

REZUMAT

Teza de doctorat intitulată “Studii privind diagnosticul de laborator, terapia clasică și nonconvențională a dermatitelor cu substrat bacterian la câine și pisică”, conform uzanțelor este structurată în două părți, conținând un număr de 136 pagini . În prima parte sunt sintetizate informații privind stadiul actual al cunoașterii, iar în a doua parte sunt prezentate rezultatele privind cercetările proprii în tematica abordată. Ne-am propus să abordăm patologia cercetată dintr-o perspectivă etiologică, cunoașterea mai aprofundată a agenților etiologici aducând informații importante și relevante atât în diagnosticul cât și în terapia piodermitelor.

Prima parte, totalizând un număr de 28 pagini, prezintă într-un mod sintetic informații de actualitate referitoare la etiopatogenia piodermitei la carnivore de companie; diagnosticul și managementul terapeutic al piodermitelor la câine și pisică.

A doua parte a tezei, totalizând un număr de 108 pagini, prezintă rezultatele cercetărilor proprii, fiind structurată în 4 capitole. Pornind de la scopul și obiectivele propuse, sunt prezentate rezultatele investigațiilor epidemiologice privind piodermitele la animalele de companie, câini și pisici, cercetările concentrându-se apoi pe principalul agent etiologic, *Staphylococcus spp.* În fiecare capitol sunt descrise materialele și metodele folosite și sunt prezentate rezultatele și discuțiile aferente acestora, precum și concluziile parțiale desprinse.

În lucrare se regăsesc un număr de 56 figuri, 33 tabele și a fost documentată cu un total de 164 titluri bibliografice.

Capitolul III – “Scopul și obiectivele tezei”. Argumentele privind oportunitatea și importanța cercetărilor se referă la două aspecte: riscul zoonotic și antropozoonotic al stafilocociilor și nu numai, precum și limitarea tot mai pregnantă a tratamentului cu antibiotice din cauza fenomenului de antibioretistență. Scopul temei propuse a fost acela de a aduce o contribuție analitică în diagnosticul și terapia piodermitelor la animalele de companie și aprofundarea studiilor până la nivel molecular în ceea ce privește *S.aureus* și *S.pseudintermedius*. Astfel, s-au prezentat date utile atât în orientarea diagnosticului cât mai ales în instituirea terapiei etiotrope, precum și date privind noi posibilități terapeutice cu substanțe așa zis „neconvenționale”.

Principalele obiective ale cercetărilor au fost:

- determinarea prevalenței piodermitelor în cadrul dermatitelor la câini și pisici;
- determinarea prevalenței agenților etiologici în cadrul piodermitelor prin izolarea și identificarea fenotipică a acestora;
- confirmarea moleculară a identificării speciilor *S.aureus* și *S.pseudintermedius*;
- caracterizarea genotipică a *S.aureus* și *S. pseudintermedius*, privind unele gene de virulență și rezistența la unele antibiotice și antiseptice;
- determinarea prevalenței tulpinilor MRSA și MRSP;
- confirmarea moleculară a metilino-rezistenței tulpinilor încadrate fenotipic în MRSA, MRSP;
- evaluarea *in vitro* a sensibilității la diferite clase de antibiotice a izolatelor stafilococice;

- testarea *in vitro* a efectului antibacterian al apei PAW;
- analiza statistică.

Capitolul IV este intitulat „Investigații epidemiologice privind piodermitile în regiunea de nord-est a României”. Cazuistica a fost reprezentată de un număr de 163 pacienți, 98 câini și 65 pisici, din județul Iași și localități limitrofe județului Iași. În prima fază s-a urmărit încadrarea dermatitelor din punct de vedere clinic, în dermatite superficiale, profunde și otite externe, precum și din punct de vedere etiologic în dermatite de natura micotică, parazitată și bacteriană. Asocierea dermatitelor (inclusiv otitele) micotice și parazitare cu dermatitele bacteriene a fost constatată într-un procent de aproximativ 60 în primul caz și de aprox.30 în cel de-al doilea caz, valorile mai mari înregistrându-se în cazul otitelor. După eliminarea din lotul cercetat a cazurilor care nu prezentau etiologie bacteriană, investigațiile au continuat în paralel, din punct de vedere clinic și microbiologic. În urma anamnezelor minuțioase, acolo unde s-a ridicat suspiciunea unor boli primare, s-au efectuat investigații specifice. Au fost confirmate patru cazuri de hipotiroidism, două suspiciuni de Cushing fiind infirmate.

Din punct de vedere microbiologic, testările fenotipice au identificat, din totalul celor 121 piodermite, 85 de cazuri cu etiologie stafilococică, 17 infecții cu *Pseudomonas spp.*, 15 cazuri de streptococii, 2 nocardioze, 2 cazuri de infectare cutanată cu *Mycobacterium spp.* și otite externe, polibacteriene (asociate cu *Proteus spp.*). Testările fenotipice s-au concentrat, ulterior, pe *Staphylococcus spp.*, agent etiologic cu cea mai mare prevalență în dermatite de natură bacteriană. Au fost identificate prin testări fenotipice un număr de 36 tulpini *S.aureus*, 21 tulpini *S.pseudintermedius*, iar 28 de tulpini au fost încadrate în grupul “alți stafilococi”. Având în vedere importanța fenomenului de antibioretistență, a fost testată fenotipic metilino-rezistența, pentru încadrarea MRSA.

Din totalul de 36 tulpini de *S. aureus*, 21 au fost identificate ca metilino-rezistente (58,33 %). Subliniem faptul că, aproape jumătate dintre proprietari s-au prezentat pentru examene de laborator după ce pacienților li s-au administrat unul, două sau chiar mai multe antibiotice, ca tratament de primă intenție. Este modalitatea prin care se selectează tulpini bacteriene antibioretistente, fapt care, în final, afectează și sănătatea umană, lucru firesc având în vedere coabitarea atât de strânsă între om și animalul său de companie. Testările fenotipice au inclus teste de patogenitate precum hemoliza și prezența coagulazei. Testele de patogenitate au arătat că 14 izolate de *Staphylococcus spp.* nu au prezentat hemoliză și au provenit din cazuri de dermatită superficială, cu un tablou clinic șters: ușoară alopecie, eritem, fine descumări ale tegumentului. Din cele 85 de tulpini coagulazo- pozitive, 19 tulpini au coagulat plasma de iepure până în 4 ore, restul până în 24 de ore. Acest rezultat a fost corelat cu tabloul clinic și s-a constatat că tulpinile au provenit de la pacienții care prezentau material purulent sau exudat purulent/ ulceratii/fistulizări.

În capitolul V, intitulat “Caracterizarea genotipică a izolatelor stafilococice și analiza statistică” cercetările au fost aprofundate cu studii de epidemiologie moleculară. Pentru identificarea genotipică au fost selectate 83 tulpini de *Staphylococcus spp.* Identificarea prin PCR a speciilor de stafilococi izolați din piodermite a confirmat faptul că *S.pseudintermedius* este principalul agent etiologic în piodermite la câini, la pisici identificându-se într-un procent de 91,30% *S.aureus*. În ceea ce privește otitele, identificarea genetică a speciilor de *Staphylococcus spp.* a fost următoarea: 10 tulpini *S. aureus*, 3 tulpini din alte specii și nici o tulpină de *S. pseudintermedius*.

Pentru caracterizarea genetică a izolatelor stafilococice, au fost efectuate testări pe un număr de 76 tulpini de *Staphylococcus spp.*, provenite de la 64 cazuri dermatite și 12 tulpini din otite externe. Caracterizarea genetică a izolatelor stafilococice a urmărit identificarea unor gene ce codifică: rezistența la antibiotice (*mecA*, *mecC*, *mup*, *fusB*, *fusC*, *fusD*); rezistența la antiseptice (*smr*, *qacA/B*); gene de virulență (*lukS*, *lukF*, *siet*, *sec_{canine}*, *expA/B*, *PVL*) și proteine formatoare de biofilm (*icaA*, *icaD*, *bap*).

Din punct de vedere clinic, al aspectului tabloului lezional, identificarea genelor de virulență este relevantă, întrucât: *Luk S*, *Luk F* – prezente la *S. pseudintermedius* codifică o leucotoxină, similar *pvl* produsă de *S. aureus* (Futagawa S., ș.a., 2009), cu efect citotoxic prin crearea de pori în membrana celulelor țintă (Guillet V., ș.a., 2004); *PVL* – este o exotoxină extrem de virulentă, caracteristică *S. aureus*, ce transformă țesuturile gazdă în nutrienți necesari creșterii și dezvoltării bacteriene (Melles DC., ș.a., 2006); *Siet*, *exp A*, *exp.B* - sunt gene care codifică producerea unor toxine exfoliative; prezența *siet* fiind semnificativ statistic asociată cu infecțiile cutanate (Ruzauskas M., ș.a., 2016); *Sec_{canine}* – codifică enterotoxicitatea stafilococilor, dar a fost identificată și la tulpini de *Staphylococcus* izolate de la animale din diferite patologii, având capacitatea de a induce starea de vomă și proliferarea celulelor T. Identificarea acestor gene la tulpinile de *S. pseudintermedius* confirmă potențialul lor enteropatogenic (Garbacz K., ș.a., 2013).

Analiza celor 4 mari categorii de gene a arătat faptul că factorii de virulență au avut cel mai mare impact asupra mecanismului patogenic. S-a constatat că în cazul infecțiilor cutanate, la cele 44 de tulpini „purtătoare” de gene de virulență s-au identificat nu mai puțin de 145 de gene. Au fost identificate 16 tulpini cu câte 4 gene de virulență, 26 tulpini cu câte 3 gene de virulență și 3 tulpini cu o singură genă ce codifică factori de virulență. S-a confirmat astfel, la nivel molecular, agresivitatea izolatelor de *Staphylococcus spp.* din piodermite și otite.

Din punct de vedere al tratamentului cu antiseptice, antibiotice și formarea de biofilm (ca formă de rezistență la antibioterapie) s-a constatat că 83,2% dintre tulpinile izolate din otite au prezentat gene din aceste trei categorii, cu precizarea că mai mult de jumătate din acest procentaj provine din grupul genelor ce codifică formarea de biofilm; iar în cazul piodermitelor procentul a fost de 37,4. Rezultatele obținute explică, cel puțin parțial, eșecurile terapeutice și recidivele, de asemenea argumentează necesitatea cercetării continue în vederea găsirii de noi soluții terapeutice.

Capitolul VI intitulat „Inițierea terapiei etiotope în stafilococii la câine și pisică și perspective în utilizarea unor noi compuși antibacterieni” prezintă cercetările concentrate pe profilurile de rezistență ale tulpinilor de stafilococi, încadrarea acestora în MDR, XDR, PDR și testarea *in vitro* a efectului antibacterian al apei PAW ca posibilitate terapeutică.

În prima parte ale acestor testări s-a urmărit stabilirea profilului de sensibilitate/rezistență la antibiotice, esențială pentru alegerea adecvată a tratamentului de primă intenție. Acest lucru se impune cu atât mai mult cu cât, de multe ori, din motive obiective (lipsa unui laborator de microbiologie în proximitatea cabinetului veterinar) sau subiective (ce țin de proprietar) antibioterapia de primă intenție nu este urmată de examen bacteriologic și antibiogramă. Este unul din motivele dezvoltării antibiorezistenței, fapt ce îngreunează efortul clinicienilor de a trata piodermitile la animalele de companie. O alternativă terapeutică este conceptul de “rotire” a antibioticelor pentru a se încerca reducerea presiunii de selecție a tulpinilor rezistente și prelungirea duratei de acțiune a compușilor. Practic, acest lucru implică înlocuirea periodică a antibioticelor de primă intenție cu alte clase de compuși (Masterton, 2005).

Testările au fost realizate pe un lot de 85 tulpini de *Staphylococcus spp.* provenite de la 61 câini și 24 pisici cu piodermită și otită externă. Din anamneză a reieșit că 55 pacienți (64,7%) au beneficiat de antibioterapie anterior recoltării de probe pentru examenul bacteriologic și antibiogramă; 9 proprietari (10,5%) au declarat că nu au administrat antibiotic, iar pentru 21 de cazuri (24,7%), această informație a fost inexistentă. A fost confirmată metilicilino-rezistența (MRSA) într-un procent de 32,3, fapt care a crescut rezistența la beta lactamice la procente de 64,7 pentru AMC, 76,4 pentru AX și 64,7 pentru AML.

O altă formă de rezistență identificată, a fost rezistența inductibilă la clindamicină la 13 tulpini testate (15,29%). Astfel de tulpini sunt raportate ca rezistente la toate lincosamidele și macrolidele, fiind tulpini posesoare a genei de rezistență *erm*. (Andrews ș.a., 2011; Lewis ș.a., 2005). Rezultatele testării tulpinilor de *Staphylococcus spp.* la cele 11 clase de antibiotice au arătat că primele trei clase de antibiotice la care tulpinile testate au prezentat cele mai mari procente de rezistență au fost penicilinele, urmate de polipeptidicele și tetraciclinele. Rezultatele sunt în corelație cu cele mai utilizate antibiotice ce se regăsesc în produsele cu utilizare topică dar și cu antibioticele de primă intenție utilizate în zona din care au provenit cazurile. Clasele de antibiotice la care tulpinile testate au avut un procent mare de sensibilitate s-au dovedit a fi rifamicinele, quinolonele și cloramfenicolii.

Un aspect interesant considerăm că este rezistența la acid fusidic (11,76%) – depistată fenotipic și confirmată genotipic (13,1%), în condițiile în care din anamneza efectuată a reieșit faptul că nici unul dintre pacienți nu a fost tratat cu acest antibiotic. Acest aspect poate fi o confirmare a circulației tulpinilor în natură sau poate fi vorba despre o eventuală rezistență încrucișată (O'Neill ș.a., 2002). Tot în această primă parte a capitolului VI, datorită studiilor realizate la FMV Iași (Solcan, 1998) s-a putut realiza o analiză retrospectivă privind evoluția antibioretistenței la un număr de 13 antibiotice. S-a constatat astfel că, cele mai mari creșteri procentuale ale antibioretistenței au fost în cazul Amoxicilinei+ acid clavulanic (de la 0 la 60), urmate de Amoxicilină / Polimixină (de la 0 la 57,64) și Neomicină (de la 0 la 51,76).

În cea de-a doua parte a capitolului VI, am prezentat rezultatele privind încadrarea în MDR, XDR și PDR. Prin inițiativa Centrului European de Prevenire a Bolilor, a fost creată o terminologie standardizată la nivel internațional prin care să fie descris profilul de rezistență dobândit de mai multe bacterii, printre care și *S.aureus*. Listele cu clasele de antibiotice propuse pentru testarea profilului de rezistență au fost create și puse la dispoziție de Institutul Clinic de Standarde de Laborator (CLSI), Comitetul European pentru Testarea Sensibilitatii Antimicrobiene (EUCAST) și Statele Unite ale Americii Food and Drug Administration (FDA). Definițiile pentru MDR, XDR și PDR, conform forurilor menționate mai sus sunt: **MDR** – izolate rezistente la cel puțin un agent antimicrobian din cel puțin trei clase de antibiotice, **XDR** – a fost definit ca rezistența la cel puțin un agent din toate clasele, cu excepția a cel mult două clase la care prezintă sensibilitate totală, **PDR** – sunt acele izolate rezistente pentru toți agenții, din toate clasele de antibiotice.

Urmărind aceste definiții subliniem că; toate izolatele MRSA sunt considerate din start MDR, întrucât rezistența la oxacilină/cefoxitin, induce rezistența la toate beta lactamicele existente. Similar, rezistența la clindamicină și eritromicină, cu apariția formei „D”, este raportată ca rezistență la toate lincosamidele (lincomicina) și macrolidele (clindamicina, spiramicina, claritromicina, azitromicina, roxitromicina), izolatele fiind încadrate MDR. Lista claselor și agenților antimicrobieni utilizați este orientativă, reprezentând doar un ghid, ea poate fi adaptată și trebuie completată, pe măsură ce noi substanțe devin disponibile pentru terapie (Magiorakos ș.a., 2012). În cercetările noastre, s-au adaptat

unele antibiotice cu cele utilizate în zona geografică inclusă în studiu. Testarea profilului de sensibilitate/rezistență la cele 11 clase de antibiotice a demonstrat faptul că, din cele 85 tulpini de *Staphylococcus spp.* provenite din piodermite la animale de companie (câini și pisici), 22 de tulpini (25,88%) au prezentat sensibilitate la toate clasele testate (cu rezistență la cel mult un antibiotic din cel mult 2 clase), 61 tulpini pot fi încadrate MDR (71,76%), prezentând rezistență la cel puțin un agent antimicrobian din cel puțin trei clase de antibiotice; iar 2 tulpini au prezentat rezistență la cel puțin un antibiotic din toate clasele (mai puțin două), încadrându-se XDR (2,85%). Nu a fost detectată nici o tulpină PDR.

Un ultim studiu al cercetărilor noastre a urmărit efectul antibacterian *in vitro* al apei PAW, utilizarea acesteia în dermatologie reprezentând o soluție viabilă vis a vis de mecanismele de rezistență la antiseptice și dezinfectanți. Mecanismele adaptive și rezistența bacteriilor la antiseptice și dezinfectanți sunt cunoscute, rezistența fiind o proprietate naturală (intrinsecă) sau o proprietate dobândită datorită mutației sau achiziției de plasmide (ADN auto-replicare și extracromozomal) sau transpozoniilor (transpozoni cromozomi sau plasmide de integrare) (McDonnel ș.a., 1999; Grundmann ș.a., 2006). În lupta globală cu infecțiile cutanate stafilococice, un caz special este reprezentat de stafilococul rezistent la meticilină considerat o amenințare globală. (Grundmann ș.a., 2006); dezvoltarea unor tratamente topice alternative fiind salutară.

Apa care este activată cu plasma rece, capătă un pH acid și conține, printre alte grupări: peroxid de hidrogen (H₂O₂), nitrat (NO₃) și nitrit (NO₂), anioni responsabili de degradarea peretelui bacterian, prin intermediul unui efect oxidativ asupra proteinelor, lipidelor și ADN-ului. (Oehmigen ș.a., 2010; Brisset ș.a., 2012).

Eficacitatea inactivării prin utilizarea acestei metode depinde de factori abiotici (temperatura, duritatea apei, cantitatea de substanțe organice și nutrienți pentru bacterie) și factori biotici (structura peretelui celular, prezența sau absența capsulelor, capacitatea de a sporula) (Naitali ș.a., 2010; Kamgang-Youbi ș.a., 2008). Studiile arată că acțiunea antimicrobiană a PAW crește în următoarea ordine: levuri, bacterii gram-pozitive și bacterii gram-negative (Kamgang Youbi ș.a., 2009; Ursache ș.a., 2014).

Testările au fost efectuate pe probe ce au avut încărcătura bacteriană inițială cuprinsă între $4,78 \times 10^8$ și $8,3 \times 10^{10}$. La tratamentul de 3 minute al tulpinilor cu PAW, valorile reducăției au variat de la 0 la 7,38 cu o medie de 5 log; iar la 10 minute, reducerea minimă și maximă a fost de 4,99; respectiv 9,; cu o medie de 6,99 log. Având în vedere că încărcăturile bacteriene mai mari de 10^5 CFU/ țesut corespund infecției, iar pentru bacterii precum streptococi beta hemolitici, *S. aureus* și *P. aeruginosa* sunt suficiente încărcături mult mai mici, considerăm că rezultatele reducăției obținute *in vitro* sunt concludente pentru utilizarea PAW ca agent antimicrobian (Heinlin ș.a., 2011).

În Capitolul VII – „Concluzii finale și recomandări” sunt sintetizate în 26 concluzii aspecte concludente ale cercetărilor și sunt emise câteva recomandări desprinse din rezultatele obținute.