbră (în pătuli) sau uscare artificială cu aer cald (temperatura 40-50 °C).

După uscare, mărunțire, cernere, plantele sunt măcinate obținându-se o pulbere fină. Greutatea medie a unei plante a fost de 1.08 kg, aceasta având 0.510 kg substanță uscată (47.2%), greutatea medie a frunzelor uscate fiind de 0.142 kg (27,9% din substanța uscată);

Producția: 10,08 t/ha plante verzi; 2,00 t/ha frunze uscate.

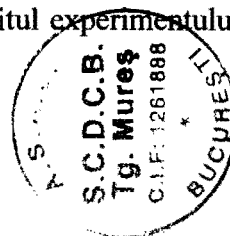
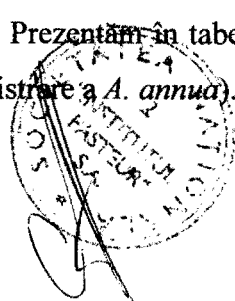
Costuri: 25.552,20 lei total /ha; **12,86 lei cost/kg frunze uscate.**

Concentrația de artemisinină prin metoda HPLC este de 0,899 g/100g plantă uscată.

## Exemplul 2

Testarea toxicității plantei și a reziduurilor la puil de carne s-au realizat prin administrarea *Artemisiei annua* varietatea germană hibrid A3 în furaj timp de 28 de zile de la vârsta de 18 zile. Cantitatea de *A. annua* introdusă în furaj a fost de 55,6 g (Lot I), 556,2 g (Lot II) și 5,56 kg/100 kg furaj (Lot III), asigurând 5, 50 și 500 ppm artemisinină. Studiul a fost realizat la 4 loturi experimentale a câte 30 pui/lot, un lot martor (LM) și 3 loturi experimentale corespunzătoare celor 3 doze diferite de *A. annua*. Evaluarea s-a efectuat în ziua 0, înainte de introducerea *A. annua* în dietă, la 14 și 28 de zile după introducerea în furaj a *A. annua*. S-a avut în vedere efectul asupra parametrilor hematologici (indicatori ai stării de sănătate), constante biochimice (teste funcționale hepatice, indicatori leziuni la nivel hepatocelular și hepatobiliar), structură organe (examen histopatologic) sistemului imun și asupra performanțelor zootehnice. De asemenea s-au evaluat reziduurile de artemisinină și dihidroartemisinină prin metoda HPLC la nivel muscular (pulpă) și ficat după 28 de zile de administrare și la 5 zile după ultima administrare.

Prezentăm în tabelul 2 datele obținute la sfârșitul experimentului (după 28 de zile de administrare a *A. annua*).



### ***Parametrii eritrocitari și leucocitari***

Nu au fost observate modificări severe ale parametrilor eritrocitari și leucocitari indicatori ai stării de sănătate. Fluctuațiile constatate în sens de scădere, au fost în funcție de doză, fiind mai mare la lotul experimental III (5,56 kg *A. annua*/100 kg furaj; 500 ppm artemisinină), dar fără semnificație statistică. Acești indicatori la lotul II în cele mai multe situații au fost similari lotului martor.

### ***Parametrii biochimici***

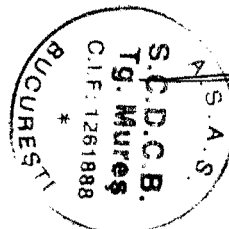
Efectele hepatotoxice ale *Artemisiei annua* au fost minime la lotul experimental II, moderate în cazul lotului experimental I și maxime la lotul experimental III. Sinteza proteică a fost influențată negativ prin scăderea proteinelor totale la lotul experimental III și a gamaglobulinelor la loturile experimentale I și III, dar la lotul II a fost influențată pozitiv în sens de creștere semnificativ din punct de vedere statistic (proteine totale și albumine). Enzimele cu specificitate pentru leziune hepatocelulară (ALAT, ASAT, GLDH) au înregistrat creșteri semnificative statistic la loturile experimentale mai mari la lotul III, iar enzima cu specificitate pentru leziune hepatobiliară (GGT) suferă creștere asigurată statistic doar la lotul III. Valorile CK sugerează că la lotul III *A. annua* a avut un efect inhibitor, fapt ce la nivelul țesutului muscular scheletic influențează negativ biodisponibilitatea creatinfosfatului ceea ce conduce la creșterea susceptibilității musculaturii striate (inclusiv miocardice) la leziuni ca efect al deficitului local de ATP. Lotul II conform valorilor CK obținute nu este susceptibil pentru dezvoltarea de leziuni la nivelul musculaturii striate.

Concluzionând asupra rezultatelor obținute în ceea ce privește toxicitatea la nivel hepatic și muscular la puii broiler, afirmăm faptul că *Artemisiei annua* varietatea germană hibrid A3 în doză de 556,2 g *A. annua*/100 kg furaj (50 ppm artemisinină) are impact toxic minim spre absent.

### ***Examen histopatologic organe***

Modificările structurale la nivelul organelor la puii broiler identificate prin examen histopatologic sunt prezentate în tabelul 2. Modificări structurale mai importante au fost identificate la puii tratați cu 5,56 kg *A. annua*/100 kg furaj. Acestea au fost identificate în toate organele.

Concluzionând *A. annua* varietatea germană hibrid A3 la doze de până la 556,2 g/100 kg furaj (50 ppm artemisinină) nu afectează organele interne la nivel structural, doar la doze mai mari. Cele mai sensibile organe la doze mari de *A. annua* sunt rinichii, encefalul, cerebelul și miocardul.



*A*

*Aspecte histopatologice observate în diverse organe la puii tratați cu A. annua  
varietatea germană hibrid A3 în diverse doze*

Tabelul 2

Organe	Lot I	Lot II	Lot III
<b>Ficat</b>	Hematopoeiza extramedulara multifocala (minimal)	Vacuolizare citoplasmică (steatoză hepatică, difuză, moderată) Hematopoeiza extramedulara multifocala (minimal)	Hematopoeiza extramedulara multifocala (minimal) Fibroza multifocal-extinsa (spatiile perivasculare) (minimal) Necroză (focală, discretă) de epiteliu biliar
<b>Rinichi</b>	FM	Necroză tubulară segmentală Regenerare epitelială (posibil post-necrotic)	<b>Nefrita interstițială</b> (cu heterofile și mononucleare) focala ( <b>moderată</b> ) <b>Necroză tubulară segmentală</b>
<b>Splină</b>	Hematopoeiză extramedulară	Hematopoeiză extramedulară	Depleție limfocitară difuză (minimal) Hematopoeiză extramedulară
<b>Măduvă osoasă</b>	FM	FM	Depleție limfoidă (prezența preponderentă a precursorilor mieloizi)
<b>Timus</b>	FM	Focare de mineralizare la nivelul medulei, în apropierea corpusculilor Hassal	Lipomatoză (focală, discretă) Infiltrat discret cu heterofile la nivelul medulei (difuz) Proliferare (difuză) de celule mioide
<b>Bursă</b>	FM	FM	Edem intercelular moderat, cortico-medular Epiteliu de suprafață fără modificări Chist epitelial Vacuolizări în medulară (un singur folicul) Rare heterofile (1-2 /câmp microscopic x40);
<b>Encefal</b>	FM	FM	Cromatoliză centro-neuronală, focală, <b>severă</b>
<b>Cerebel</b>	FM	Cromatoliză centrală de celule Purkinje	Cromatoliză centro-neuronală, difuză, <b>severă</b>
<b>Miocard</b>	FM	FM	Infiltrat interstițial cu heterofile și mononucleare ( <b>miocardită multifocală</b> ) ( <b>moderat</b> )

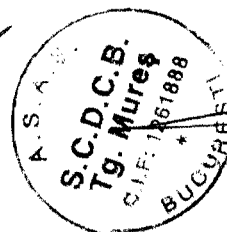
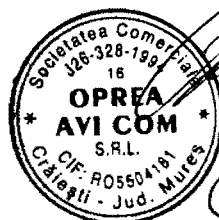
Legendă: FM – fără modificări

**Sistemul imun**

In general, la puii din loturile experimentale, organele limfoide au fost mai dezvoltate decât la cei din lotul martor. *Artemisia annua* a avut un efect imunotolerant asupra microfagelor și limfocitelor T, și efect imunostimulator asupra limfocitelor B *in vitro*.

**Performanțe zootehnice**

Sporul în greutate și rata de conversie a hranei sunt mai mari la puii din lotul I (spor mai mare cu 1,3 g/zi) și similare la cei din lotul II comparativ cu lotul martor. Performanțele zootehnice scad semnificativ statistic la lotul experimental III. (6,8 g/zi mai puțin comparativ cu martorul).





**Reziduuri în carne și organe**

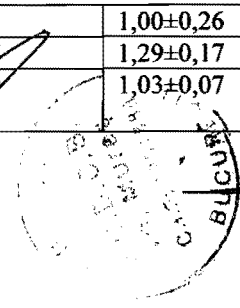
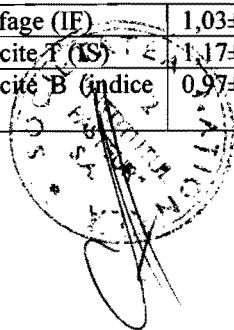
În probele din pulpă și din ficat provenite de la puii din loturile I și II tratați timp de 28 de zile cu *Artemisia annua* varietatea germană hibrid A3 în dozele specificate nu s-a evidențiat prezența artemisininei sau a dihidroartemisininei. La lotul III în probele de pulpă nu a fost identificată artemisinina sau dihidroartemisinina, dar pentru ficat s-a obținut posibili metaboliți (deoxidihidroartemisinina, 9,10-dihidrodeoxiartemisinina, deoxiartemisinina) care sunt lipsiți de activitate biologică datorită pierderii legăturii endoperoxidice (Woodrow C.J., Haynes R.K., Krishna S., 2005. Artemisinins. Postgrad. Med. J. 81: 71-78.).

**Conform rezultatelor obținute *A. annua* varietatea germană hibrid A3 poate fi administrată în furaj puiilor de carne până la doze de 50 ppm artemisinină fără a afecta starea clinică a acestora și fără risc pentru consumator referitor la reziduuri. În scop de promotor de creștere se administrează în furaj la doze care să asigure 5 ppm artemisinină fără a depăși doza de 10 ppm artemisinină.**

*Valori ale constantelor hematologice, parametrilor biochimici, sistemului imun și performanțelor zootehnice la puii broiler după 28 de zile de administrare zilnică în furaj a *A. annua* varietatea germană hibrid A3 în doză de 5, 50 și 500 ppm artemisinină*

Tabelul 3

Constantă evaluată	Lot M	Lot I	Lot II	Lot III	Valori de referință
<b>Constante hematologice</b>					
Eritrocite (T/L)	3,039±2,565	2,288±0,427	2,238±0,605	2,495±0,498	2,500 - 3,500
Hemoglobină (g/dl)	8,0±1,4	9,8±2,0*	8,5±1,5	7,5±1,6	7 - 13
Hematocrit (%)	25,9±7,0	26,0±5,3	26,2±6,4	27,5±8,4	25 - 35
VEM (fl)	111,8±42,4	115,9±24,6	118,6±13,8	109,2±21,6	90 - 140
HEM (pg)	34,9±13,9	43,8±9,2	40,4±10,7	31,0±10,3	33 - 47
CHEM (g/L)	32,4±8,7	38,5±7,3	34,1±8,4	29,6±12,5	26 - 35
Leucocite (G/L)	6,750±1,318	8,600±2,846	6,050±0,762	5,700±1,206	12,00 - 30,00
<b>Parametrii biochimici</b>					
Proteine totale (g/dl)	3,3±0,3	3,3±0,2	4,1±0,1**	3,0±0,1*	3.23±0.23
Albumine (g/dl)	1,4±0,03	1,5±0,1	1,8±0,1***	1,7±0,02***	1.72±0.2
Gamaglobuline (g/dl)	0,8±0,05	0,7±0,01	0,7±0,04**	0,7±0,02**	,416±0.072
ALAT (U/l)	28,8±4,7	20,5±3,0**	36,9±2,5*	37,5±2,6**	23,5
ASAT (U/l)	190,6±10,6	229,5±13,1**	220,9±9,3**	279,0±14,0***	174,8
GGT (U/l)	23,8±3,1	27,0±1,5	21,7±3,4	34,0±2,4***	21.28±9.5
PAL (U/l)	13,3±2,8	5431,8±4968,7	9089,4±557,8***	6019,8±933,5***	5.103±2838
GLDH (U/l)	73,3±3,1	74,4±5,0	83,5±8,8	111,5±9,1***	-
CK (U/l)	357,6±52,0	504,8±16,3**	286,7±11,0*	300,8±10,3	1014.50±71.27
<b>Sistemul imun</b>					
Microfage (IF)	1,03±0,09	0,99±0,16	0,82±0,33	1,00±0,26	-
Limfocite T (IS)	1,17±0,16	1,27±0,17	1,20±0,17	1,29±0,17	-
Limfocite B (indice IS)	0,97±0,14	1,05±0,13	1,07±0,19	1,03±0,07	-



Splină (IG)	0,17±0,05	0,21±0,11	0,20±0,05	0,20±0,05*	-
Timus (IG)	0,43±0,09	0,39±0,15	0,40±0,08	0,46±0,13	-
Bursa lui Fabricius (IG)	0,18±0,08	0,16±0,05	0,18±0,05	0,19±0,07	-
<b>Performanțe zootehnice</b>					
Spor în greutate (g/zi)	39,2±6,8	40,5±8,7	37,0±6,2 g/zi	32,4±6,8***	-
RC a furajului (kg furaj/kg spor)	2,5±0,2	2,5±0,3	2,6±0,1	2,9±0,3**	-

**Legendă:**

Lot M – lot martor; Lot I - lot experimental 55,6 g *A. annua*/100 kg furaj (5 ppm artemisinină); Lot II - lot experimental 556,2 g *A. annua*/100 kg furaj (50 ppm artemisinină); Lot III - lot experimental 5,56 kg *A. annua*/100 kg furaj (500 ppm artemisinină).

IF – indice de fagocitoză; IS – indice de stimulare; IG – indice de greutate; RC – rată de conversie.

Testul t-student: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

**Exemplul 3**

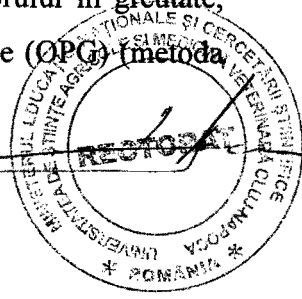
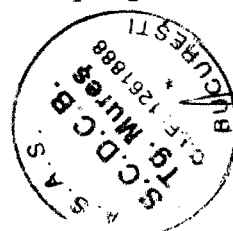
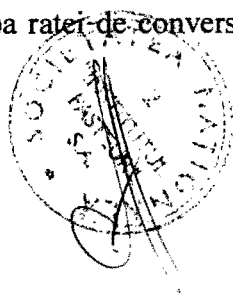
Testarea dozei optime profilactice a *A. annua* varietatea germană hibrid A3 în coccidioză prin **infecții experimentale** pe pui broiler hibrid ROSS 308 întreținuți la baterie.

Au fost realizate **4 serii de experimente la baterie** prin infecții experimentale la pui de carne cu *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* și infecție polispecifică cu cele 3 specii. Puii broiler au fost achiziționați la vârsta de o zi, iar lotizarea s-a efectuat la vârsta de 12 zile. Până la lotizare puii au fost furajați cu un furaj standard (furaj starter) fără coccidiostatic, iar în ziua lotizării a fost introdus în dietă furajul combinat creștere cu *A. annua*, monensin și fără coccidiostatic, corespunzător fiecărui lot.

Loturile au fost formate din câte 21 pui, fiecare lot fiind subdivizat în 3 grupuri a 7 pui, după cum urmează: **Lot MN** - lot martor negativ (neinfectat, netratat); **Lot MP** - lot martor pozitiv (infectat, netratat); **Lot MC** - lot martor coccidiostatic (infectat, tratat cu monensin 125 ppm); **Lot I** - lot experimental 55,6 g *A. annua*/100 kg furaj (5 ppm artemisinină) (infectat, tratat cu *A. annua*); **Lot II** - lot experimental 556,2 g *A. annua*/100 kg furaj (50 ppm artemisinină) (infectat, tratat cu *A. annua*).

Infecția experimentală a fost realizată 2 zile mai târziu față de momentul lotizării (vârsta 14 zile), prin administrarea de oochisturi sporulate de *Eimeria* spp., cu sonda esofagoingluvială, după cum urmează: **experiment 1** =  $1 \times 10^4$  oochisturi de *E. tenella* (*E.t.*)/pui; **experiment 2** =  $1 \times 10^5$  oochisturi de *E. acervulina* (*E.a.*)/pui; **experiment 3** =  $5 \times 10^4$  oochisturi de *E. maxima* (*E.m.*)/pui; **experiment 4** =  $2 \times 10^3$  oochisturi de *E. tenella* +  $2 \times 10^4$  oochisturi de *E. acervulina* +  $1 \times 10^4$  oochisturi de *E. maxima*/pui.

Eficacitatea antieimeriană a fost evaluată prin: (1) înregistrarea sporului în greutate, (2) a ratei de conversie a hranei, (3) numărului de oochisturi per gram fecale (OPG) și metoda



McMaster), (4) a scorului lezional (SL) (10 pui/lot) (Johson and Reid, 1976) la 7 zile postinfecțant și (5) procentului de sporulare a oocisturilor (% Sp).

În tabelul 3 sunt sintetizate datele privind eficacitatea *A. annua* varietatea germană hibrid A3 în coccidioză la puii broiler hibrid ROSS 308 prin infecții experimentale la baterie.

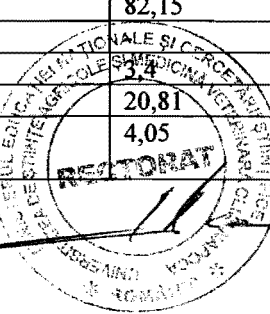
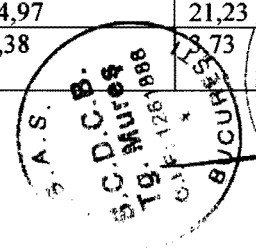
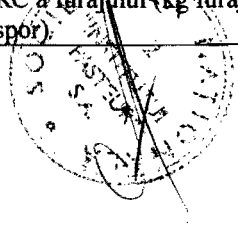
Capacitatea de multiplicare (% reducere OPG față de martorul pozitiv) a parazitului nu este semnificativ afectată atunci când dozele utilizate pentru infecția experimentală cu o singură specie sunt mari. La doze mici de infecție (reproducere situație industrială) polispecifică cu toate cele 3 specii de *Eimeria* % de reducere a OPG este semnificativ 82,15%. În ceea ce privește patogenitatea parazitului, evaluată prin scorul lezional (SL) s-a observat o scădere la doza de 55,6 g *A. annua*/100 kg furaj. Sporul în greutate și rata de conversie a hranei sunt comparabile cu cele obținute la puii tratați cu coccidiostatic.

Concluzionând, *A. annua* varietatea germană hibrid A3 în doză de până la 556,2 g/100 kg furaj poate fi utilizată în profilaxia coccidiozei la puii broiler.

*Rezultatele obținute la puii broiler (întreținuți în baterii) în infecții experimentale cu Eimeria spp. și tratament profilactic în furaj cu A. annua varietatea germană hibrid A3*

Tabelul 3

Factor analizat	MN	MP	MC	Lot I	Lot II
<i>E. acervulina</i>					
OPG (% reducere)	-	0,0	87,6	0,25	-24,01
% Sp		80,25±3,84	80,17±6,09	79,58±3,90	85,92±4,58
SL	0	3,7	1,6	3,7	3,4
Spor în greutate (g/zi)	21,93	24,3	27,43	21,46	25,24
RC a furajului (kg furaj/kg spor)	2,21	2,78	2,26	2,86	3,03
<i>E. maxima</i>					
OPG (% reducere)	-	0,0	67,97	3,04	20,31
% Sp	-	89,17±3,01	80,67±3,14***	83,42±3,06**	87,50±4,5
SL	0	1,1	0,6	1,2	1,5
Spor în greutate (g/zi)	22,59±7,59	19,07±4,04	18,48±4,55	20,06±4,18	19,47±2,69
RC a furajului (kg furaj/kg spor)	2,9	4,7	3,9	3,7	4,7
<i>E. tenella</i>					
OPG (% reducere)	-	0,0	63,10	-213,1	-40,4
% Sp	-	90,67	90,13	89,50	88,50
SL	0	0,95	0,95	1,8	1,05
Spor în greutate (g/zi)	23,29	26,79	26,95	19,52	29,34
RC a furajului (kg furaj/kg spor)	2,65	2,72	2,86	3,62	2,71
<i>E. acervulina+E. maxima+E. tenella</i>					
OPG (% reducere)	-	0,0	14,71	-24,11	82,15
% Sp	-	-	-	-	-
SL	0,0	3,3	1,8	2,9	3,4
Spor în greutate (g/zi)	23,29	24,45	24,97	21,23	20,81
RC a furajului (kg furaj/kg spor)	2,65	3,42	3,38	3,73	4,05



**Legendă:** OPG – număr oochisturi/g fecale; Sp – sporulare; SL – scor lezional; RC – rata de conversie a furajului

#### Exemplul 4

Testarea dozei optime profilactice a *A. annua* varietatea germană hibrid A3 în coccidioză prin **infecții experimentale** pe pui broiler hibrid ROSS 308 întreținuți la sol.

Au fost realizate **5 serii de experimente la sol** prin infecții experimentale la pui de carne cu *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* (2x) și infecție polispecifică cu cele 3 specii. Puii broiler au fost achiziționați la vârsta de o zi când au fost lotizați în câte 2 loturi până la vârsta de 14 zile: lot martor (furaj standard starter fără *A. annua*) și lot experimental (furaj standard starter cu *A. annua*). La vârsta de 14 zile cele 2 loturi au fost împărțite în alte 2 loturi rezultând 4 loturi experimentale. Acestea au fost formate din câte 60 pui/lot, fiecare lot fiind subdivizat în 2 grupuri a 30 pui, după cum urmează: **Lot MN** - lot martor negativ (neinfectat, netratat); **Lot MP** - lot martor pozitiv (infectat, netratat); **Lot ExpN** - lot experimental negativ (neinfectat, tratat cu *A. annua*); **Lot ExpP** - lot experimental pozitiv (infectat, tratat cu *A. annua*).

Dozele de *A. annua* varietate germană hibrid A3 au fost următoarele: (1) 222,47 g *A. annua*/100 kg furaj pentru a asigura 20 ppm artemisinină pentru infecția cu *E. tenella* exp 1 și *E. maxima*, și 1,11 kg *A. annua*/100 kg furaj pentru a asigura 100 ppm artemisinină pentru infecția cu *E. tenella* exp 2, *E. acervulina* și infecție polispecifică.

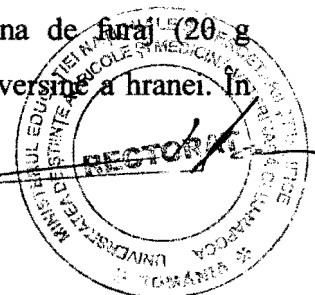
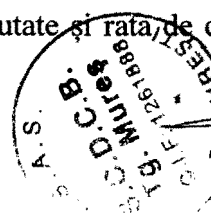
Infecția experimentală a fost realizată când puii au avut vârsta de 14 zile prin introducerea a câte 2 pui infectați la 30 pui neinfecțați. La experimentul *E. tenella* exp 2 pentru infecția experimentală s-au folosit fecale de la puii din experimentul *E. tenella* exp 1.

Eficacitatea antieimeriană a fost evaluată prin: (1) înregistrarea sporului în greutate, (2) a ratei de conversie a hranei, (3) numărului de oochisturi per gram fecale (OPG) (metoda McMaster), (4) a scorului lezional (SL) (10 pui/lot) (Johnson and Reid, 1976) la 7 zile postinfecțant.

În tabelul 4 sunt sintetizate datele privind eficacitatea *A. annua* varietatea germană hibrid A3 în coccidioză la puii broiler hibrid ROSS 308 prin infecții experimentale la sol.

*Artemisia annua*, var. germană nu a avut un efect antieimerian relevant la doză de 11,1 kg/tona de furaj (spor în greutate, rată de conversie) în infecția cu *E. acervulina* și *E. maxima*, chiar dacă valoare OPG a fost semnificativ statistic mai mică în ziua lotul experimental față de lotul martor.

*Artemisia annua*, var. germană, administrată în furaj, 2 kg/tona de furaj (20 g artemisinină/tona de furaj), îmbunătățește sporul în greutate și rata de conversie a hranei. În



condiții de microclimat corespunzător, în aceeași doză, poate avea efect antieimerian satisfăcător în infecția cu *E. tenella*, aspect relevat la 10 zile p.i., prin reducerea cu 69,5% a OPG-ului. De asemenea s-a observat că tratamentele successive cu *A. annua* crește eficacitatea antieimeriană a acestuia în infecția cu *E. tenella* aspect relevant în principal prin reducerea scorului lezional semnificativ față de lotul martor.

Rezultatele obținute la puii broiler (întreținuți la sol) în infecții experimentale cu *Eimeria* spp. și tratament profilactic în furaj cu *A. annua* varietatea germană hibrid A3

Tabelul 4

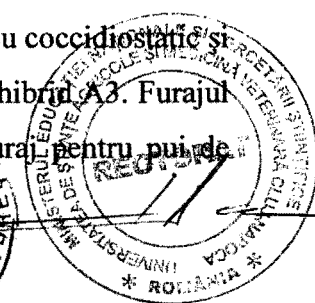
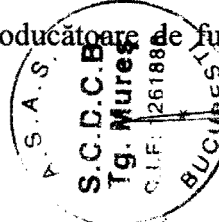
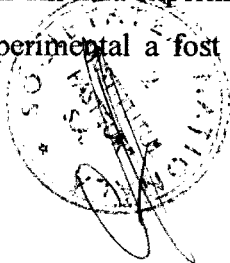
Factor analizat	MN	MP	MExpN	LExpP
<i>E. acervulina</i>				
OPG (% reducere)	-	0	-	-22,95
SL	0	0	0	0
Spor în greutate (g/zi)	32,40	31,08	27,69	33,07
RC a furajului (kg furaj/kg spor)	2,26	2,89	2,72	2,69
<i>E. maxima</i>				
OPG (% reducere)	-	0	-	51,9
SL	0	1,2	0	1
Spor în greutate (g/zi)	29,03	25,62	31,7481	23,71
RC a furajului (kg furaj/kg spor)	3,0	3,18	2,94	3,11
<i>E. tenella</i> exp 1				
OPG (% reducere)	-	0	-	-13,61
SL	0	1,5	0	1,7
Spor în greutate (g/zi)				
RC a furajului (kg furaj/kg spor)	3,0	3,18	2,94	3,11
<i>E. tenella</i> exp 2				
OPG (% reducere)	-	0	-	-119,71
SL	0	1,0	0	0,5
Spor în greutate (g/zi)	32,40	29,02	27,69	29,86
RC a furajului (kg furaj/kg spor)	2,26	1,94	2,72	2,18
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. tenella</i>				
OPG (% reducere)	-	0	-	-40,79
SL	0	0,8	0	0,7
Spor în greutate (g/zi)	32,40	32,49	27,69	32,20
RC a furajului (kg furaj/kg spor)	2,26	2,28	2,72	2,57

Legendă: OPG – număr oochisturi/g fecale; Sp – sporulare; SL – scor lezional; RC – rata de conversie a furajului

### Exemplul 5

Testarea eficacității profilactice în coccidioză a *A. annua* varietatea germă hibrid A3 în condiții industriale.

Într-o fermă de pui broiler au fost luate în studiu 3 hale de pui: hala 2 și 4 au fost considerate martor, iar hala 1 lotul experimental. Puii din hala 1 și 4 au provenit din aceeași părinți. Pe toată perioada de creștere, puii din halele martor au primit furaj cu coccidiostatic și puii din hala experimentală au primit furaj cu *A. annua* varietatea germană hibrid A3. Furajul experimental a fost preparat la societatea comercială producătoare de furaj pentru pui de



carne, care a introdus *A. annua* în furaj la doza recomandată de noi: 3,5 kg *A. annua*/tona de furaj.

Pe perioada de creștere până la sacrificare s-au evaluat următorii indicatori: identificarea coccidiilor prin examene coproparazitologice și qPCR, scorul lezional, procent de mortalitate, spor în greutate și rata de conversie a hranei conform tabelului 5 și figurilor 1, 2 și 3.

Datele obținute privind eficacitatea profilactică a *A. annua* în coccidioză la puii broiler, realizat la nivel industrial (în fermă), recomandă utilizarea *A. annua* ca alternativă la coccidiostaticele clasice.

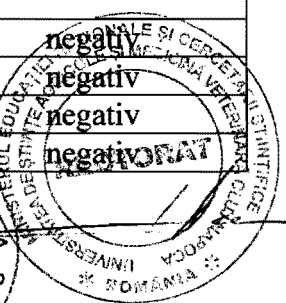
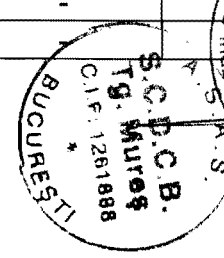
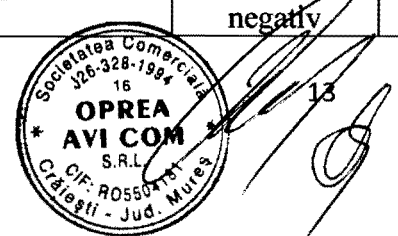
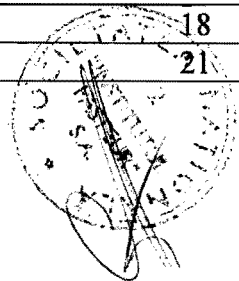
Parametrii productivi și medicali urmăriți au fost comparabili cu cei înregistrați la puii tratați cu coccidiostatic (Tabelul 5, Fig. 1-3.). Se impune precauție vis-a-vis de scorul lezional, care la 28 de zile (4 săptămâni) a avut valori peste 1 și care cel mai probabil, ulterior a influențat greutatea finală la abatorizare. Cu toate acestea, la vârsta de 35 de zile scorul lezional a avut valori inferioare lotului martor.

Artemisinina, spre deosebire de coccidiostatice care acționează asupra formele schizogonice sau gametogonice ale parazitului, s-a observat că la *E. tenella* afectează formarea peretelui oochistal și indirect, afectează procesul de sporulare și în consecință scade virulența parazitului (del Cacho și col., 2010). Studiile privind % de sporulare a oochisturilor de *E. acervulina*, *E. maxima* și *E. tenella* realizate în cadrul acestui proiect în anii anteriori au evidențiat valori semnificativ statistic mai mici pentru oochisturile obținute de la pui tratați cu artemisinină comparativ cu cei obținuți de la pui netratați.

*Rezultatele obținute la puii broiler tratați profilactic în furaj cu A. annua varietatea germană hibrid A3 în condiții industriale (în fermă) comparativ cu puii tratați profilactic cu coccidiostatic*

Tabelul 5

Vârstă pui (zile)/Indicator	Martor H 2	Martor H 4	Artemisia H 1
Părinți	La sf. ciclului de producție	La începutul ciclului de producție	
Nr pui populare	17250	18900	19090
Greutate la vârsta de 1 zi (g)	45,7	40,15	39,9
Examen coproparazitologic (OPG) și specii de <i>Eimeria</i> identificate (qPCR)			
7	negativ	-	negativ
14	negativ	-	negativ
18	negativ	-	negativ
21	negativ	-	negativ



25	pozitiv () <i>E. acervulina</i>	-	pozitiv () <i>E. acervulina</i>
28	pozitiv () <i>E. acervulina</i>	-	pozitiv () <i>E. acervulina</i>
35	pozitiv () <i>E. acervulina</i>	-	pozitiv () <i>E. acervulina</i> <i>E. tenella</i>
Scor lezional la vârsta de 28 zile	1	-	1,6
Scor lezional la vârsta de 35 zile	1	-	0,2
Procent de mortalitate la abatorizare	2,18	2,84	2,51
Spor mediu în greutate (g/zi)	62,82	62,18	57,31
Rata de conversie a hranei (kg furaj/kg spor)	1,65	1,639	1,603

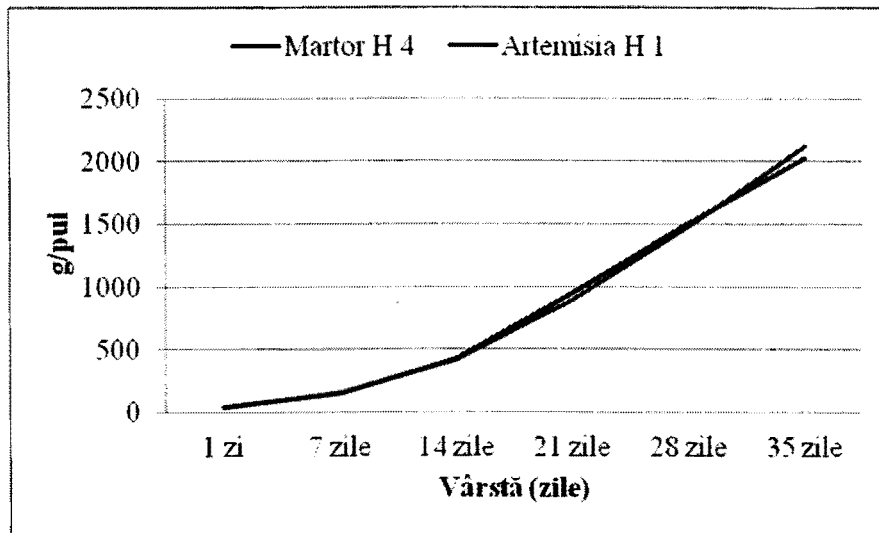


Fig. 1. Evoluția masei corporale la puii din loturile experimentale pe perioada de creștere până la abatorizare

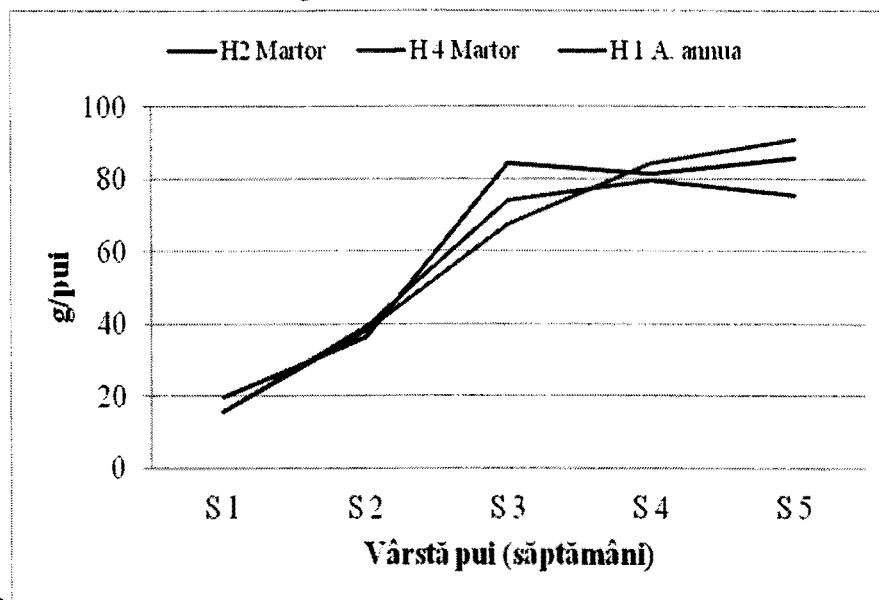
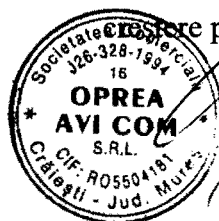
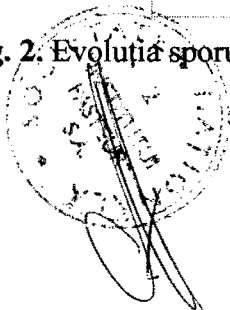
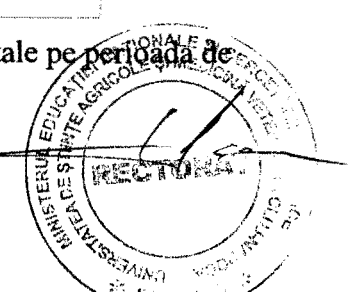
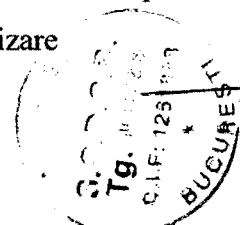


Fig. 2. Evoluția sporului în greutate (g/zi/pui) la puii din loturile experimentale pe perioada de creștere până la abatorizare



14



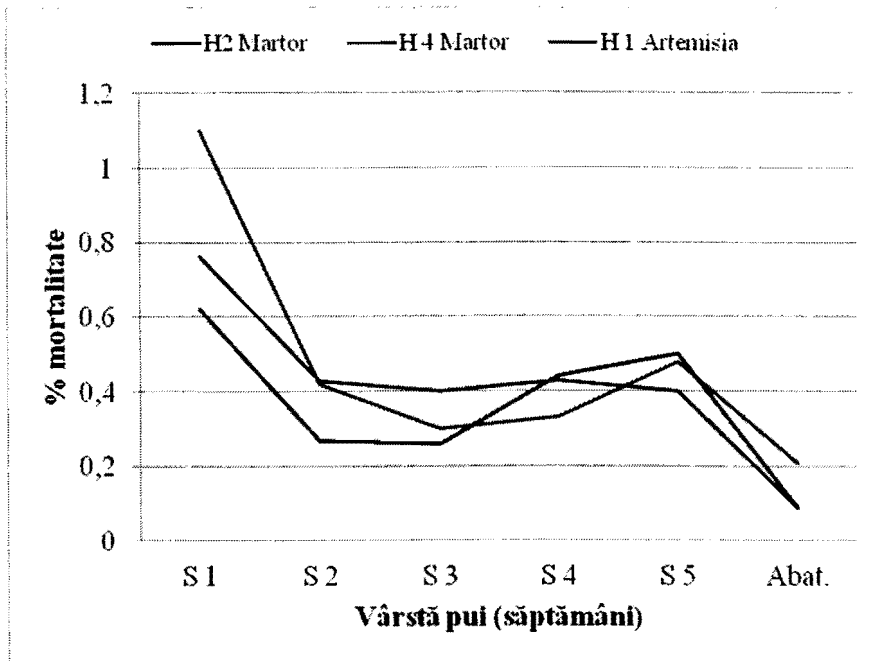


Fig. 3. Evoluția procentului de mortalitate la puii din loturile experimentale pe perioada de creștere până la sacrificare

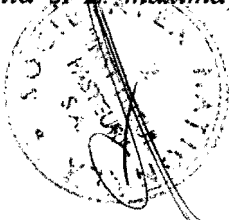
### Exemplul 6

Efectul *A. annua* varietatea germană hibrid A3 asupra florei intestinale la puii broiler în condiții experimentale

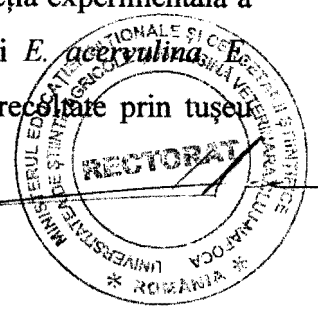
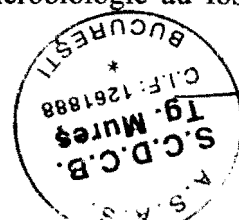
Loturi experimentale a câte 21 pui/lot (3 replicare a 7 pui/lot):

- lot MN: martor negativ, furaj fără *A. annua* sau coccidiostatic și fără infecție experimentală cu *Eimeria* spp.;
- lot MP: martor pozitiv, furaj fără *A. annua* sau coccidiostatic și cu infecție experimentală cu *Eimeria* spp.;
- lot CN: coccidiostatic negativ, furaj cu coccidiostatic (lasalocid 8,8 g/100 kg furaj) și fără infecție experimentală cu *Eimeria* spp.;
- lot CP: coccidiostatic pozitiv, furaj cu coccidiostatic (lasalocid 8,8 g/100 kg furaj) și cu infecție experimentală cu *Eimeria* spp.;
- lot ExpN: *A. annua* negativ, furaj cu *A. annua* (556 g/100 kg furaj) și fără infecție experimentală cu *Eimeria* spp.;
- lot ExpP: *A. annua* pozitiv: furaj cu *A. annua* (556 g/100 kg furaj) și cu infecție experimentală cu *Eimeria* spp..

Furajul experimental a fost administrat din prima zi de viață. Infecția experimentală a fost realizată în ziua 14 cu 5000 oochisturi/pui (suspensie de oochisturi *E. aceryulina*, *E. tenella* și *E. maxima*). Probele pentru examenul microbiologic au fost recoltate prin tușeur



15





cloacal în zilele 14, 21 și 28, de la aceiași pui (au fost identificați prin marcarea). S-au recoltat 3 probe comune/lot; câte 1 probă de la 3 pui/replicat. Probele au fost recoltate folosind tuburi cu tampoane sterile, cu și fără mediu de transport.

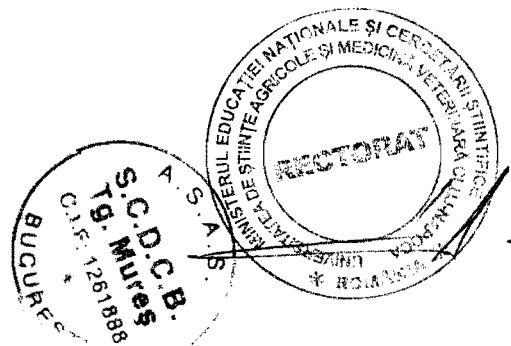
Probele au fost însămânțate în bulion și în bulion cu ficat, apoi au fost pasate la 24 de ore pe diferite medii selective: pe mediul MacConkey pentru evidențierea bacterilor gram negative, pe mediul Chapman Stone și apoi repasate coloniile pe mediul Mueller-Hinton pentru evidențierea bacteriilor gram pozitive, pe agar cu sânge pentru evidențierea bacterilor din genul *Streptococcus* și pe mediul Brilliance™ E. coli/coliform Selective Agar pentru identificarea și izolarea coloniilor de *Escherichia coli*. Identificarea genului/speciei bacteriene a fost realizată cu ajutorul sistemului Vitek 2 (BioMerieux, France) folosind carduri GP (pentru identificarea germenilor gram pozitivi), GN (pentru identificarea germenilor gram negativi) și ANC (pentru identificarea germenilor anaerobi). Toate izolatele de *Escherichia coli* au fost supuse screeningului molecular APEC prin multiplex PCR.

Profilul bacterian obținut la pui netratați și tratați cu *A. annua* sau coccidiostatic, infectați sau neinfecțați cu *Eimeria* spp. este prezentat în tabelul 6. Examenul bacteriologic calitativ a evidențiat discrete diferențe între loturi, statistic ne semnificative, care pot fi corelate mai degrabă infecției experimentale cu *Eimeria*, și mai puțin cu tipul de terapie administrată. De asemenea, rezultatele bacteriologice au evidențiat schimbări în componența florei bacteriene intestinale care pot fi corelate cu vârsta puilor și schimbărilor de receptori celulari ai gazdei pentru diversele specii bacteriene colonizatoare/epifite/biofite.

Patru izolate de *Escherichia coli* au prezentat una (3 izolate gena fimH) sau două (1 izolat genele iss și fimH) gene de virulență specifice APEC, dar niciuna nu a avut profilul complet APEC (toate cele 3 gene prezente) (Tabel 7). Ca distribuție pe vârste, 1 tulpină a fost prezentă la puii de 21 zile și 3 tulpini la puii de 28 de zile vârstă. Acest aspect concorda cu evoluția epidemică standard a unei colisepticemii aviare la puii de găina în vârsta de peste 3 săptămâni. De asemenea, tulpina care a avut prezente 2 gene de virulență specifice APEC a fost izolată tot de la puii în vârsta de 28 de zile. Repartizate pe loturi, 2 tulpini au provenit de la pui netratați neinfecțați și infectați și 2 tulpini de la puii tratați cu coccidiostatic și neinfecțați cu *Eimeria* spp.



16



44

Frecvența speciilor bacteriene identificate (3 determinări/lot), pe loturile de pui chimio preveniți cu artemisinină și coccidiostatic clasic și cu infecție experimentală cu *Eimeria spp.* comparativ cu pui netratați

Tabelul 6

	Lot MN		Lot MP		Lot CN		Lot CP		Lot ArtN		Lot ArtP	
	Z 14	Z 28	Z 14	Z 28	Z 14	Z 28	Z 14	Z 28	Z 14	Z 28	Z 14	Z 28
<i>E. coli</i>	3	3	2	0	2	1	1	1	3	1	3	1
<i>K. penum. pneumoniae</i>	3	3	2	3	3	2	3	3	3	2	3	3
<i>P. mirabilis</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Chromo. violaceum</i>	3	0	3	0	2	0	3	0	2	0	1	0
<i>Corinebacterium spp</i>	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Staph. Aureus</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staph. Lentus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staph. pseudintermedius</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staph. Xylosus</i>	3	0	3	0	3	0	3	0	2	0	1	0
<i>Staph. lugdunensis</i>	0	3	0	1	0	2	0	3	0	2	0	1
<i>Staph. Simulans</i>	0	3	0	1	0	2	0	3	0	2	0	1

Identificarea genelor de virulență la izolatele de *E. coli*

Tabelul 7

	Rec I (14 zile)			Rec II (21 zile)			Rec III (28 zile)		
	ompA	iss	fimH	ompA	iss	fimH	ompA	iss	fimH
<b>MN</b>	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	1/3
<b>MP</b>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3
<b>CN</b>	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	0/3
<b>CP</b>	0/1	0/1	0/1	0/3	0/3	1/3	0/2	1/3	1/3
<b>ArtN</b>	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	0/3
<b>ArtP</b>	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1	0/1	0/3	0/3	0/3

**Exemplul 7**

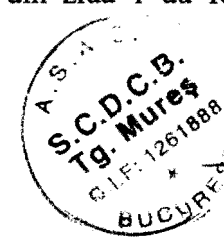
Testarea efectului plantei asupra florei intestinale la puii broiler în condiții industriale

Loturi experimentale

1. Lot *Artemisia* (furaj cu *A. annua* var. germana 3,5 kg/tona de furaj) – hala 1 ferma Jabenita (Opre Avicom);

2. Lot martor – hala 2 ferma Jabenita (Opre Avicom).

Probe pentru examenul microbiologic au fost recoltate prin tuseu cloacal de la câte 10 pui/hală/lot randomizat în zilele 1, 14 și 28. Probele din ziua 1 au fost reprezentate de meconiu.



Analiza florei bacteriene intestinale a fost realizata prin qPCR (amplificare genetica cantitativa in timp real), pe baza secventelor genetice 16s ARNr, urmarindu-se prevalenta grupurilor de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* si *Eubacteria*, raportate prin numarul relativ mediu de copii genetice calculat fata de martorul de reactie UCO Fam + Universal control standard,  $10^5$  copii / ul (Generi Biotech 3140, 3141, Cehia).

Pentru caracterizarea mai în detaliu a florei bacteriene intestinale, de la cele două loturi experimentale de pui, după suspensia în apă ultrapură sterilă, tamponanele cu probe de materii fecale au fost imersate in bulion BHI (Pasteur), iar din culturile rezultate au fost realizate screeninguri genetice pentru APEC (PS IP-BM 053, multiplex PCR).

Din datele Tm la lotul cu *A. annua*, rezultatele sunt mai omogene față de martor. O populație bacteriană *Bacteroidetes* mai omogenă decât la martor, dar în același timp faptul că valoarea Tm este ușor diferită de cea a martorului de reacție și de cele de la lotul de pui martor, sugerează că *Artemisia annua* ar induce mutații punctiforme la nivelul genomului bacterian.

Probele prelevate la vârsta de 1 zi au fost negative APEC. La 14 zile vârstă, lotul tratat profilactic cu *A. annua* a inregistrat 9/10 probe cu profil complet APEC si 1 proba cu 2 gene prezente, iar lotul tratat cu coccidiostatic, 4/10 profil complet APEC, 4/10 probe cu doua gene specifice APEC prezente, si 2/10 probe negative APEC. La 28 de zile varsta, lotul profilactic cu *A. annua* a inregistrat 9/10 probe cu profil complet APEC si 1 proba cu 2 gene prezente, iar lotul tratat cu coccidiostatic, 8/10 profil complet APEC si 2/10 probe cu doua gene specifice APEC prezente (Tabel 8).

Din datele de mai sus rezultă faptul că în fermă ar fi evoluat un episod de colisepticemie, al cărui agent cauzal a fost rezistent/indiferent la ambele tipuri de terapii.

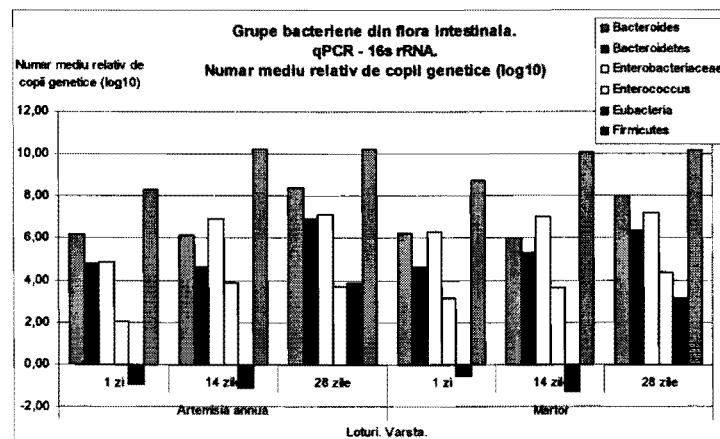
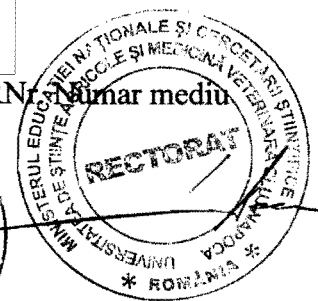
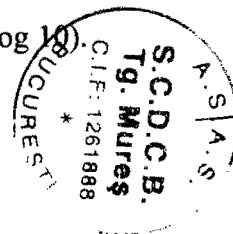
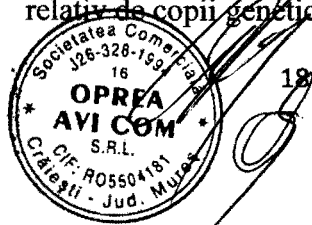
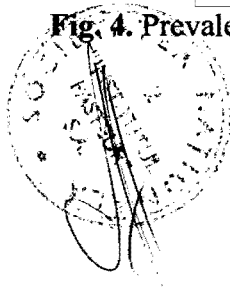


Fig. 4. Prevalenta grupelor bacteriene, evaluata prin qPCR 16s ARNr. Numar mediu

relativ de copii genetice (log 10).

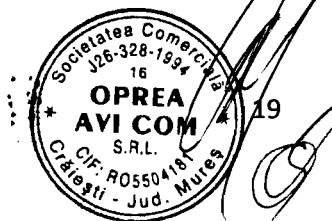
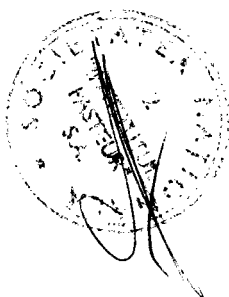


45

*Rezultatele privind screeningul APEC prin mPCR la cele doua loturi experimentale de  
pui crescuti in conditii de ferma comerciala.*

Tabel 8

	Rec I (1 zi)			Rec II (14 zile)			Rec III (28 zile)		
	ompA	iss	fimH	ompA	iss	fimH	ompA	iss	fimH
H1 <i>A. anmua</i>	0/10	0/10	0/10	10/10	9/10	10/10	10/10	9/10	10/10
H2 Martor	0/10	0/10	0/10	8/10	5/10	8/10	10/10	9/10	10/10



## 2. REVENDICĂRI

1. Aditivul furajer pe bază de *Artemisia annua* varietatea germană hibrid A3 se utilizează pentru profilaxia coccidiozei la puii de carne, ca alternativă la coccidiostaticele clasice pentru sistemul ecologic și clasic industrial de creștere și promotor natural de creștere.
2. Aditivul furajer se obține prin uscarea artificială cu aer cald la temperatura de 40-50°C a plantei, urmată de mărunțire și măcinare obținându-se o pulbere fină.
3. Aditivul furajer pe bază de *Artemisia annua* varietatea germană hibrid A3 se încorporează în furaj în doză de 3,5 kg/tona de furaj în procesul tehnologic obișnuit.
4. Aditivul furajer definit la revendicările 1, 2 și 3 îmbunătățește rata de conversie a furajului la puii broiler având calitate de promotor natural de creștere.
5. Aditivul furajer definit la revendicările 1, 2 și 3 se caracterizează prin aceea că se obține prin manopere simple, costuri reduse, este natural, fără efecte secundare asupra stării de sănătate a puilor de carne, este imunostimulator ușor și fără reziduuri în carcasa puilor care să afecteze consumatorul uman.

