

REZUMAT

Cavitatea bucală este unul din segmentele anatomice ale tubului digestiv a cărui microbiotă se caracterizează printr-o accentuată diversitate. Dintre multitudinea de microorganisme, care populează la un moment dat mucoasa bucală, bacteriile reprezintă principalul factor etiologic în producerea acestor afecțiuni urmate de levuri și virusuri.

Flora bacteriană normală are un rol important în fiziologia organismului. Ea previne colonizarea cu floră patogenă, reprezintă un stimul imun nespecific încă de la naștere, produce bacteriocine și produși de degradare toxici care inhibă dezvoltarea germenilor patogeni, favorizează menținerea pH-ului, etc. În anumite condiții însă, poate avea efecte negative asupra organismului, favorizând declanșarea unui proces infecțios.

Ignorarea unui focar de infecție bucală poate avea consecințe grave asupra întregului organism iar nerecunoașterea cauzei primare, într-o boală sistemică, poate duce la eșecul tratamentului.

În plus, convețuirea în același spațiu cu oamenii, alimentația diversificată în raport cu tipul alimentelor consumate de om, lipsa unor activități specifice pentru aceste carnivore și multe alte aspecte particulare, sunt factorii care au dus la transformarea microflorei bacteriene orale a câinilor și pisicilor și implicit probleme stomatologice asemănătoare cu ale omului. De asemenea, identificarea în cavitatea bucală la câine și pisică a unor bacterii implicate în afecțiunile orale la om a dus la continua cercetare pe mapamond a acestor microbiote și la încercarea de a demonstra depășirea barierei de specie în unele cazuri.

Teza intitulată „*Cercetări privind implicațiile unor specii bacteriene în afecțiunile cavității bucale la câine și pisică*” conține 256 pagini fiind redactată în zece capitole și este structurată conform uzanței în două părți.

Prima parte (cap. I, II, III și IV) reprezintă 23,43% și sintetizează principalele date din literatura de specialitate referitor la microbiota orală la câini și pisici, afecțiunile de natură

bacteriană ale cavității bucale la cele două specii, apărarea antiinfecțioasă la nivelul cavității bucale și date epidemiologice privind riscul animalelor de companie pentru om.

Partea aII-a (cap.V, VI, VII,VIII, IX) reprezintă 76,57% și cuprinde cercetărilor proprii efectuate pe parcursul perioadei 2006-2010. Fiecare capitol este structurat în subcapitole care prezintă materiale și metode de lucru utilizate, rezultatele obținute și discuția lor și se finalizează cu concluzii parțiale.

În capitolul IX sunt sintetizate principalele rezultate obținute în urma cercetărilor efectuate, prezentate sintetic în 12 concluziile finale.

Lucrarea este ilustrată cu un număr de 191 figuri, 39 tabele și se bazează pe 275 titluri bibliografice.

Scopul cercetărilor noastre a fost de a monitoriza microflora bacteriană implicată în patologia cavității bucale la câini și pisici, de a identifica impactul local și general indus de infecția bucală și de a stabili frecvența afecțiunilor bucale la câini și pisici în condițiile de vârstă, sex, forme clinice, proveniență și asocierea cu alte afecțiuni organice.

Cercetările bacteriologice au avut la bază următoarele obiective:

- identificarea câinilor și pisicilor cu afecțiuni bucale;
- identificarea microflorei bacteriene din materialele patologice prelevate de la câini și pisici cu afecțiuni bucale;
- efectuarea unor teste de patogenitate pe unele tulpini bacteriene izolate;
- testarea eficienței unor substanțe antimicrobiene pe tulpinile bacteriene izolate în cultură pură sau pe floră totală;
- stabilirea etiologiei bacteriene în funcție de tipul afecțiunii bucale la câini și pisici.

Cercetările imunologice și imunopatologice au avut ca obiective:

- determinarea lizozimului din saliva prelevată de la câini și pisici sănătoase și cu afecțiuni bucale;
- evaluarea concentrațiilor IgA, IgG, IgM din salivă și ser sanguin provenit de la câini și pisici sănătoase și cu afecțiuni bucale;
- determinarea fracțiunii C3a complementului din serul animalelor bolnave;
- evaluarea unor efectori imuni celulari în afecțiunile bucale de natură bacteriană.

Datele epidemiologice obținute au avut ca obiective:

- stabilirea frecvenței afecțiunilor bucale la câini și pisici în funcție de forma clinică, vârstă, sex și asocierea cu alte afecțiuni;

- evaluarea riscului potențial al microbiotei orale prezente la câini și pisici cu afecțiuni orale, în cazul producerii plăgilor prin mușcare. Prezentarea unor studii de caz.

Examinarea bacteriologică a prelevatelor obținute din aceste leziunile bucale la câini și pisici a dus la izolarea a numeroase tulpini bacteriene. Din prelevatele patologice bucale la câine s-au identificat 55,47% tulpini bacteriene pure și 44,53% tulpini bacteriene mixte. La pisici raportul tulpinilor din izolatele bucale a fost inversat izolându-se predominant culturi bacteriene mixte 84,5% și 15,5% tulpini bacteriene în cultură pură.

Identificarea și încadrarea tulpinilor bacteriene după criteriul nișei ecologice a evidențiat faptul că, la câini, cel mai frecvent a fost implicată microbiota bacteriană autohtonă, 82,49% din cazuri, în timp ce, microbiotei alohtone îi revin doar 17,51% din cazuri. La pisică, 87,9% din microbiota bacteriană implicată în diverse afecțiuni bucale, are proveniență autohtonă și doar 12,1% este constituită din microorganisme alohtone.

Microorganismele care dispun de un echipament patogenetic complex și care identifică un ecosistem ușor de pătruns sub influența unor factori deosebiți, favorizează sau declanșează apariția unor entități clinice. În studiul efectuat pe câinii și pisicile prezentate la consultație dar și pe lotul de câini comunitari s-a evidențiat o paletă largă de afecțiuni bucale.

Examinarea bacteriologică a materialelor patologice, prelevate de la câini, a dus la izolarea din **gingivite** a speciilor *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus salivarius*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacterium urealiticum*, *Corynebacterium species*, *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella canis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Actinomyces hardoeuvulneris*; **parodontite**: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus canis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces haerdeovulneris*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides gracilis*, *Bacteroides species*, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella bivia*, *Neisseria zoodegmatis*, *Neisseria animaloris*, *Fusobacterium necrophorum*; **carii dentare**: *Streptococcus mutans*, *Peptostreptococcus species*; **palatinite**: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus canis*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; **orofaringite și tonsilite**: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Corynebacterium species*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Mannheimia haemolytica*; **abcese bucale**: *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium species*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella canis*, *Mannheimia*

haemolytica, *Pseudomonas aeruginosa*; **glosite**: *Corynebacterium urealiticum*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leptospira interrogans* serovarul *canicola*; **fistule orosinusale**: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Actinomyces hardeovulneris*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides species*, *Fusobacterium necrophorum*.

La pisică, bacteriile implicate în afecțiunile bucale, au fost izolate din **gingivite**: *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus salivarius*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacterium species*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*; **parodontite**: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus salivarius*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces hardeovulneris*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides species*, *Bacteroides gracilis*, *Porphyromonas gulae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella bivia*, *Neisseria zoodegmatis*; **carii dentare**: *Streptococcus mutans*; **palatinite**: *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus salivarius*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*; **orofaringite și tonsilite**: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Mannheimia haemolytica*, *Neisseria zoodegmatis*. **abcese orale**: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*; **glosite**: *Escherichia coli*, *Leptospira interrogans* serovarul *canicola*; **fistule orosinusale**: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium species*, *Clostridium perfringens*, *Proteus mirabilis*, *Fusobacterium necrophorum*.

Testarea „*in vitro*” a eficienței unor antibiotice pe tulpinile izolate de la câini au evidențiat, așa cum ne așteptam, o sensibilitate variată. Astfel, pentru **tulpinile aerobe Gram pozitive, cele mai eficiente au fost** metronidazol-spiramicină (76%), cefadroxil (78,3%), cloramfenicol (76,7%), enrofloxacin (76,7%), cefoperazona (69,8%), amoxicilina și acidul clavulanic (68,2%), amoxicilina (61,2%), eritromicina (56,6%), doxiciclina (51,9%); pentru **tulpinile aerobe Gram negative au fost** ceftiofur (84,9%), spectinomycină (71,2%), enrofloxacină (65,8%), cloramfenicol (64,4%), amoxicilina și acid clavulanic (64,4%), amoxicilina (61,6%), norfloxacină (58,9%), cefoperazona (57,5%); pentru **tulpinile anaerobe Gram pozitive**: au fost metonidazol-spiramicină (80%), amoxicilina-acid clavulanic (70%) și amoxicilina, cloramfenicolul și clindamicina (60%); pentru **tulpinile anaerobe Gram negative** au fost metronidazol-spiramicină (80%), clindamicină (80%), doxiciclina (60%)

Tulpinile bacteriene, izolate de la pisică, au manifestat sensibilitate la un număr mai mic de substanțe antimicrobiene. Astfel, cele mai eficiente antibiotice au fost pentru **tulpini aerobe Gram pozitive**: metronidazol-spiramicină (64%), amoxicilin-acid clavulanic (52,2%), rovamycină (51%), penicilina (51,2%), cefadroxil (49%); pentru **tulpini aerobe Gram negative**: enrofloxacin (77,2%), metronidazol-spiramicină (76%), rovamicina (72%), norfloxacină (72%), ceftiofur (63,2%), amoxicilin-acid clavulanic (54,3%); pentru **tulpini anaerobe Gram pozitive**: amoxicilină - acid clavulanic (83,3%), metronidazol-spiramicină (83,3%), cloramfenicol (66,7%), amoxicilina (66,7%) și clindamicină (58%); pentru **tulpini anaerobe Gram negative**: metronidazol-spiramicină (80%), clindamicină (40%) și cloramfenicol (40%).

Având în vedere multitudinea de microorganisme, ce pot acționa sinergic în producerea unor afecțiuni cu localizare bucală, dar și eficiența relativă a unor substanțe antimicrobiene cu efect bucal, este absolut necesară efectuarea examenului microbiologic și efectuarea antibiogramei.

Răspunsul imun față de diverse antigene infectante reprezintă principala modalitate de eliminare și prevenire a infecțiilor produse de microorganisme cu potențial patogen. În același timp și microorganismele și-au dezvoltat strategii ingenioase pentru a se feri de sistemul de autoapărare.

Lizozimul este o glicoproteină (mucopeptidă) care acționează enzimatic asupra peptidoglicanului structural din peretele bacterian. Intervenția lizozimului duce în final la liza celulară. Prin urmare, s-a determinat cantitatea de lizozim la animalele sănătoase și la cele cu afecțiuni bucale. Compararea rezultatelor obținute la lotul martor (valori medii 118 $\mu\text{g/ml}$ la câine și 87,9 $\mu\text{g/ml}$ la pisică) cu valorile de referință, a evidențiat diferențe variabile la câine și la pisică. Astfel, la câinii cu afecțiuni bucale s-a identificat un titru crescut de lizozim a cărei medie a fost de 145.05 $\mu\text{g/ml}$. Diferențe sesizabile s-au identificat și la pisicile cu afecțiuni bucale, valoarea medie totală fiind de 142, 05 $\mu\text{g/ml}$, ceea ce indică o amplificare a activității forțelor de apărare imune.

Determinările cantitative ale anticorpilor din clasa IgA, IgG, IgM din salivă s-au efectuat prin două metode: metoda difuzimetrică și metoda imunoenzimatică ELISA. La câinii și pisicile sănătoase ce au format loturile martor, limitele valorilor serice ale IgG (mg/dl), IgM (mg/dl) și IgA (mg/dl), obținute prin metoda difuzimetrică și metoda imunoenzimatică ELISA, s-au corelat. Totuși datorită acurateței și timpului de obținere a rezultatelor, testului imunoenzimatic a fost utilizat pentru investigațiile ulterioare.

Determinările efectuate pe probele de ser și salivă provenite de la câinii și pisicile cu leziuni bucale de natură bacteriană au arătat o creștere semnificativă la toate grupele de imunoglobuline.

S-a identificat un titrul crescut de IgA salivară la 14 câini (peste 70 mg/dl) și 17 pisici (peste 20 mg/dl), situație similară și în cazul IgA serice la 10 câini (peste 350 mg/dl) și 16 pisici (peste 300 mg/dl). La 9 cazuri din totalul câinilor testați s-a identificat un deficit de IgA serică ($\square$ 112 mg/dl) și salivară ($\square$ 45 mg/dl).

În funcție de formele clinice identificate la câini, titrul de IgA salivară a fluctuat de la 78 mg/dl (palatinită, abcese orale, palatinită, orofaringită) până la 140 mg/dl, la un caz de parodontită cronică iar titrul de IgA serică a variat de la 378 mg/dl (abces dentar, parodontită - fistulă orosinusală) până la 550 mg/dl (parodontită, palatinită - orofaringită). La pisică, titrul de IgA salivară a variat de la 22-23 mg/dl (gingivită, glosită) până la 50-58 mg/dl (abces, parodontită, palatinită) iar titrul IgA serică au variat de la 330 mg/dl (parodontită moderată) la 700 mg/dl (parodontită cronică).

Titulul de IgG salivară la câine a variat între 3,3 mg/dl (abcese, palatinită, orofaringită) și 6,9 mg/dl (parodontită cronică) iar titrul IgG serice a avut valori cuprinse în intervalul 2636 mg/dl (amigdalită, gingivită) și 5250 mg/dl (parodontită cronică). La pisică, titrul de IgG salivară a fost cuprins între 2,3 mg/dl (gingivită, abces oral) și 13 mg/dl (parodontită, orofaringită) iar IgG serică a avut valori cuprinse în intervalul 2475 mg/dl (parodontită) și 5250 mg/dl (parodontită cronică).

Titulul de IgM salivară la câine a variat între 6,2 mg/dl (gingivite cu inflamații hemoragice) și 11,9 mg/dl (parodontită cronică) iar IgM serică a avut valori cuprinse între 305 mg/dl (parodontită moderată) și 647 mg/dl (parodontită cronică). La pisică titrul de IgM salivară a variat între 4,2 mg/dl (gingivite) și 12 mg/dl (abcese orale și fistule orale) iar titrul IgM seric a avut valori cuprinse între 305 mg/dl (parodontită moderată) și 647 mg/dl (parodontită cronică).

Evaluările fracțiunii C_3 a complementului seric, la lotul martor, au evidențiat valori cuprinse între 4,5-5,5 u/L la câini și 4-5 u/L la pisici. Cele mai ridicate valori ale titrului de C_3 au fost identificate în parodontite cronice la câine (6,5-6,8 u/L) și pisică (8,9 u/L).

Prezența hipergamaglobulinemiei demonstrează o activitate sporită a sistemului imun local și general, la animalele de companie cu diverse afecțiuni bucale. Variația titrurilor de anticorpi serici și salivari și lipsa corelațiilor dintre aceștia, indică faptul că, fiecare individ reacționează particular. Totuși, la ambele specii de animale, rezultatele titrurilor obținute la IgA serică și salivară, cu excepția cazurilor cu deficit de IgA, se corelează cu gravitatea leziunilor bucale.

În urma investigațiilor hematologice s-a constatat leucocitoză și limfocitoză la toate cazurile investigate iar eritrocitoza a fost prezentă doar la 9 câini și 4 pisici.

Coroborarea valorilor imunogramei cu cele ale fracțiunii C3 a complementului seric și rezultatele parametrilor hematologici investigați, reflectă modul în care afecțiunilor bucale pot modifica statusul imunitar atât la câini cât și la pisici.

Parodontita, asociată cu alte afecțiuni orale sau ca unică leziune, comparativ cu alte leziuni bucale, rămâne cea mai importantă afecțiune bucală cu impact major asupra sistemului imun local și general. Acest aspect este susținut și de alte cercetări care au studiat boala parodontală, atât la om cât și la animalele de companie. De asemenea, rezultatele obținute în studiul nostru evidențiază faptul că, abcesele orale, indiferent de localizare, ca și orofaringitele asociate cu tonsilite sau palatinite evoluează cu importante modificări ale forțelor de apărare locală și generală.

Întrucât, pe parcursul cercetărilor noastre, au fost identificate puține date epidemiologice referitoare la afecțiunile bucale la câini și pisici, s-a încercat întocmirea unui raport brut de evaluare a frecvenței acestora (gingivite, parodontite, abcese, orofaringite- tonsilite, palatinite, carii dentare, etc.), pe parcursul anului 2009. Au fost centralizate datele din registrele de consultație, din cinci puncte de examinare medicală veterinară: Clinicile din Facultatea de Medicină Veterinară Iași, Cabinet medical veterinar nr.1 Iași, Cabinet Medical veterinar nr.2 Iași, Cabinet medical veterinar nr.3, Bacău. O situație aparte a fost la Padocul Miroslava unde s-au examinat 96 câini abordabili, existenți în incinta padocului, la o anumită dată, în vederea identificării indivizilor cu afecțiuni bucale.

În urma sintetizării datelor s-a constatat că, afecțiunile bucale au fost identificate la pisici cu o frecvență de 10,81% din 1248 animale examinate iar la câini, 7,26% din 2751 câini prezentați la consultație. Gruparea pe categorii de vârstă a evidențiat faptul că, cel mai frecvent, afecțiunile bucale sunt identificate la câinii cu vârsta cuprinsă între 5-10 ani (30,37%) și la pisicile cu vârsta de 10-15 ani (47,5%). De asemenea, s-a constatat că, femelele ambelor specii au fost cele mai afectate.

Din cei 200 de câini, 91% au prezentat placă dentară și tartru, 61,5% parodontite, 27% gingivite, 5% carii, 3,5% palatinite și 3% glosite, iar la pisici, din 135 cazuri, 89,6% au prezentat placă dentară și tartru, 85,18% parodontite, 53,3% gingivite, 14,81% orofaringite-tonsilite, 5,18% palatinite, 3,70% carii și 1,48% glosite.

De asemenea, 53,5% dintre câini și 39,25% dintre pisicile investigate, s-au diagnosticat și cu alte afecțiuni organice.

La câini, din cele 107 cazuri cu afecțiuni bucale asociate, 42 cazuri au fost cu afecțiuni urogenitale (39,25%), 39 cazuri manifestau dermatopatii (36,45%), 23 cazuri au fost asociate cu otite (21,5%), 1 caz prezenta sindrom cardiac (0,9%) și 2 cazuri prezentau sindrom hepatic (1,8%). La pisici, din cele 53 pisici care prezentau afecțiuni bucale asociate cu alte afecțiuni organice, 25 cazuri manifestau infecții urogenitale (47,5%), 16 cazuri cu dermatite bacteriene (30%), 8 cazuri au fost asociate cu otite (15%), 3 cazuri cu sindroame cardiace (5%) și doar 1 caz cu sindrom hepatic (1,8%).

În literatura de specialitate au fost identificate teorii privind mecanismele de transmitere a infecției bucale la alte organe și, în unele cazuri, s-a demonstrat originea, cu punct de plecare orală, a unor bacterii zolate din alte afecțiuni sistemice. Totuși, este dificil să se studieze acest aspect pe o cazuistică a căror proprietari nu permit investigații complete și uneori invadante.

Relația strânsă între câine, pisică și om poate să constituie un risc pentru sănătatea oamenilor prin transmiterea, peste bariera de specie, a unor bacterii cu potențial patogen. Având în vedere identificarea la nivelul cavității orale la câini, pisici a unor specii cu risc de transmitere încrucișată (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus canis*, *Corynebacterium urealyticum*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella canis*, *Leptospira interrogans* serovarul *canicola*), se recomandă evitarea contactul oral-oral dintre proprietari și animalele de companie, expunerea la mușcături, contactul tegumentelor lezionate cu secrețiile cavității orale.

Realizarea unui studii de caz a evidențiat impactul traumatic și infecțios al mușcăturilor produse de câini și pisici la om. Observațiile au fost efectuate pe două categorii de persoane, expuse sistematic riscului, respectiv proprietari cu animale ce devin agresive în anumite condiții și medicii veterinari.

Prin investigațiile microbiologice efectuate pe materialele patologice prelevate atât din plaga produsă prin mușcătură dar și din cavitatea bucală a animalelor agresoare, s-a încercat demonstrarea impactului produs prin inocularea bacteriilor cu potențial patogen, din cavitatea bucală în plagă.

Microbiota orală are un rol major în patologia cavității bucale. Multitudinea de microorganisme din cavitatea bucală, capacitatea patogenă și modul de acțiune locală și generală a unor tulpini bacteriene, induc un risc permanent pentru animale și om. Toate rezultatele obținute ne îndreptătesc să sugerăm importanța majoră a acestor afecțiuni bucale, aparent, ne semnificative prin frecvență și impact clinic.