

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ „ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: SEMIOLOGIE ȘI PATOLOGIE MEDICALĂ**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. Vasile VULPE**

**Doctorand,
Irina Elena ABALAȘEI (LIPOVAN)**

- 2018 –

**UNIVERSITY OF APPLIED LIFE SCIENCES AND ENVIRONMENT
„ION IONESCU DE LA BRAD”, IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: SEMIOLOGY AND MEDICAL PATHOLOGY**

DOCTORAL THESIS

PhD Coordinator,

Prof. univ. dr. Vasile VULPE

Doctorand,

Irina Elena ABALAȘEI (LIPOVAN)

- 2018 –

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ „ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: SEMIOLOGIE ȘI PATOLOGIE MEDICALĂ**

**STUDII PRIVIND DIAGNOSTICUL DE LABORATOR, TERAPIA
CLASICĂ ȘI NONCONVENȚIONALĂ A DERMATITELOR CU
SUBSTRAT BACTERIAN LA CÂINE ȘI PISICĂ**

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. Vasile VULPE**

**Doctorand,
Irina Elena ABALAȘEI (LIPOVAN)**

- 2018 -

**UNIVERSITY OF APPLIED LIFE SCIENCES AND ENVIRONMENT
„ION IONESCU DE LA BRAD”, IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: SEMIOLOGY AND MEDICAL PATHOLOGY**

**STUDIES REGARDING LABORATORY DIAGNOSIS, CLASSIC AND
UNCONVENTIONAL THERAPY IN DOGS AND CATS WITH
BACTERIAL SUBSTRATE DERMATITIS**

**PhD Coordinator,
Prof. PhD Vasile VULPE**

**Phd Student,
Irina Elena ABALAȘEI (LIPOVAN)**

- 2018 -

*Copiilor mei, Theodora Ana și Radu Ioan, cu mesajul:
determinarea și perseverența fac ca totul să fie posibil.
Puterea vine din interior, indiferent de condițiile și factorii externi !*

CUPRINS

INTRODUCERE	11
REZUMAT.....	17
PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	29
CAPITOLUL 1. ETIOPATOGENIA PIODERMITEI LA CARNIVORELE DE COMPANIE.....	31
1.1. Pielea și microbiota cutanată	31
1.2. Agenții etiologici ai piodermitelor.....	33
1.3. Factori de patogenitate bacteriană	34
1.4. Factori protectori și predispozanți ai gazdei	37
1.5. Dermatoimunologie	38
CAPITOLUL 2 . DIAGNOSTICUL ȘI MANAGEMENTUL TERAPEUTIC AL PIODERMITELORE LA CARNIVORELE DE COMPANIE	40
2.1. Tipuri de leziuni cutanate	41
2.1.1. Leziunile primare.....	41
2.1.2. Leziunile secundare	42
2.1.3. Clasificarea dermatitelor bacteriene	43
2.2. Metode de diagnostic în piodermite la câini și pisici.....	46
2.2.1. Examenul citologic și bacterioscopic	46
2.2.2. Examenul bacteriologic și antibiograma.....	48
2.3. Protocolul terapeutic al piodermitelor	48
2.3.1. Terapia etiotropă sistemică și topică.....	48
2.3.2. Tratamente adjuvante și terapii alternative	55
2.3.3. Managementul terapiei în piodermite	58
PARTEA A- II -A - CERCETĂRI PROPRII	59
CAPITOLUL 3. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR.....	61
CAPITOLUL 4. INVESTIGAȚII EPIDEMIOLOGICE PRIVIND PIODERMITELE ÎN REGIUNEA DE NORD EST A ROMÂNIEI.....	63
4.1. Materiale și metode.....	63
4.2. Rezultate și discuții.....	70
4.2.1. Aspecte clinice în cazurile de dermatite și otite luate în studiu	70
4.2.2. Prevalența piodermatitelor și a diferiților agenți etiologici	75
4.3. Concluzii parțiale.....	77

CAPITOLUL 5. CARACTERIZAREA GENOTIPICĂ A IZOLATELOR STAFILOCOCICE.....	78
5.1. Materiale și metode.....	78
5.2. Rezultate și discuții.....	82
5.2.1. Identificarea genotipică a izolatelor de <i>S. aureus</i> și <i>S. pseudintermedius</i> ...	82
5.2.2. Caracterizarea genotipică a izolatelor de <i>S. aureus</i> și <i>S. pseudintermedius</i>	84
5.3. Analiza statistică	90
5.4. Concluzii parțiale.....	92
 CAPITOLUL 6. ÎNȚIEREA TERAPIEI ETIOTROPE ÎN STAFILOCOCII LA CÂINE ȘI PISICĂ ȘI PERSPECTIVE ÎN UTILIZAREA UNOR NOI COMPUȘI ANTIBACTERIENI	94
6.1. Materiale și metode.....	94
6.2. Rezultate și discuții.....	96
6.2.1. Studii <i>in vitro</i> privind fenomenul de antibiorezistență a izolatelor de <i>Staphylococcus spp.</i> izolate din piodermite.....	96
6.2.2. Încadrarea MDR, XDR și PDR a izolatelor de <i>S. aureus</i> și <i>S. pseudintermedius</i>	104
6.2.3. Testarea <i>in vitro</i> a efectului antibacterian al apei activate cu plasmă rece, posibilități terapeutice.....	107
6.3. Concluzii parțiale.....	109
 CAPITOLUL 7 . CONCLUZII FINALE ȘI RECOMANDĂRI	110
 BIBLIOGRAFIE	115
 ANEXA 1. LISTĂ ABREVIERI	125
 ANEXA 2. LISTA TABELELOR	127
 ANEXA 3. LISTA FIGURILOR.....	131
 ANEXA 4. LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE.....	135

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	14
ABSTRACT	23
PART I – THE PRESENT STAGE OF KNOWLEDGE	29
CHAPTER 1. ETIOPATHOGENESIS OF PYODERMA IN PET CARNIVORES	31
1.1. Skin and skin microbiota	31
1.2. Etiological agents of pyodermas	33
1.3. Bacterial pathogenic factors	34
1.4. Protective and predisposing factors of the host	37
1.5. Immunodermatology	38
CHAPTER 2. DIAGNOSIS AND THERAPEUTIC MANAGEMENT OF PYODERMAS IN DOGS AND CATS	40
2.1. Types of skin lesions	41
2.1.1. Primary lesions	41
2.1.2. Secondary lesions	42
2.1.3. Histopathological classification of bacterial dermatitis	43
2.2. Diagnostic methods in pyodermas in dogs and cats	46
2.2.1. Cytological and bacterioscopic examination	46
2.2.2. Bacteriological examination and antibiogram	48
2.3. Therapeutic management of pyodermas	48
2.3.1. Systemic and topical etiotropic therapy	48
2.3.2. Adjuvant and alternative therapies	55
2.3.3. Management of therapy in pyoderma	58
PART II – PERSONAL CONTRIBUTION	59
CHAPTER 3. PURPOSE AND OBJECTIVES OF THE RESEARCH	61
CHAPTER 4. EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATIONS REGARDING PYODERMAS IN DOGS AND CATS IN THE NORTH-EAST REGION OF ROMANIA	63
4.1. Materials and methods	63
4.2. Results and discussions	70
4.2.1. Clinical aspects in the cases of dermatitis and otitis taken into study	70
4.2.2. Prevalence of pyodermas and of different etiological agents	75
4.3. Partial conclusions	77

CHAPTER 5. GENOTYPIC CHARACTERISATION OF STAPHYLOCOCCAL ISOLATED STRAINS AND STATISTICAL ANALYSIS	78
5.1. Materials and methods	78
5.2. Results and discussions.....	82
5.2.1. Genotypic identification of <i>S. aureus</i> and <i>S. pseudintermedius</i> strains	82
5.2.2. Genotypic characterisation of <i>S. aureus</i> and <i>S. pseudintermedius</i>	84
5.3. Statistical analysis.....	90
5.4. Partial conclusions	92
 CHAPTER 6. INITIATION OF ETIOTROPIC THERAPY IN STAPHYLOCOCCI IN DOGS AND CATS, AND PERSPECTIVES IN USING NEW ANTIBACTERIAL COMPOUNDS	 94
6.1. Materials and methods	94
6.2. Results and discussions.....	96
6.2.1. <i>In vitro</i> studies regarding the phenomenon of antibiotic resistance of <i>Staphylococcus spp.</i> strains isolated from pyodermas.....	96
6.2.2. MDR, XDR and PDR classification of <i>S. aureus</i> and <i>S. pseudintermedius</i> strains.....	104
6.2.3. <i>In vitro</i> testing of the antibacterial effect of water activated with cold plasma, therapeutic opportunities	107
6.3. Results and discussions.....	109
 CHAPTER 7. FINAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....	 112
 REFERENCES	 115
 ANNEX 1. ABBREVIATIONS LIST	 125
 ANNEX 2. LIST OF TABLES.....	 129
 ANNEX 3. LIST OF FIGURES.....	 133
 ANNEX 4. SCIENTIFIC PAPERS PUBLISHED	 135

INTRODUCERE

În dermatologia veterinară, suprainfectarea bacteriană reprezintă o complicație frecvent întâlnită. În cazul apariției unei piodermite primare sau secundare, instaurarea rapidă a unui tratament adecvat permite evitarea unor consecințe greu de gestionat: extinderea leziunilor, diseminarea germenilor (cu posibilitatea transmiterii la om) și/sau apariția recidivelor (Riegel ș.a., 2010).

Ne-am propus să abordăm această patologie dintr-o perspectivă etiologică, având în vedere, cel puțin, două aspecte. Primul aspect a fost cel al potențialului zoonotic, existând studii care raportează, de exemplu, incidența *S. aureus* MRSA mai mare în rândul personalului veterinar decât în alte medii (Kalii ș.a., 2014; Sing ș.a., 2008; Witte, 2007; Strommenger ș.a., 2005). Cel de-al doilea aspect face referire la terapie; piodermitele și otitele bacteriene fiind cu precădere „beneficiarele” antibioterapiei (Benea ș.a., 1998). Fenomenul antibioresistenței- mecanisme bacteriene de rezistență- au dus în timp la limitarea tot mai frecventă a obținerii terapiei cu această clasă de compuși. Identificarea cu precizie a agentului etiologic este o condiție *sine-qua-non* a instituirii unei antibioterapii corecte și eficace, atât din punct de vedere al alegerii antibioticului, cât și a duratei tratamentului (de exemplu, în cazul identificării *Nocardia spp* ca agent patogen, indicația terapeutică este de cel puțin 4 luni, până la 12 luni) (Sykes, 2014).

La nivel mondial există o asiduă preocupare privind, nu atât descoperirea de noi antibiotice cât, găsirea de alternative terapeutice; substanțe sau molecule din natură, semisinteză sau chiar sintetice; cum ar fi de exemplu nano peptide polimerice cu efecte antimicrobiene (Lam S.J., 2016) sau tratamente adjuvante cu noi substanțe, cum ar fi PAW (Heinlin ș.a., 2011).

În ceea ce privește terapia; abordarea atât din direcția agentului patogen cât și din cea a organismului gazdă impune: diagnosticarea și tratarea entității **patologice primare**; începerea **tratamentului piodermitei**, ținând cont de gravitate, dacă este primul puseu sau recidivantă/trenantă, starea generală a pacientului, vârsta, paramentrii hepato-renali (având în vedere hepato/nefro toxicitatea anumitor antibiotice), semnalarea eventualelor alergii la antibiotic, etc.; inițierea **tratamentului antipruriginos**, acolo unde este cazul, recunoscut fiind ca factor agravant al piodermitei (Miller, 2013); urmărirea **eradicării entității bacteriene** incriminate, atât din aria lezională cât și din zonele de portaj, pentru a se preveni reinfectarea; măsuri de **igienizare a habitatului** pacientului, a celorlalte animale cu care acesta vine în contact, pentru a preveni astfel recolonizarea bacteriană.

Aprofundarea cercetărilor din cadrul tezei de doctorat, până la nivel molecular, în ceea ce privește *Staphylococcus spp.* se datorează faptului că acesta reprezintă principalul agent patologic al piodermitelor și manifestă importante mecanisme de antibioresistență (MRSA, MRSP, MRSE, diferite forme de rezistență încrucișată și inductibilă) cu impact major asupra terapiei. Pe de altă parte, studii recente concluzionează că delta – toxina

stafilococică (DTS) identificată și studiată în cazul *S. aureus* - induce boala alergică de piele prin activarea mastocitelor (Nakamura ș.a., 2013). Concluzionăm cu faptul că deși piodermita la animalele de companie nu reprezintă o afecțiune gravă, letală, este important să fie corect diagnosticată pentru a avea și succes terapeutic. Sunt, în același timp, două condiții obligatorii pentru a putea stopa selectarea de tulpini bacteriene rezistente la antibiotice.

Cercetările desfășurate pe parcursul celor patru ani de doctorat nu ar fi fost duse la bun sfârșit fără aportul și sprijinul instituțional asigurat de conducerea Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară, căreia îi mulțumesc.

Sincere mulțumiri, conducătorului de doctorat, Prof.Univ.Dr. Vasile Vulpe. Vă sunt recunoscătoare, domnule profesor, pentru încrederea pe care mi-ați acordat-o, a fost factorul care m-a ajutat să duc lucrurile mai departe în momentele grele. Vă mulțumesc în același timp pentru deschiderea și viziunea pe care ați avut-o pentru abordarea interdisciplinară a temei propuse, chiar dacă părea puțin ciudat „atâta microbiologie” într-o teză de dermatologie. Vă sunt recunoscătoare pentru toată răbdarea, calmul și înțelegerea; calități umane care atunci când sunt completate de o solidă pregătire profesională și dăruire, duc la îndeplinirea tuturor obiectivelor.

Mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare și membrilor comisiei de doctorat, pentru sfaturile, informațiile furnizate pe parcursul anilor de studiu și pentru amabilitatea și disponibilitatea de a-mi fi analizat teza.

Vă mulțumesc domnule Profesor Mihai Mareș pentru îndrumarea în activitatea de laborator în (multele) zile și luni de testări.

Sincere mulțumiri doamnei Conferențiar Dorina Timofte, pentru disponibilitatea și generozitatea de a colabora și contribui substanțial la atingerea obiectivelor propuse.

Întregului colectiv al disciplinei de microbiologie, sub conducerea domnului Prof.Univ.Dr. Mihai Carp Cărare, îi mulțumesc pentru deschiderea de a colabora, logistica pusă la dispoziție, sfaturile și îndrumarea profesională și nu numai.

Mulțumiri întregii discipline de clinică medicală, sub conducerea domnului Prof.univ.dr. Gheorghe Solcan; doamnei doctor Mădălina Burlacu cu care am avut o excelentă colaborare pe partea de clinică, domnului Șef Lucrări dr. Mihai Musteață, pentru îndrumările pertinente, precum și domnilor doctori Dragoș Boghean, Ludovic Bacușcă, Cristina și Alexandru Șerban care, prin indicațiile de a efectua examene microbiologice, au „furnizat” o parte considerabilă din cazuistica luată în studiu.

Colegilor de birou, Andreea, Ioana, Oana le mulțumesc pentru susținerea, optimismul, tinerețea cu care m-au înconjurat toți acești ani.

Însumând toate cele spuse mai sus, gândurile de recunoștință se îndreaptă spre persoanele care cu iubire necondiționată m-au sprijinit și m-au susținut: părinții și sora mea! Dragostea și iubirea părintească nu se compară cu nimic, este fundamentul pe care cu liberul arbitru, poți clădi, poți construi. Cu simplitate și modestie, au acceptat și au dăruit totul, în perioada cea mai provocatoare din viața mea. Aceleași mulțumiri le adresez

și părinților mei spirituali, care mi-au insuflat credința în Dumnezeu, al căror îndemn permanent a fost: Irina, doar CREDE! Ai credință și mergi mai departe!

INTRODUCTION

In veterinary dermatology, bacterial superinfection is a commonly seen complication. In the case of occurrence of a primary or secondary pyoderma, rapid initiation of a proper treatment allows to avoid consequences that are difficult to manage: extension of lesions, dissemination of germs (with the possibility of transmission to humans) and/or occurrence of relapses (Riegel ș.a., 2010).

We aimed at approaching this pathology from an etiological perspective, considering at least two aspects. The first aspect was that of the zoonotic potential, as there are studies that report, for example, a higher incidence of *S. aureus* MRSA among the veterinary personnel than in other environments (Kalii *et al.*, 2014; Sing *et al.*, 2008; Witte, 2007; Strommenger *et al.*, 2005). The second aspect refers to therapy, pyodermas and bacterial otitis being particularly the “beneficiaries” of antibiotic therapy (Benea *et al.*, 1998). The phenomenon of antibiotic resistance – the bacterial resistance mechanisms – has led in time to the more and more frequent limitation of therapeutic options with this class of compounds. The precise identification of the etiological agent is a *sine-qua-non* condition of initiating a correct and efficient antibiotic therapy, both from the point of view of choosing the antibiotic, and from the point of view of duration of treatment (for example, in the case of identifying *Nocardia spp.* as a pathogenic agent, the therapeutic indication is at least 4 months, and up to 12 months) (Sykes, 2014).

At the world-wide level, there is a relentless concern not with discovering new antibiotics, but with finding therapeutic alternatives, substances or molecules from the nature, semi-synthetic or synthetic, such as, for example, polymeric nano peptides with antimicrobial effects (Lam S.J., 2016) or adjuvant treatments with new substances, such as PAW (Heinlin *et al.*, 2011).

In regard to therapy, approaching integrative strategies: “aggressor-aggressed”, which attack the condition both from the direction of the pathogenic agent, and from that of the host organism, requires: diagnosis and treating the **primary pathological** entity; starting **treatment of pyoderma** considering the seriousness, whether it is the first flare or whether it is relapsed/chronic, the patient’s general state, age, hepatic and renal parameters (considering the hepato/nephrotoxicity of certain antibiotics), signalling possible allergies to the antibiotic etc.; initiating **anti-pruriginous treatment**, where applicable, being recognised as a worsening factor of pyoderma (Miller, 2013); aiming at **eradicating the incriminating bacterial entity**, both from the lesioned area, and from the carriage areas, in order to prevent re-infection; measures to **sanitize the habitat** of the patient and of the other animals with whom it comes into contact, in order to prevent bacterial re-colonization.

Fathoming the research from the doctoral thesis, up to the molecular level, in regard to *Staphylococcus spp.*, is due to the fact that it represents the main pathological

agent of pyoderma, and it manifests significant mechanisms of antibiotic resistance (MRSA, MRSP, MRSE, various forms of cross and inducible resistance) with a major impact on the therapy. On the other hand, recent studies concluded that the staphylococcal delta-toxin (SDT) – identified and studied in the case of *S. aureus* – causes the allergic skin disease by activating the mastocytes (Nakamura *et al.*, 2013).

We conclude that, although pyoderma in pets does not represent a serious, lethal condition, it is important for it to be correctly diagnosed in order to have therapeutic success. At the same time, there are two mandatory conditions to be able to stop the selection of bacterial strains resistant to antibiotics.

The research carried out during the four years of doctoral stage would not have been accomplished without the institutional input and support ensured by the board of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine to which I would like to thank.

Special thanks to my doctoral thesis advisor, Univ. Prof. Dr Vasile Vulpe. I am sincerely grateful to you, Mr professor, for the trust that you gave me. It was one of the stimuli that helped me continue during difficult times. At the same time, I would like to thank you for the openness and vision that you had in approaching the proposed interdisciplinary subject, even if “so much microbiology” in a dermatology thesis seemed a bit strange. I am grateful for all of your patience, calm and understanding; they are human qualities that, when completed by a strong professional training and commitment, lead to achieving all objectives.

I am also grateful to the members of the guiding committee and the members of the doctoral committee for the guidance during the years of study and for their kindness and availability to analyse my thesis.

I would thank Mr Professor Mihai Mareş for his entire collaboration, from the first discussions about the subject and sketching the research directions, to the actual collaboration in the laboratory on the (many) days and months of tests.

Special thanks to Associate Prof. Dorina Timofte for her availability and generosity to collaborate and substantially contribute to reaching the proposed objectives.

The entire college of microbiology, led by Prof.Univ.Dr. Mihai Carp Path, thank you for the openness to collaborate, the logistics provided, the professional advice and guidance and not only.

Thanks to the whole discipline of the medical clinic, under the leadership of Mr. Prof.univ.dr. Gheorghe Solcan; Dr. Mădălina Burlacu, with whom we had an excellent collaboration on the part of the clinic, Dr. Mihai Musteață, for the relevant guidance, as well as the doctors Dr. Dragoş Boghean, Ludovic Bacușcă, Cristina and Alexandru Șerban who, through the instructions to perform microbiological examinations, "provided "a considerable part of the case study taken.

The office colleagues, Andreea, Oana, Ioana, thank them for the support, the optimism, the youth they have surrounded me all these years.

Counting all the above, thoughts of gratitude go to the people who unconditionally loved me and supported me, my parents and sister! Parental love do not compare to anything, it is the foundation that you can build. With simplicity and modesty, they have accepted and given everything in the most challenging period of my life. I also give the same thanks to my spiritual parents, who have inspired my faith in God; whose permanent urge was: Irina, just BELIEVE! Have faith and go on!

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, rezistența la unele antibiotice și antiseptice; producerea de biofilm
- 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 piodermitele 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, parazitară 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, cea mai mare parte a bolilor primare a fost reprezentată de dermatita atopică; iar două suspiciuni de Cushing au fost 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 streptococi, 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 antibioză, 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 antibioză rezistente 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 descuamări 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 din prima categorie 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 testate 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 „purtaătoare” 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 etiotrope 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 piodermitele 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 metilino-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 tetraciclonele. 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 capitoului 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 capitoului 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 Sensibilității 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/cefotixin, 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, în cazul prezenței rezistenței la încă un antibiotic. 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 metilicilină 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 (H_2O_2), nitrat (NO_3) și nitrit (NO_2), O_3 , 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 capsulei, 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.

ABSTRACT

The doctoral thesis entitled “Studies Regarding the Laboratory Diagnosis, Classical and Non-conventional Therapy of Dermatitis with Bacterial Substrate in Dogs and Cats” consists of 136 pages and, according to standard practices, it is structured in two parts. Information regarding the current stage of knowledge is synthesised in the first part, and the results regarding our own research on the approached subject are presented in the second part. We aimed at approaching the pathology researched from an etiological perspective, a more thorough knowledge of the etiological agents bringing important and relevant information both in the diagnosis and in the therapy of pyodermas.

The first part, comprising of a total number of 28 pages, synthetically presents current information regarding the etiopathogenesis of pyoderma in pet carnivores, and the diagnosis and therapeutic management of pyodermas in dogs and cats.

The second part of the thesis, comprising of a total of 108 pages, presents the results of our own research, and it is structured in 4 chapters. Starting from the purpose and proposed objectives, we presented the results of the epidemiological investigations regarding pyodermas in pets, cats and dogs, then the research is focused on the main etiological agent, *Staphylococcus spp.* In each chapter, the used materials and methods are described, and the results and discussions related to them are presented, as well as the resulting partial conclusions.

In the paper, there are 56 figures and 33 tables, and the thesis was documented with a total of 164 references.

Chapter III – “Purpose and objectives of the research”. The arguments regarding the opportunity and importance of the research refer to two aspects: the zoonotic and anthroponotic risk of staphylococci and not only, as well as the more and more significant limitation of treatment with antibiotics due to the antibiotic resistance phenomenon. The purpose of the proposed subject was to bring an analytical contribution to the diagnosis and therapy of pyodermas in pets, and to fathom the studies up to molecular level in regard to *Staphylococcus aureus* and *pseudintermedius*, by presenting data useful both in guiding the diagnosis and particularly in initiating etiotropic therapy, as well as by presenting data regarding new therapeutic perspectives with the so-called “non-conventional” substances.

The main objectives of the research were:

- determining the prevalence of pyodermas in dermatitis in dogs and cats;
- determining the prevalence of etiological agents in pyodermas by isolating and phenotypically identifying them;
- molecularly confirming the identification of *S.aureus* and *S.pseudintermedius* species;

- genotypically characterising *S.aureus* and *S.pseudintermedius* in regard to some virulence genes and the resistance to some antibiotics;
- determining the prevalence of MRSA and MRSP strains;
- molecularly confirming the methicillin resistance of strains that are phenotypically classified as MRSA and MRSP;
- *in vitro* assessing the sensitivity of the staphylococcal isolated strains to different classes of antibiotics;
- *in vitro* testing of the antibacterial effect of PAW;
- statistical analysis.

Chapter IV – “Epidemiological investigations regarding pyoderms in dogs and cats in the north-east region of Romania”. The casuistry was represented by a number of 163 patients, 98 dogs and 65 cats from the county of Iași and localities neighbouring the county of Iași. In the first phase, we aimed at classifying dermatitis from a clinical point of view, in superficial dermatitis, deep dermatitis and otitis externa, as well as from an etiological point of view, in mycotic, parasitic and bacterial dermatitis. The association of mycotic and parasitic dermatitis (including otitis) with bacterial dermatitis was noticed in a percentage of approximately 60% in the first case, and approximately 30% in the second case, the higher levels being registered in the case of otitis. After eliminating from the researched batch the cases that no longer had bacterial etiology, the investigations continued in parallel, from a clinical and microbiological point of view. Following thorough anamnesis, in the cases where the suspicion of primary diseases arose, specific investigations were carried out. Four cases of hypothyroidism were confirmed, two suspicions of Cushing being ruled out.

From a microbiological point of view, the phenotypic tests have identified, from the total of 121 pyoderms, 85 cases with staphylococcal etiology, 17 infections with *Pseudomonas spp.*, 15 cases of streptococci, 2 nocardioses, 2 cases of skin infection with *Mycobacterium spp.*, and infections, namely otitis externa, associated with *Proteus spp.* Phenotypic tests were subsequently focused on *Staphylococcus spp.*, the etiological agent with the highest prevalence in bacterial dermatitis. By phenotypic tests, the following were identified: 36 strains of *S. aureus*, 21 strains of *S. pseudintermedius*, and 28 strains were classified in the group “other” staphylococci. Considering the importance of the antibiotic resistance phenomenon, the methicillin resistance was phenotypically tested for the classification in the MRSA.

Of the total of 36 strains of *S. aureus*, 21 were identified as methicillin-resistant (58.33%). We must highlight that almost half of the owners came for laboratory tests after the patients received one, two or even more antibiotics, as first-line treatment. It is the method by which antibiotic-resistant bacterial strains are selected, which in the end also affects human health, which is natural considering the cohabitation that is so tight between the human and his pet. Phenotypic tests have included pathogenesis tests such as haemolysis and the presence of coagulase. Pathogenesis tests showed that 14 isolated strains of *Staphylococcus spp.* did not have haemolysis and came from cases of superficial

dermatitis, with a faded clinical picture: mild alopecia, erythema, mild desquamation of the tegument. Of the 85 coagulase-positive strains, 19 strains coagulated rabbit plasma within 4 hours, and the rest within 24 hours. This result was correlated with the clinical picture and it has been noticed that the strains came from patients who had purulent material or purulent exudates/ulcerations/fistula.

In chapter V – “Genotypic characterisation of staphylococcal isolated strains and statistical analysis” – the research was fathomed with molecular epidemiology studies on the isolated strains of *S. aureus* și *S. pseudintermedius*. For the genotypic identification, 83 strains of *Staphylococcus spp.* have been selected. PCR identification of species of staphylococci isolated from pyodermas has confirmed that *S. pseudintermedius* is the main etiological agent in pyodermas in dogs; in cats, *S. aureus* was identified in a percentage of 91.30%. In regard to otitis, genetic identification of *Staphylococcus spp.* was the following: 10 strains of *S. aureus*, 3 strains of other species, and no strain of *S. pseudintermedius*. For the genetic characterisation of the staphylococcal isolated strains, tests were made on a number of 76 strains of *Staphylococcus spp.* They came from 64 cases of dermatitis and 12 strains of otitis externa.

Genetic characterisation of staphylococcal isolated strains aimed at identifying sets of genes that codify: resistance to antibiotics (*mecA*, *mecC*, *mup*, *fusB*, *fusC*, *fusD*), resistance to antiseptics (*smr*, *qacA/B*), virulence genes (*lukS*, *lukF*, *siet*, *sec_{canine}*, *expA/B*, *PVL*), and formation of biofilm (*icaA*, *icaD*, *bap*).

From a clinical point of view of the aspect of the lesional picture, identification of virulence genes is relevant because: *Luk S* and *Luk F* – present in *S. pseudintermedius* – codify a leukotoxin, similar to PVL produced by *S. aureus* (Futagawa S., et al., 2009), with cytotoxic effect by creating pores in the membrane of the target cells (Guillet V., et al., 2004); *PVL* – extremely virulent exotoxin, characteristic to *S. aureus*, it transforms the host tissues into nutrients necessary for bacterial growth and development (Melles DC., et al., 2006); *Siet*, *exp A* and *exp B* are genes that codify the production of exfoliative toxins, the presence of *siet* being significantly associated from a statistic point of view with skin infections (Ruzauskas M., et al., 2016); *Sec_{canine}* codifies the enterotoxicity of staphylococci, but it has also been identified in strains of *Staphylococcus* isolated from animals from different pathologies, with the ability to cause vomiting and proliferation of T cells. Identification of these genes in strains of *S. pseudintermedius* confirms their enteropathogenic potential (Garbacz K., et al., 2013).

The analysis of the 4 big categories of genes showed that the virulence factors had the biggest impact on the pathogenic mechanism. It has been noticed that in the case of skin infections, in the 44 strains “carrier” of virulence genes, no less than 145 genes have been identified. 16 strains with 4 virulence genes each, 26 strains with 3 virulence genes each and 3 strains with a single gene that codifies virulence factors have been identified. Thus, at the molecular level, the aggressiveness of strains of *Staphylococcus spp.* isolated from pyodermas has been confirmed.

From the point of view of treatment with antiseptics, antibiotics and formation of biofilm (as a form of resistance to antibiotic therapy), we noticed that 83.2% of the strains isolated from otitis had genes from these three categories, specifying that more than half of this percentage comes from the group of genes that codify the formation of biofilm, and in the case of pyoderma the percentage was 37.4. The obtained results explain, at least in part, the therapeutic failures and relapses; also, they argue the need of further research in finding new therapeutic solutions.

Chapter VI – “Initiation of etiotropic therapy in staphylococci in dogs and cats, and perspectives in using new antibacterial compounds” – presents the research focused on the resistance profiles of staphylococcal strains, their classification in MDR, XDR and PDR, and *in vitro* testing of the antibacterial effect of PAW as a therapeutic perspective.

In the first part of these tests, we aimed at establishing the sensitivity/resistance profile to antibiotics, essential in properly choosing the first-line treatment. This is required all the more so since, many a times, due to objective reasons (lack of a microbiology laboratory near the veterinary practice) or subjective reasons (which are related to the owner), the first-line antibiotic therapy is not followed by a bacteriological examination and an antibiogram. It is one of the reasons of developing antibiotic resistance, which hinders the effort of clinicians to treat pyoderma in pets. A therapeutic alternative is the concept of “rotating” the antibiotics in order to try reducing the pressure of screening resistant strains and extending the duration of action of the compounds. Practically, this involves regularly replacing first-line antibiotics with other classes of compounds (Masterton, 2005).

The tests were carried out on a batch of 85 strains of *Staphylococcus spp.* coming from 61 dogs and 24 cats with pyoderma and otitis externa. From the anamnesis, it resulted that 55 patients (64.7%) benefited from antibiotic therapy prior to collection of samples for the bacteriological examination and antibiogram; 9 owners (10.5%) stated that they did not give antibiotic, and for 21 cases (24.7%), this information did not exist. Methicillin resistance (MRSA) was confirmed in a percentage of 32.3 strains of *S. aureus*, which increased the resistance to beta-lactam antibiotics in a percentage of 64.7% for AMC, 76.4% for AX, and 64.7% for AML.

Another form of identified resistance was the inducible resistance to clindamycin in 13 tested strains (15.29%). Such strains are reported as resistant to all lincosamides and macrolides, being strains carrier of the *erm*. resistance gene (Andrews *et al.*, 2011; Lewis *et al.*, 2005). The results of testing of strains of *Staphylococcus spp.* in the 11 classes of antibiotics showed that the first three classes of antibiotics in which the tested strains had the highest percentages of resistance were the penicillins, followed by polypeptides and tetracyclines. The results are in correlation with the most used antibiotics that are found in the topical-use products, but also in the first-line antibiotics used in the area from where the cases came. The classes of antibiotics where the tested strains had a high percentage of sensitivity proved to be rifampicins, quinolones and chloramphenicols. We believe that an interesting aspect is the resistance to fusidic acid (11.76%) – phenotypically detected and

genotypically confirmed (13.1%), given that from the performed anamnesis it resulted that none of the patients was treated with this antibiotic. This aspect can be a confirmation of the circulation of strains in nature, or it might be about a possible cross-resistance (O'Neill *et al.*, 2002). Also in the first part of chapter VI, due to the studies carried out at the Faculty of Veterinary Medicine Iași în 1998 by Prof. Solcan, within his doctoral thesis, we were able to follow the evolution of antibiotic resistance in 13 antibiotics. Thus, we noticed that the highest percentage increases of antibiotic resistance were in the case of Amoxicillin + clavulanic acid (from 0 to 60), followed by Amoxicillin / Polymyxin (from 0 to 57.64), and Neomycin (from 0 to 51.76).

In the second part of chapter VI we presented the results regarding the classification in MDR, XDR and PDR. By initiative of the European Centre for Disease Prevention and Control, an internationally standardised terminology has been created where the resistance profiles acquired by several bacteria, among which there is also *S. aureus*, are described. The lists with the classes of antibiotics proposed for testing the resistance profile have been created and made available by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the European

According to Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the Food and Drug Administration (FDA) from the United States of America, the definitions for MDR, XDR and PDR are: **MDR** – isolated strains resistant to **at least one antimicrobial agent of at least three classes** of antibiotics; **XDR** has been defined as the resistance to **at least one agent of all classes, except no more than two classes** to which it has total sensitivity; **PDR** are the isolated strains resistant to **all agents, of all classes** of antibiotics.

Following these definitions, we must highlight that: all MRSA isolated strains are considered from the beginning MDR because the resistance to oxacillin/cefoxitin causes the resistance to all existing beta-lactam antibiotics. Similarly, resistance to clindamycin is reported as resistance to all lincosamides (lincomycin) and macrolides (clindamycin, spiramycin, clarithromycin, azithromycin, roxithromycin), the isolated strains being classified as MDR.

The list of classes and used antimicrobial agents is a rough guide; by representing just a guide, it can be adapted and must be completed as new substances become available for therapy (Magiorakos *et al.*, 2012). In our research, we adapted some antibiotics with the ones used in the geographical area included in the study. Testing the sensitivity/resistance profile in the 11 classes of antibiotics has proved that, of the 85 strains of *Staphylococcus spp.* coming from pyoderms in pets (dogs and cats), 22 strains had sensitivity to all tested classes (with resistance to no more than one antibiotic of no more than two classes), 61 strains can be classified as MDR, having resistance to at least one antimicrobial agent of at least three classes of antibiotics, and 2 strains had resistance to at least one antibiotic of all classes (except for two), classifying as XDR. No PDR strain has been detected.

The last study of our research focused on the *in vitro* antibacterial effect of PAW, its use in dermatology representing a viable solution in regard to mechanisms of resistance to antiseptics and disinfectants. The adaptive mechanisms and the resistance of bacteria to antiseptics and disinfectants are well-known, resistance being a natural (intrinsic) property or an acquired property due to mutation or acquisition of plasmids (self-replicating DNA and extrachromosomal DNA) or transposons (chromosome transposons or integration plasmids) (McDonnell *et al.*, 1999; Grundmann *et al.*, 2006). In the world-wide fight against staphylococcal skin infections, a special case is the methicillin-resistant staphylococcus, which is considered a global threat (Grundmann *et al.*, 2006), the development of alternative topical treatments being beneficial.

Water that is activated with cold plasma acquires an acid pH and contains, among other groups: hydrogen peroxide (H₂O₂), nitrate (NO₃), nitrite (NO₂) and anion, responsible for the degradation of the bacterial wall, through an oxidative effect on the proteins, lipids and DNA (Oehmigen *et al.*, 2010; Brisset *et al.*, 2012).

The efficacy of inactivation by using this method depends on abiotic factors (temperature, hardness of water, quantity of organic substances and nutrients for the bacterium) and biotic factors (structure of the cellular wall, presence or absence of capsules, ability to sporulate) (Naitali *et al.*, 2010; Kamgang-Youbi *et al.*, 2008). Previous studies show that the antimicrobial action of PAW increases in the following, in this order: yeast, gram-positive bacteria and gram-negative bacteria (Kamgang Youbi *et al.*, 2009; Ursache *et al.*, 2014).

The tests were carried out on samples that had the initial bacterial load between 4.78×10^8 and 8.3×10^{10} . In the 3-minute treatment of strains with PAW, the reduction levels varied from 0 to 7.38 with an average of 5 log, and in the 10-minute treatment the minimum and maximum reduction was 4.99 and 9 respectively, with an average of 6,99 log. Considering that the bacterial loads higher than 10^5 CFU/tissue correspond to infection, and for bacteria such as beta-haemolytic streptococci, *S. aureus* and *P. aeruginosa* much lower loads are sufficient, we believe that the results of the reduction obtained *in vitro* are conclusive for the use of PAW as antimicrobial agent (Heinlin *et al.*, 2011).

In chapter VII – “Final conclusions and recommendations” – 26 conclusions are synthesised, which represent conclusive aspects of the research, and a few recommendations arising from the obtained results are issued.

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII
PART I – THE PRESENT STAGE OF KNOWLEDGE

CAPITOLUL 1. ETIOPATOGENIA PIODERMITEI LA CARNIVORELE DE COMPANIE

CHAPTER 1. ETIOPATHOGENESIS OF PYODERMA IN PET CARNIVORES

1.1. Pielea și microbiota cutanată

Pielea, cel mai mare organ al corpului îndeplinește un rol esențial în menținerea stării de sănătate prin funcțiile deținute: reglarea temperaturii, depozitarea de vitamine, electroliți, apă, grăsime, glucide, proteine; prevenirea pierderii de apă și electroliți, protecția mecanică împotriva agenților fizici, chimici, microbieni, perceperea senzațiilor de cald-rece, presiune, durere, producția de fanere, vitamina D, melanină, comunicarea stării de sănătate și identității sexuale etc. (Paterson, 2008).

În structura pielii, reprezentată de cele trei straturi principale (fig.1.1.), sunt adăpostite și/sau își au originea anexele pielii (glande, păr, fanere), terminațiile nervoase încapsulate, anastomozele arterio-venoase, toate reprezentând baza anatomică și structurală a funcțiilor menționate mai sus.

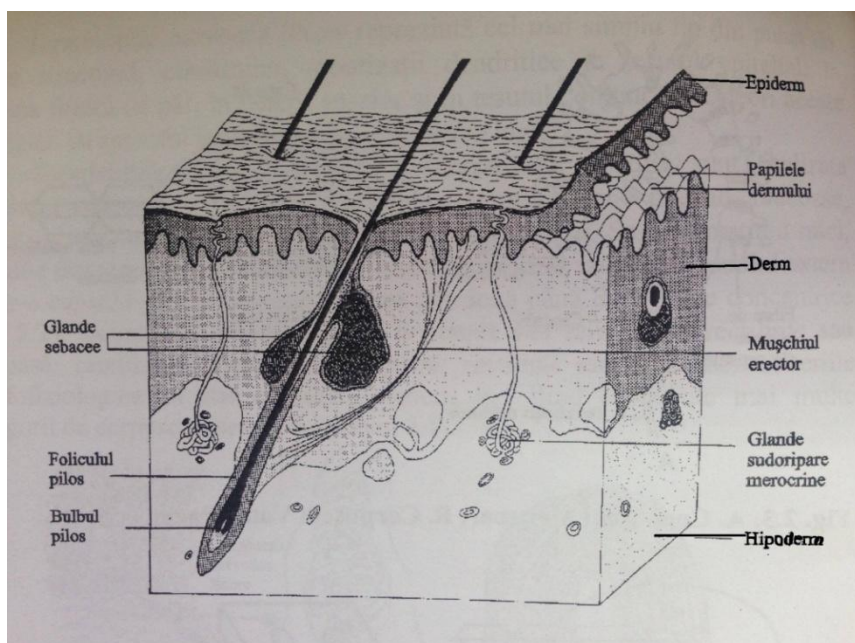


Fig.1.1. Structura pielii (Cotea, 2003)

Fig.1.1. Skin structure (Cotea, 2003)

Pielea reprezintă o interfață esențială pentru păstrarea homeostaziei organismului. Ea are propriul microclimat, populațiile microbiene variind în funcție de compoziția chimică și parametrii fizici ai habitatelor cutanate precum și interacțiunile complexe dintre

acestea. Aceste populații microbiene sunt controlate permanent de mecanismele imune înăscute ale gazdei, iar când acestea sunt deficitare, sau microhabitatul cutanat se modifică, unele bacterii și levuri pot provoca boli. Un rol important al acestei microbiote cutanate este acela de a controla și preveni colonizarea cu microorganisme exterioare, patogene.

Fără a intra în detaliile histologice ale țesutului cutanat, subliniem că tot complexul structural al acestuia, prin moleculele produse/secretate - keratina, melanina, sebumul, cerumenul, sudoarea etc - asigură o condiție chimică de care depinde sănătatea pielii.

În ceea ce privește funcția de protecție a pielii, ca o barieră anatomică mecanică și chimică esențială, este cunoscut și evidențiem rolul deosebit al keranocitelor și procesul de keratinizare, corneocitelor (keratinocite mature), importante pentru tema abordată (Cotea, 2003).

Keranocitele îndeplinesc un puternic rol antimicrobian prin substanțele eliberate, dintre care cele mai recent recunoscute sunt peptidele beta-defensin și elafin (Lloyd, 2008). Pe de altă parte, prezența populației bacteriene pe piele este determinată de capacitatea acestora de a adera la keranocitele mature (corneocite); gradul de „încărcare” bacteriană depinzând și de factorii biochimici ai pielii cum ar fi pH-ul, salinitatea, natura lipidelor și a proteinelor (incluzând imunoglobulinele, complementul, transferina) (Matousek, 2002).

După Bensenor (2008), flora bacteriană care formează microbiota cutanată a fost grupată în:

Floră rezidentă – bacterii care se găsesc în permanență pe suprafața pielii și se multiplică în nișe ecologice naturale;

Floră tranzitorie – comensală, se regăsesc ocazional, în cantitate și timp limitat pe suprafața pielii;

Floră nomadă - bacterii care nu se pot stabili și multiplica pe piele.

Screeningurile pentru identificarea populațiilor bacteriene la câine și pisică au avut în vedere atât suprafața pielii cât și infundibulul foliculului pilos, constatându-se predominanța bacteriilor gram pozitive (Miller ș.a., 2013; Paterson, 2008).

Tabelul 1.1./Table 1.1.

Microbiota bacteriană cutanată la câine și pisică (după Miller, 2008)**Bacterial microbiota skin in dogs and cats**

MICROBIOTĂ CUTANATĂ CÂINE			MICROBIOTĂ CUTANATĂ PISICĂ		
Rezidentă		Tranzitorie	Rezidentă		Tranzitorie
<i>Micrococcus</i>	<i>spp.</i>	<i>E.Coli</i> ,	<i>Micrococcus</i>	<i>spp.</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Staphylococcus</i>		<i>Proteus mirabilis</i> ,	<i>Staphylococcus</i>	<i>spp.</i>	<i>hemolytic</i> ,
<i>coagulazo negativ</i> ,		<i>Pseudomonas</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>grup D</i> ,	<i>E.Coli</i> ,
<i>Streptococcus grup D</i> ,		<i>Corynebacterium</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>spp.</i> ,	<i>Proteus mirabilis</i> ,
<i>Clostridium</i>	<i>spp.</i> ,	<i>Bacillus</i>			<i>Pseudomonas</i>
<i>Propionibacterium</i>		<i>Staphylococcus</i>			<i>Alcaligenes</i>
<i>acnes</i> ,	<i>Acinetobacter</i>	<i>coagulazo-pozitiv</i>			<i>Bacillus</i>
<i>spp</i> ,	<i>Bacillus</i>				<i>Staphylococcus</i>
<i>spp</i>					<i>spp.(excepție</i>
					<i>S.simulans)</i>

La animalele de companie apare o contaminare cutanată din alte situsuri (gură, zona anală) în special din cauza linsului și mai frecvent la pisică. *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* spp, *Actinomyces* spp., *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., se regăsesc în flora bucală a pisicii, iar suplimentar, prin contaminarea fecaloidă la câini și pisici s-au identificat *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp.(Miller ș.a., 2013, Paterson, 2008; Kil, 2014).

1.2. Agenții etiologici ai piodermitelor

Principalul agent patogen al piodermitelor la câine este *Staphylococcus pseudintermedius*. Considerat a fi un rezident la nivelul mucoaselor, mai ales nazală, anală, tractul genital, se însămânțează pe piele prin manipularea fiziologică sau alte activități. În mod obișnuit, infecția dermică cu *Staphylococcus* apare pe un teren patologic preexistent. Din piodermitele profunde pot fi izolate bacterii nerezidente: *Pseudomonas* spp., *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp., și *Micobacterium* spp.(Guaguere ș.a., 2004).

Incidența agenților etiologici bacterieni responsabili de piodermite este - în ordine descrescătoare : *Staphylococcus pseudintermedius*, *S. aureus*, *S. hycus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *Streptococcus* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Echerichia coli*, etc.(Miller ș.a., 2013).

La pisică, infecțiile bacteriene ale pielii sunt mai rare; cele mai comune sunt abcesele subcutanate cauzate frecvent de mușcături sau înțepături profunde. Agentul patogen primar în piodermitele superficiale este *S.intermedius*. În piodermitele profunde sunt izolate diferite bacterii aerobe și anaerobe, inclusiv *Pasteurella multocida*, *Streptococcus beta-hemolytic*, *Actinomyces* spp., *Bacteroides* spp., și *Fusobacterium* spp. (Paterson S., 2008). La pisici, piodermitele recurente pot fi adeseori asociate cu alte procese patologice primare cum ar fi anomalii metabolice sau imunologice (virusul

imunodeficienței feline, virusul leucemiei feline, micobacterii atipice, etc.) (Moriello, 2017).

1.3. Factori de patogenitate bacteriană

Patogenitatea bacteriană se manifestă prin: virulență, invazivitate, agresivitate, toxicitate.

GENUL *STAPHYLOCOCCUS* – Patogenitatea acestora se manifestă prin intermediul virulenței și toxicității.

- **Factorii de agresivitate-invazivitate** sunt reprezentați de enzimele extracelulare care, favorizează difuzia stafilococilor în țesuturi sau neutralizează mecanismele de apărare ale gazdei. Principalele enzime extracelulare sunt:

- ❖ **Proteina A** – prezentă în peretele celular, are o acțiune antifagocitară, anticomplementară, determină liza trombocitelor și induce starea de alergie. Este prezentă la 90% din tulpinile de *S.aureus*, iar la alte specii de stafilococi patogeni a fost detectată în proporție de 30%. Această proteină se atașează la moleculele de IgG, anulând astfel opsonizarea și implicit fagocitoza (*Affinity Chromatography*, 2016; Răpunțean ș.a., 2015).

- ❖ **Hemolizinele** – din punct de vedere antigenic sunt patru tipuri; tulpinile de stafilococ patogene pentru om produc alfa și beta toxina, iar cele patogene pentru animale produc alfa, beta și delta toxina. Alfa toxinele, pe lângă acțiunea hemolitică, au și acțiune dermonecrotică, leucolitică, trombocitotoxică și letală. Alfa toxina acționează prin fixarea pe hematii, eliminarea ionilor de K, a hemoglobinei, urmată de liză. Beta-hemolizina este o sfingomielinază care acționează asupra sfingomielinei din membrana eritrocitelor. Caracteristică este producerea unei hemolize “cald-rece”, toxicitatea fiind mai redusă comparativ cu alte hemolizine. Delta hemolizina este elaborată condiționat în admosfera de dioxid de carbon; prezintă acțiune hemolitică și leucolitică, fiind produsă de tulpini de *S.aureus*, *S.epidermidis* și *S.lungunensis* (Ryan ș.a., 2003; Carp-Cărare C., 2014; Răpunțean ș.a., 2015). Studii recente (Nakamura ș.a., 2013) au demonstrat faptul că această toxină este inductor de degranulare a mastocitelor, activitate ce depinde de fosfoinozitol 3 kinaza și de influxul de calciu. Studiul sugerează o legătură mecanică între colonizarea cu *S.aureus* și boala alergică de piele.

- ❖ **Coagulazele** – sunt proteine care coagulează plasma (similar plasmatic cu protrombina), acțiune prin care se blochează accesul în exsudatul inflamator, a leucocitelor și a factorilor bactericizi din plasma extravazată. Prin același mecanism este susținută agregarea, supraviețuirea și persistența bacteriei în interiorul rețelei de fibrină (Loof ș.a., 2015). Două noi exoenzime stafilococice, coagulaza Coa și vWbp, promovează aceleași modificări ale cascadei de coagulare; dovezi preclinice sugerează că inactivarea coagulazelor stafilococice ar putea fi o strategie importantă în prevenirea patogenității

(McAdow ș.a., 2012). Coagulaza stafilococică stimulează producerea anticorpilor specifici (Carp-Cărare C., 2014; Răpunțean ș.a., 2015).

- Hialuronidaza (factorul de difuzie)– enzima care descompune acidul hialuronic din substanța fundamentală a țesutului conjunctiv favorizând astfel difuzarea germenilor. Stafilococii patogeni produc în proporție de 90% hialuronidaza, agresină care își diminuează acțiunea după instalarea reacției inflamatorii din focarul infecțios (Hirs ș.a., 2004). În prezent este studiat potențialul de utilizare a acestei enzime în diverse domenii medicale (Ahmed, 2014).

- Fibrinolizina (stafilokinaza)– enzima proteolitică cantonată în exsudatul inflamator din țesutul invadat prin lizarea rețelei de fibrină, lucru care permite difuzarea stafilococilor în țesutul sănătos. Este o enzimă similară streptokinazei, cu același mecanism de acțiune în dizolvarea coagurilor de fibrină: prin legarea de alfa₂-defensine și plasminogen, se formează o plasmină activă cu importantă activitate proteolitică (Bokarewa ș.a., 2005).

- Dezoxiribonucleaza (termonucleaza)– enzimă termorezistentă care acționează asupra AND-ului și ARN-ului din celulele diferitelor țesuturi; până la 95% din tulpinile coagulazo- pozitive elaborează această enzimă.

- Fosfataza– enzima capabilă să coboare pH-ul la locul infecției, este prezentă în special la tulpinile izolate din alimente.

- Lipazele– acționează prin descompunerea lipidelor plasmatică și tegumentară, ceea ce explică tropismul stafilococilor îndeosebi față de piele, unde glandele sebacee sunt mai active. Pe de altă parte, lipazele stafilococice sunt studiate pentru diferitele aplicații în biotehnologie: detergenți, biopolimeri, ester, antioxidanți, industria alimentară (Horehani ș.a., 2012).

- Beta-lactamaza – enzimă ce conferă rezistență la antibioticele β -lactamice (clasa penicilinelor, cefalosporinele, carbapenemi, monobactami, tribactami) (Bush ș.a., 2010). Excluzând rezistența la produsele antimicrobiene de sinteză și semisinteză conferite de aceste beta lactamaze, studii recente pun în evidență rezistența, indusă de acestea, la peptidele antimicrobiene, componente fundamentale ale imunității înăscute la mamifere (Morgan ș.a., 2015).

- **Factorii de toxicitate** au o structură proteică, posedă proprietăți antigenice, produc alterări morfologice și funcționale ale țesuturilor. Sunt reprezentați în principal de:

- ❖ Enterotoxinele – din punct de vedere chimic sunt proteine simple, formate dintr-un singur lanț polipeptidic în care predomină lizina, asparagina, acidul glutamic și tirozina, proteine cu importanță în patologia digestivă. Speciile sensibile la aceste toxine sunt omul, pisica și maimuța (Carp Cărare C., 2015).

- ❖ Toxina epidermolitică și exfoliantă – prezintă tropism pentru țesutul conjunctiv subcutanat; distruge cementul intercelular cu desprinderea straturilor superioare ale epidermului. Provoacă dermatita exudativă a purceilor, pemfigusul neonatal, necroliza epidermică toxică (Perianu, 2011; Mishra ș.a., 2016).

❖ Leucocidinele – determină distrugerea leucocitelor; formată din două subunități distincte electroforetic, una termostabilă și cealaltă termolabilă, puternic antigenice, activitatea acestora fiind inhibată de anticorpii specifici. Aceste leucocidine intră în grupul exotoxinelor, PVL fiind componentă importantă a mecanismului de virulență a speciei *S.aureus* prin transformarea țesutului gazdă în nutrienți necesari pentru creșterea bacteriilor (Holmes, 2005). *S. pseudintermedius* produce o leucotoxină similară, cu același efect citotoxic prin crearea de pori în membrana celulelor țintă (Futagawa ș.a., 2009, Guillet ș.a., 2004).

GENUL STREPTOCOCCUS- Streptococii patogeni acționează prin virulență și toxicitate (Tankeshwar, 2016).

1. Virulența este dată de: factorii de structură, proteina M, agresine eliberate extracelular, capsula de acid hialuronic, cu rol antifagocitar

2.Toxicitate. Principalele toxine sunt reprezentate de:

Streptolizina “O” – proteina oxigen labilă, determină elaborarea de antisteprolizina “O”(ASLO) în organism.

Streptolizina “S” este o proteină stabilă la oxigen, slab antigenică.

Eritrotoxina streptococică (toxina Dick) – proteină foarte antigenică, determină apariția de antitoxină și imunizare.

Streptochinaza (fibrinolizina)- transformă plasminogenul din serul normal în plasmă activă proteolitic, care lizează cheagurile de fibrină și alte proteine favorizând astfel extinderea infecției. Este antigenică, producând antistreptochinaza.

Hialuronidaza– lizează acidul hialuronic din țesutul subconjunctiv, favorizând astfel difuzia germenilor în țesuturi și organe.

Dezoxiribonucleaza (streptodornaza)– enzima care depolimerizează ADN-ul rezultat din dezintegrarea leucocitelor.

GENUL PSEUDOMONAS- Factorii de patogenitate ai *P.aeruginosa* sunt structuri somatice sau produse extracelulare. Bacilul piocianic este o bacterie condiționat patogenă, cu efecte dezastruoase în bolile pulmonare (fibroza chistică, BPOC). Produsele extracelulare eliberate sunt reprezentate de exoenzime: exotoxina A, exotoxina E, piocianina, procolagenaza, hemolizina, fibrinolizina, lipaza, esteraza, fosfolipaza, lecitinaza, proteaze, neuraminidaza. Proteazele extracelulare identificate sunt secretate de aproximativ 90% din tulpinile de *P. aeruginosa* și acționează prin formarea de leziuni hemoragice, care devin necrotice în 24 ore. Unele tulpini produc o proteină termolabilă leucocidina (citotoxina), cu afectare limfocitară. Exotoxina A, specifică pentru *P.aeruginosa*, acționează asemănător cu toxina difterică. Persistența la nivel local prin intermediul exopolizaharidelor, cu structură de alginat, face posibilă formarea unui biofilm cu protejarea bacteriei față de factorii de apărare locali, antibiotice, etc (Moradali ș.a., 2017).

1.4. Factori protectori și predispozanți ai gazdei

Patogenitatea unui agent etiologic se manifestă doar în anumite circumstanțe. Este vorba, fie de modificări ai factorilor de protecție ale pielii, fie de existența/apariția unor factori favorizanți locali sau a afecțiunilor primare. Din prima categorie fac parte hidratarea cutanată (influențată inclusiv de temperatura și umiditatea mediului), structura pielii cu secrețiile glandulare specifice, pH-ul cutanat. Apa reprezintă un element important în menținerea intergității celulelor și a microflorei cutanate normale, iar mecanismul homeostaziei previne deshidratarea sau hiperhidratarea, aceasta din urmă determinând o „macerare” epidermică ce poate duce în final la o exacerbare a microorganismelor și antrenarea unei infecții (Moriello ș.a., 2017).

În ceea ce privește structura pielii, existența unui *stratum corneum*, format din corneocite (denumire dată celulelor din ultimul stadiu de diferențiere a keratinocitelor), precum și eliminarea continuă a keratinocitelor din stratul superficial cutanat, reprezintă factori protectori pentru piele. Corneocitele formează o barieră fiziologică etanșă între stratul granulos și mediul extern, impermeabilitatea fiind asigurată de emulsia de substanțe produse de glandele sebacee și sudoripare. Aceste substanțe au rolul de a inhiba, selectiv, multiplicarea anumitor microorganisme și asigurarea de substanțe nutritive pentru supraviețuirea altora (flora rezidentă) (Proksch ș.a., 2008).

Funcția de barieră (mecanică, chimică și imunologică), este îndeplinită de structuri intracelulare - factori naturali de hidratare și extracelulare - corpuri lamelare, lipide intercelulare, corneodesmosomi, anvelopa cornificată. Lipidele intercelulare sunt reprezentate în principal de: ceramide (30-50%), colesterol (25%), acizi grași liberi (10-20%). Proteinele care formează anvelopa includ involucrina, envoplakina și periplakina. Integritatea generală a *stratum corneum* este asigurată de corneodesmosomi, prin cele trei proteine de adeziune: desmoglein-1, desmocollin-1 și corneodesmosin. (Sevilla ș.a., 2007; Caubet ș.a., 2004). Protecția imunologică locală este asigurată de *stratum corneum* prin secrețiile glandulare din piele, proteine precum: IgA, fracțiunea C3 a complementului, transferine etc. (Elias, 2007).

pH-ul pielii la mamiferele cu păr este în general acid, la câine variază între 4,8 și 9,9 iar la pisică între 5,6 și 7,4 (Scott ș.a., 1980; Ruedisueli ș.a., 1998; Meyer ș.a., 1991). Variațiile între aceste limite depind de: rasă, sex, vârstă, diferite zone anatomice, stări parafiziologice (Miller ș.a., 2013).

Afecțiunile primare care predispun la piodermite pot fi de natură: endocrină – hipotiroidism, hiperadrenocorticism; imunitară – alergii, boli autoimune, tratamente cu corticoizi; sindrom seboreic; tulburări de cheratinizare primare sau secundare; dermatite micotice și parazitare – malasezioză, dermatofitoze, demodecie, cheiletieloză, râie sarcptică (DeBoer ș.a., 2001; Foster ș.a., 2003; Scott ș.a., 2001).

1.5. Dermatoimunologie

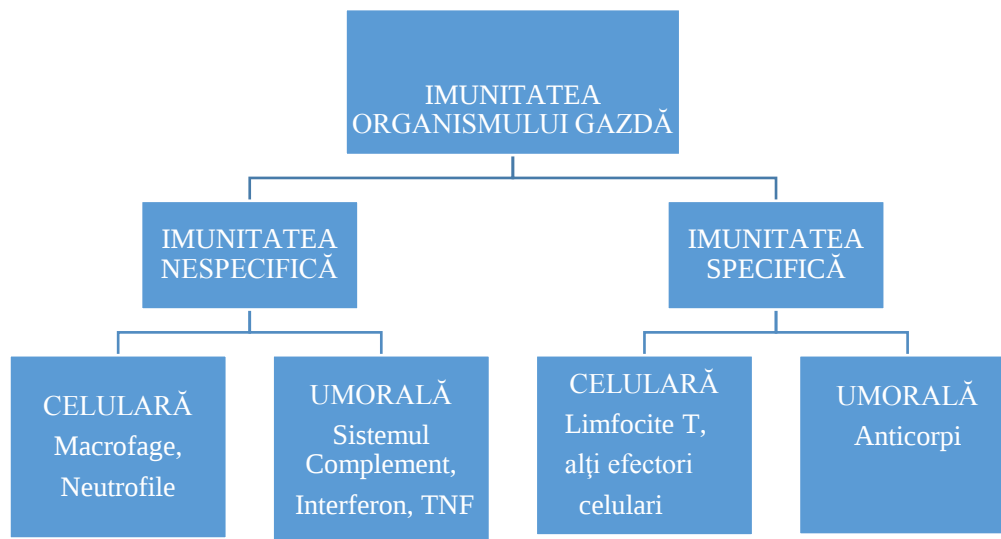


Fig.1.2. Componentele sistemului imun (după Carp M., 2002)
Fig.1.2. The components of the immune system (after Carp M., 2002)

Instalarea și evoluția unei piodermatite depinde și de statusul imunitar al animalului. În mod normal, atunci când este cazul, organismul are capacitatea de a discerne și de a iniția un răspuns imun prin capacitatea de a recunoaște moleculele patogene ale majorității bacteriilor; capacitate dată de imunitatea naturală/ înăscută (Fig.1.2.).

Principalele celule și molecule implicate în imunodermatologie sunt reprezentate de (Borbil, 2011; Carp Cărare M., 2002):

- Celulele Langerhans – provin din măduva osoasă și populează epidermul în proporție de 2-4%. Morfologic sunt descrise două tipuri de celule: unele, de tipul I, dispuse deasupra stratului bazal al epidermei și celulele de tip II care intră în structura stratului bazal. Rolul acestora este acela de a capta agenții infecțioși, de a-i prelucra și prezenta limfocitelor T care se găsesc la nivel cutanat în stratul papilar al dermului. Foarte importantă este și activarea limfocitelor B, care se vor transforma în plasmocite, capabile să producă imunoglobuline.
- Celulele Granstein – cel de- al doilea tip de celule prezentatoare de antigen care sunt, spre deosebire de celulele Langerhans, rezistente la radiațiile ultraviolete.
- Receptorii toll-like (TLR), cu rol central în recunoașterea agenților agresori și inducerea inflamației. Denumirea provine de la similitudinea cu o structură prezentă la *Drosophyla melanogaster*, cu funcție antimicrobiană. TLR sunt exprimați pe macrofage, mastocite, celule dentritice, eozinofile și celule epiteliale de la nivelul aparatelor respirator/digestiv.

- CD1- recunoaște glicolipidele bacteriene, CD14 – fixează lipopolizaharidele bacteriene, CD35 – specifice pentru lipoproteinele bacteriene.

- Sistemul Complement (alexina) – un set de enzime/proteine, cu rol de opsonine, prezente în ser, care după invazia bacteriană le distrug pe acestea direct sau indirect, prelucrându-le pentru a fi preluate de către celulele fagocitare.

- Mastocitele– stochează mediatori chimici, cu rol de amine vasoactive precum histamina, serotonina, arilsulimfocitează, substanțe ce atrag eozinofilele; cu rol major în procesele alergice.

- Limfocitele – eliberează molecule cu rol de semnal care vor interveni și vor distruge bacteria.

- Interleukinele – induc reacția inflamatorie timpurie, intervin în sindroamele septice grave, intervin în medierea reacției de fază acută

- Lizozimul– ferment glucidolitic, cu largă răspândire în organism, acționează prin liza mureinei (componenta mucopeptidică) din peretele bacterian. De interes pentru tema noastră (datorită linsului) este prezența acestuia în salivă, lacrimi, mucoasa nazală, vaginală. Efectul bactericid este semnalat în special la bacteriile gram pozitive (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Sarcina*) și în mai mică măsură la cele gram negative (Carp Cărare M., 2002).

Legile naturale imuabile ale supraviețuirii fiecărei specii, permite și în cazul bacteriilor să dețină un întreg arsenal de mecanisme și molecule prin care să contracareze mecanismele de rezistență locală ale gazdei. Făcând referire doar la *S.aureus* și *S.pseudintermedius*, cei mai reprezentativi agenți etiologici ai piodermitelor, am prezentat la factorii de patogenitate bacteriană substanțe cu activitate antifagocitară (Cunnion ș.a., 2005; Geoghegan ș.a. 2009; Moodley ș.a., 2009) .

Mai mult, la ora actuală este cunoscut faptul că, *Staphylococcus aureus* poate supraviețui în interiorul neutrofilelor/macrofagelor precum și a fagocitelor activate, nespecializate - celulele endoteliale și epiteliale. Această condiție intracelulară îi permite bacteriei să se sustragă sistemului imun, timp în care celula gazdă este distrusă. Supraviețuirea intracelulară se datorează selecției de variante bacteriene cu un metabolism mult mai redus (Proctor ș.a. , 2006).

În cele de mai sus s-au subliniat doar câteva aspecte legate de capacitățile anti-fagocitare bacteriene. În fapt, marii majorități de organe, țesuturi, molecule și celule ce formează sistemul imun al gazdei i se opune, complementar, un alt arsenal de molecule bacteriene (Borbil, 2011).

CAPITOLUL 2 . DIAGNOSTICUL ȘI MANAGEMENTUL TERAPEUTIC AL PIODERMITELOR LA CARNIVORELE DE COMPANIE

CHAPTER 2. DIAGNOSIS AND THERAPEUTIC MANAGEMENT OF PYODERMAS IN DOGS AND CATS

Conduita diagnosticului în dermatitele de natură bacteriană a animalelor de companie trebuie să fie metodică, sistematică, să includă etape din conduita convențională, precum și din conduita specifică piodermitelor.

Elaborarea fișei de observație a pacientului reprezintă un proces complex de mare ajutor, în contextul mării varietăți de dermatopatii – primare și/sau secundare, parazitare, micotice, bacteriene, etc. De cele mai multe ori acestea se asociază, astfel încât înțelegerea contextului apariției primelor simptome, înțelegerea modului de viață a pacientului; patologiile asociate declarate etc, sunt elemente extrem de utile pentru diagnostic. În diagnosticarea piodermitelor aceste etape și informații nu trebuie sub nici o formă ignorate din două motive: de multe ori dermatitele bacteriene se asociază cu prezența levurilor, dermatofiților, paraziților, lucru care este foarte important sub aspect terapeutic. Pe de altă parte, o piodermită și/sau otită recidivantă, trenantă, reprezintă de cele mai multe ori o complicație a unei patologii primare; caz în care tratarea bolii primare asigură și succesul tratamentului specific al suprainfecției bacteriene.

În mod particular, în cazul dermatitelor bacteriene noțiunea de diagnostic se asimilează diagnosticului etiologic: piodermită stafilococică, streptococică, nocardioze, etc. Astfel, etapa de recoltare a probelor este esențială pentru un diagnostic corect. Asepsia, recoltarea corectă și sterilă a materialelor patologice conduc la elaborarea unui diagnostic corect, de aici pornind și o conduită terapeutică eficientă; spre beneficiul pacientului, mulțumirea proprietarului dar și a medicului veterinar.

În faza clinică de orientare a diagnosticului, informații prețioase sunt date de modul de grupare a leziunilor. Sugestive pentru piodermite sunt leziunile unice și izolate. Deasemenea, prezența leziunilor de dimensiuni mari, cu margini bine delimitate, sub denumirea generică de plancarda (numulare, inelare, polielice, circinate, serpiginose), precum și a leziunilor în țintă, pot fi semnalate în piodermite superficiale.

Identificarea corectă și globală a tuturor leziunilor cutanate are rolul de a direcționa și diagnosticul diferențial întrucât doar anumite leziuni sunt specifice dermatitei bacteriene, altele ridicând suspiciuni pentru prezența unor boli primare sau dermatite asociate, de altă natură.

2.1. Tipuri de leziuni cutanate

2.1.1. Leziunile primare reprezintă modificări morfo-funcționale ale pielii și sunt induse direct de agentul patogen (Vulpe, 2016).

Macula reprezintă o zonă circumscrișă, lenticulară, cu diametrul sub 1 cm, caracterizată prin culoare negricioasă sau roșie a pielii. Este sesizabilă doar la inspecție, nu și la palpație. Se pot întâlni *macule hiperpigmentare* datorate creșterii cantității de melanină și care nu cedează la vitropresiune.

Eritemul pielii - înroșirea datorită dilatației vaselor, cedează la vitropresiune (compresiunea cu o lamă de sticlă). Eritemul poate fi localizat, difuz, generalizat. Frecvent, eritemul este localizat sub formă de pete eritematoase care au caracter congestiv sau inflamator, cu temperatura locală crescută. Eritemul difuz este sub formă *morbiliform* (macule eritematoase slab delimitate între ele prin zone de piele sănătoase) și *scarlatiniforme* (cel mai frecvent întâlnit, pete eritematoase fără prezență de zone sănătoase între ele). Prima formă se întâlnește cel mai adesea în reacții cutanate la medicamente; cea de-a doua formă este frecvent asociată cu dermatita atopică, dermatita cu *Malassezia spp.*, râia sarcaptică, limfomul cutaneo-mucos, lupus eritematos sistemic, mastocitoame.

Purpura este reprezentată de zone roșii-închise, de întindere diferită, datorită extravazării hematiilor din vasele dermice. Nu cedează la vitropresiune și cel mai adesea este consecința unor boli interne. După întindere, purpura poate fi *exantemică* (hemoragii numai pe piele) sau *hemoragică* (hemoragiile sunt prezente pe piele și pe mucoase). După aspectul clinic, leziunile din purpură pot îmbrăca mai multe forme:

- *peteșii* sau *echimoze*, reprezentând leziuni hemoragice punctiforme sau zone hemoragice mai întinse, bine delimitate, colorate în roșu-violaceu;
- *vibices*, traiecte liniare hemoragice observate în urma traumatismelor (loviturile de bici) sau la pliuri ale pielii;
- *sufuziuni*, infiltrații hemoragice cu caracter slab delimitat, datorită revărsărilor de sânge în țesutul conjunctiv subcutan, prin ruperea unui vas de sânge.

Papula constă într-o mică denivelare la suprafața pielii, fermă și circumscrișă ce interesează epidermul și stratul papilar dermic. Corespunde unei îngroșări zonale ale dermului superficial, dar se poate asocia și cu hipertrofia epidermului. De obicei papula are o existență scurtă, fie dispare prin resorbția infiltratului, fie se transformă în alte leziuni. În funcție de conținut, se disting trei tipuri de papule: *edematoase*, *cu infiltrate celulare* și *dismetabolice*. Papulele *edematoase*, cu exemplul tipic reprezentat de papula urticariană, sunt specifice reacțiilor de sensibilitate de tip I, mușcături de artropode. Papulele *cu infiltrat celular* pot fi foliculare și nonfoliculare; cele foliculare sunt asociate foliculitelor bacteriene, micotice, parazitare, iar cele nonfoliculare sunt asociate reacțiilor alergice. Papulele *dismetabolice* sunt acumulări de materiale amorfe și se pot întâlni în: hiperadrenocorticism (calcinosis cutis), xantomatoză, amiloidoză.

Nodulul reprezintă o formațiune fermă, solidă, adesea sferică, plasată în grosimea pielii și de dimensiuni superioare papulei. Poate fi de natură inflamatorie sau neoplazică. Infiltratele dermice dau noduli excrescenți, fermi și voluminoși și uneori multipli. Infiltratele hipodermice dau noduli cu localizare mai profundă și uneori difuzi. Tumora este reprezentată de o masă de țesut solidă, cu origine neoplazică, granulomatoasă sau piogranulomatoasă (Vulpe, 2016)

Vegetațiile și verucozitățile sunt excrescențe în relief care corespund proliferării locale a epidermului (hiperplazie malpighiană, mai rar a corpului papilar al dermului care formează scheletul excrescenței). Au aspect filiform, globulos sau conopidiform.

Veziculele sunt leziuni elementare cu conținut lichid. Acestea sunt proeminente epidermice bine delimitate, cu mărime de până la 1 - 5 cm, translucide și cu un conținut lichid. La toate speciile veziculele se sparg ușor, locul lor fiind luat de eroziuni. Funcție de dimensiuni, veziculele pot fi:

- *aftice*, de dimensiuni foarte mici, abia vizibile;
- *aft*, de mărimea unui bob de mei;
- *bule* (flicte), de mărimea unei alune;
- vezicule din *pemfigus* (boală imună complexă), cu diametrul de 4 – 5 cm.

Pustula este o denivelare epidermică de câțiva mm (până la 1 cm), cu conținut purulent. Pot fi *foliculare* (centrate pe firul de păr în foliculite bacteriene, micotice sau parazitare) și *nonfoliculare* (dispar mai repede și sunt întâlnite în impetigo, pemfigus, paniculită nodulară sterilă). Dimensiunea și culoarea lor orientează diagnosticul astfel: pustulele mari și flasce sunt întâlnite la pacienți cu pemfigus foliaceu și/ sau impetigo bulos. Pustulele (microabcese) sunt clasificate în mai multe tipuri: spongiforme Kagoj (cavități neutrofile, situate în stratul spinos și granular al epidermului); Munro-Sabouraud (colecții de diferite mărimi de neutrofile alterate, situate în sau sub stratul cornos), subcornose (colecții importante de granulocite neutrofile, situate sub stratul cornos); hemoragipare – semnalate în dermatita de hipersensibilizare bacteriană. Pustulele mari de culoare verde sunt întâlnite în piodermite în care agentul etiologic sunt bacterii gram negative (*Pseudomonas*, etc). Pustulele foliculare netratate conduc în final la apariția furunculilor. Mecanismul constă în distrugerea tecilor foliculare, procesul inflamator extinzându-se la nivelul dermului în zona perifoliculară.

Resturile de cheratină din derm devin libere și procesul inflamator se accentuează.

La câini, de cele mai multe ori, la consultație sunt evidențiate leziunile secundare ce decurg din pustule (crustele și coleretele). Acest lucru se datorează faptului că epidermul câinilor fiind foarte subțire, pustulele se transformă destul de repede în leziuni secundare (Alhaidari ș.a., 2011; Solcan ș.a., 2003; Vulpe, 2016).

2.1.2. Leziunile secundare sunt clasificate astfel nu ca importanță, ci ca apariție în timp în tabloul clinic. Ele sunt rezultatul fie a procesului de vindecare a leziunii primare (coleretele epidermale), fie a intervenției unor factori externi (suprainfecție bacteriană, traumatisme, lins, grataj, terapie): lichenificarea, hipercheratoza, coarnele cutanate,

scleroza-cicatricea, atrofia, fisura, exsudația, supurația, necroza. Dintre acestea, leziunile cele mai semnificative pentru tabloul clinic a unei suprainfecții bacteriene sunt:

Exudatul, produs de secreție organică exprimat la nivelul unei suprafețe inflamate, apare în: dermatita piotraumatică, furunculoza eozinofilică, dermatoze immune, micotice, traumatice.

Supurația, exudat purulent exprimat la suprafața unei leziuni. apare în principal în dermatoze bacteriene: furunculoze, celule, abcese, răni suprainfectate. Secundar, aceasta însoțește (din cauza pruritului și gratajului) dermatozele parazitare și micotice. Supurații sterile apar în celulita juvenilă, furunculoza eozinofilică, paniculita nodulară sterilă, piogranulomul steril.

Fisura, apare în zonele îngroșate și lipsite de elasticitate ale epidermului și dermului. Pot fi prezente la nivelul calusurilor, trufei (lieshmanioză, dermatită solară, jigodie), pernțelor. Fisura reprezintă una din leziunile cele mai susceptibile pentru suprainfecția bacteriană, din cauza lipsei de contiguitate a epidermului.

Leziuni secundare mai puțin susceptibile pentru a se complica cu o piodermită, sunt reprezentate de: coleretele epidermale, lichenificarea, hipercheratoza, coarnele cutanate, scleroza și atrofia cutanată, necroza. Alte leziuni precum: alopecia, scuamele, eroziunile, ulcerale, crustele hemoragice și gălbui, comedoamele, deși pot apare ca leziuni primare ele sunt totuși specifice unei piodermite fie ea primară sau secundară. (Mircean ș.a., 2014; Medleau ș.a., 2006; Papuc, 2012).

2.1.3. Clasificarea dermatitelor bacteriene

Sintetic, piodermitele superficiale sunt definite ca infecții bacteriene cu leziuni limitate la nivelul epidermului și a foliculilor piloși, fără afectarea membranei bazale.

Piodermitele profunde sunt infecții cu afectare a membranei bazale, ce se pot extinde și la nivelul dermului iar uneori poate cuprinde și hipodermul (Mircean ș.a., 2014). Numeroase clasificări etiologice și clinice au fost propuse pentru piodermite, unanim acceptate fiind cele care se referă la profunzimea afecțiunii și oferă date histopatologice ce permit orientarea diagnosticului și oferirea unui prognostic obiectiv. Clasificări date din 1983, adaptate în 1988, au fost ulterior completate cu noi entități clinice (Fourrier ș.a., 1988). Două astfel de clasificări le prezentăm în Tabelul 2.1.

Tabelul 2.1./Table 2.1.

Clasificări ale piodermitelor
Classifications of pyodermatites

PROFUNZIMEA	TIPUL (după Guaquere , 2006)	TIPUL (după Miller ș.a., 2013)
Piodermita de suprafață și superficială	Intertrigo	Intertrigo
	Cutaneo-mucoasă	Impetigo
	Sindromul de proliferare bacteriană	Cutaneo- mucoasă
	Impetigo	Foliculită
	Foliculită	Dermatofiloza
Piodermita profundă	Furunculoza	Foliculita profundă
	Celulita	Furunculoză(nazală, a botului, podală, a Ciobănescului German, de lins)
		Celulita anaerobă
		Abcesul subcutanat
Pseudo piodermita	Dermatita piotraumatică	
	Celulita juvenilă	
	Paniculita sterilă idiopatică	
	Furunculoza eozinofilică	

Solcan (2003) consideră termenul de pseudopiodermite ca fiind ambiguu definit și propune renunțarea la acest grup, în schimb reclasifică anumite tipuri de piodermite în câteva subtipuri pe care le prezentăm în tabelul 2.2. Pe structura tabelului propus de Solcan, am completat în ultima coloana leziunile cutanate descrise pentru fiecare patologie în parte (Solcan ș.a., 2003). Alături de leziunile cutanate am precizat și prezența pruritului, acolo unde este cazul, întrucât reprezintă un aspect semiologic deosebit. Pruritul este un sindrom complex, care poate fi definit ca o neuroalergoză caracterizată prin senzație de mâncărime, scărpinare, lingere și chiar mușcare a unor regiuni. Pruritul fiziologic este cu mult depășit în intensitate, ritm, frecvență, durere și chiar localizare, de către cel patologic.

Acestea sunt, în mare parte, și cauzele suprainfectării bacteriene, prin grataj creându-se porți de intrare pentru bacterii. Găsirea unui tratament care să suprimă acest simptom, indiferent de natura lui - esențial sau simptomatic, ar preveni cu siguranță multe complicații bacteriene.

Tabelul 2.2./Table 2.2.

**Propunere de clasificare a piodermitelor (după Solcan, 2003),
completată cu leziunile cutanate**

Proposal for the epidermis classification, supplemented with cutaneous lesions

PROFUNZIMEA	TIPURI	SUBTIPURI	LEZIUNI CUTANATE
Superficiale	Impetigo	Pustulos	Pustule alb-gălbui, puțin pruriginoase sau deloc, după rupere exprimă un exudat gălbui, înlocuite ulterior de cruste galbene
		Bulos	Bule și pustule de 0,5-1,5 cm cu conținut purulent alb-galbui, după deschiderea bulelor apar eroziuni epidermice
	Intertrigo		Dermatita pliurilor unde apar:eritem, prurit intens, exoseroză, pustule rare sau mici cruste gălbui
Intermediare	Foliculita		Pustule centrate pe firul de păr, pe abdomen, prurit discret
Profunde	Furunculoze	Secundară foliculitei (inclusiv acneea)	Pustule sau noduli de 0,5-1 cm centrați pe foliculii piloși, exprimă ulterior material seropurulent, prurit redus sau moderat
		Nazală	Tumefacție accentuată, prurit accentuat, pustule sau bule cu puroi sanguinolent, crustă compactă cu fistule, pustule la periferie
	Dermatite flegmonoase (celulite)	Localizate: secundar furunculozei, piodermita calozităților, juvenilă	Tumefacție intensă, durere, mici fistule care la compresie pot exprima puroi sanguinolent, tulburări generale (febră, inapetență)
		Generalizate	

Unanim acceptate sunt criteriile de includere în una din cele două clasificări: superficiale și profunde, pe care le prezentăm, comparativ, în tabelul 2.3.

Criterii de încadrare a piodermitelor**Piodermatitis framing criteria**

Piodermita superficială (după Fourrier ș.a., 1988)	Piodermita profundă (după Carlotti ș.a., 1998)
• interesează strict epidermul și/sau foliculii piloși • determină arareori manifestări generale și nici reacția limfonodurilor locale • vindecare rapidă, fără cicatrici	este depășită membrana bazală, inflamația invadează dermul și hipodermul sunt prezente atât tulburări generale, cât și reacții ale limfonodurilor regionale caracteristice sunt: supurația, necroza, fistulizarea, după vindecare rămân cicatrici

2.2. Metode de diagnostic în piodermite la câini și pisici

Periajul, trichograma, raclajul, testul cu banda scotch etc, confirmă prezența ectoparaziților atât pe suprafața pielii (purici, păduchi malofagi, păduchi hematofagi, Cheyletiella), cât și în straturile profunde și superficiale ale epidermului (*Sarcoptes spp.*, *Demodex spp.*, *Otodectes spp.*, *Cheyletiella spp.*, *Trichodectes spp.*, *Linognathus setosus*), a ouălor de ectoparaziți, dar și a endocrinopatiilor, afecțiunilor metabolice grave, bolilor autoimune, dermatofitelor și a larvelor de nematozi. Cu excepția examenului citologic, examenele din această categorie au rolul de a confirma/infirma afecțiunile dermatologice primare care au precedat sau care însoțesc diagnosticul de infecție bacteriană. Alte examene cu interpretare întârziată constau în examenul micologic, intradermoreacțiile, examenul histopatologic, coprologic, hematologice și biochimice, tehnici de imagistică a organelor interne întrucât multe din dermatopatiile ce se pot complica cu o piodermită, reprezintă expresia cutanată a afecțiunilor organelor interne (Solcan ș.a., 2003; Vulpe, 2016). Acestea sunt utile pentru etapa de terapie a piodermitelor întrucât afecțiunile primare sau cele care însoțesc piodermitele trebuie diagnosticate și tratate în aceeași măsură, în caz contrar pot apărea eșec terapeutic, trenarea și/sau recidivarea piodermitei (Musteață ș.a., 2016).

2.2.1. Examenul citologic și bacterioscopic

Primul pas în protocolul de diagnosticare a unei piodermite este realizarea unui examen citologic direct din materialul patologic prezent. Tehnicile de etalare se adaptează în funcție de aspectul pielii și al leziunilor și pot fi prin: etalare directă, prin strivire, puncție, tamponare, raclare. Citologia unei pielii sănătoase, evidențiază prezența corneocitelor mature anucleate, celulelor neinflamatorii, bacteriilor și-sau levurilor în număr redus ($< 1/\text{camp}$) (Musteață ș.a., 2016). Examenul citologic direct orientează diagnosticul către piodermită, atunci când în câmpul microscopic bacteriile sunt numeroase, acestea se regăsesc în mod omogen pe lamă, în primul rând în interiorul polinuclearelor sau macrofagelor, ceea ce indică o invazie bacteriană.

Semnificația unei imagini de fagocitoză trebuie interpretată în funcție de locul și modalitatea de recoltare a probei. O probă de suprafață cu o asemenea imagine nu este

foarte semnificativă pentru o infecție bacteriană, ea poate fi doar expresia unei multiplicări bacteriene în care caracterul patogen este incert. Pe de altă parte, într-o probă recoltată din interiorul epidermului, folicul pilos sau derm, o astfel de imagine de fagocitare bacteriană indică în mod cert o piodermită. În caz de piodermită superficială (impetigo, foliculită) imaginea de fagocitoză este frecvent surprinsă într-o reacție supurativă. În cazul piodermitei profunde, se observă mai ales polinucleare și macrofage (reacție piogranulomatoasă). Examenul bacterioscopic direct pune în evidență bacteriile Gram pozitive din genul *Staphylococcus spp.* – formele cocoide, *Corynebacterium spp.* – formele bacilare, iar colorația ZN evidențiază bacteriile din genul *Mycobacterium spp.* – formele bacilare, *Nocardia spp.*-filamentare, etc. Bacteriile Gram negative sunt reprezentate de *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Escherichia Coli*, *Pasteurella spp.*, etc (Cowell ș.a., 2007).

La examinarea unui frotiu direct, într-o piodermită vor fi puse în evidență infiltrate celulare care confirmă o afecțiune inflamatorie. Citologic, celulele inflamatorii sunt reprezentate de: neutrofile, eozinofile, limfocite, plasmocite și macrofage. Tipul de celule inflamatorii, proporția dintre acestea, orientează diagnosticul (Tabelul 2.4.).

Tabelul 2.4./Table 2.4.

Examenul citologic și dermatopatii sugerate (după Cowell ș.a., 2007)**The cytological examination and suggested dermatopathies**

Populația de celule inflamatorii	Afecțiuni frecvente
Infiltrat inflamator dominant de neutrofile (>85%)	
Dominat de neutrofile degenerate	Piodermite produse de bacterii gram pozitive sau negative
Numar redus de neutrofile degenerate	Piodermite produse de bacterii gram pozitive sau negative și infecții cu bacili filamentoși (<i>Actinomyces</i> , <i>Nocardia</i>)
Fară neutrofile degenerate	Piodermite produse de bacterii gram pozitive, infecții cu bacili filamentoși (<i>Actinomyces</i> , <i>Nocardia</i>), leziuni de natură traumatică sau chimică și paniculite
Populația de celule inflamatorii	Afecțiuni frecvente
Infiltrat inflamator mixt	
15-40% macrofage	Infecții cu bacili filamentoși (<i>Actinomyces</i> , <i>Nocardia</i>), infecții fungice, corpi străini, neoplazii și paniculite
>40%macrofage	Infecții fungice, infecții cu protozoare (în special cu <i>Leishmania</i>), corpi străini, neoplazii, paniculite
Celule inflamatorii gigante	Infecții fungice, infecții cu protozoare, corpi străini, paniculite, parazitoze(dacă este prezentă eozinofilia)
>10% eozinofile	Inflamații alergice, parazitoze, granulom eozinofilic, tumori mastocitare

2.2.2. Examenul bacteriologic și antibiograma

Următoarea etapă în protocolul de diagnosticare a piodermitei este examenul bacteriologic. Principalele situații în care este indicat acest examen sunt:

- examenul citologic a pus în evidență prezența bacteriilor, în condițiile descrise mai sus;
- dacă un tratament antibiotic bine condus, cu un compus eficace recunoscut în dermatologia veterinară nu a dat rezultate;
- în caz de piodermită cronică și /sau recidivantă;
- în piodermitile profunde, când tratamentul este adeseori îndelungat, just este să se selecționeze imediat un antibiotic cu sensibilitate specifică agentului etiologic implicat.

Examenul bacteriologic constă în cultivarea pe medii lichide (bulion BHI) și solide (Agar Sânge) a materialului patologic. În funcție de proveniența probei, de anamneză (care poate direcționa supozițiile spre un germene aerob/anaerob, Gram negativ/pozitiv, acido rezistent), de consistența, culoare, etc., se cultivă apoi pe medii speciale: Chapman, Sabouroud, selectiv pentru *Pseudomonas*, Levine, Lowenstein, etc. După obținerea coloniilor izolate, se urmăresc caracterele culturale; se efectuează frotiuri pentru a fi examinate la microscop caracterele morfologice. Colorația uzuală este Gram. În funcție de situație se efectuează și alte colorații: Ziehl-Neelsen, Albastru de Metilen, Giemsa. Pentru fiecare caz în parte urmează teste biochimice specifice.

Un examen bacteriologic pozitiv este finalizat cu efectuarea unei antibiograme. Principiul realizării antibiogramei, determinarea concentrației minime de antibiotic (CMI) capabile să inhibe creșterea bacteriană, este din păcate limitat de anumite aspecte. În fapt, compararea CMI cu nivelul plasmatic este valabilă doar pentru clasele de antibiotice la care distribuția sangvină și cea tisulară sunt identice (unele antibiotice au o afinitate tisulară de 100 de ori superioară celei serice). Pentru unele antibiotice, care au o concentrație mare în piele, o încadrare ca “moderat sensibil” sau “rezistent” *in vitro* poate să nu corespundă cu realitatea. În același timp, detectarea CMI-ului nu ține cont de anumiți factori existenți *in vivo*: prezența puroiului poate să inactiveze anumite antibiotice, să existe anumite acțiuni sinergice cu sistemul imunitar, existența de antibiotice a căror acțiune este dependentă de timp. Intervalul dintre administrări este foarte important, pentru antibioticele a căror acțiune depinde în primul rând de concentrație, doza administrată asigură eficacitatea. Există clase terapeutice la care s-a demonstrat efectul post-antibiotic, cum ar fi aminoglicozidele și fluoroquinolonele (creșterea bacteriilor continuă să fie inhibată și după ce concentrația antibioticului la locul infecției este nulă) (Murray, 1995).

2.3. Protocolul terapeutic al piodermitelor

2.3.1. Terapia etiotropă sistemică și topică

Piodermatitele reprezintă o patologie ce “beneficiază” prin excelență de antibioterapie sistemică și/sau topică, atât în medicina umană cât și în cea veterinară (Benea ș.a., 1998). Decizia medicului clinician de a administra un anumit antibiotic sau

combinație de antibiotice, va avea la bază o analiză critică de ansamblu asupra indicațiilor, limitelor, contraindicațiilor și stării clinice generale a pacientului (status imun, boli primare, patologii asociate)(Vâță ș.a., 2011).

La începuturile “erei antibioticelor”, clasa penicilinelor (G, V și retard) a constituit terapia de elecție în infecțiile pielii și ale părților moi în care stafilococul are un rol dominant. Acest lucru s-a schimbat odată cu apariția și dezvoltarea antibioretistenței, care a devenit limitarea majoră în chimioterapia antibacteriană. Prezentăm în Fig.2.1. câteva exemple de urgență rapidă a rezistenței la antibiotice:

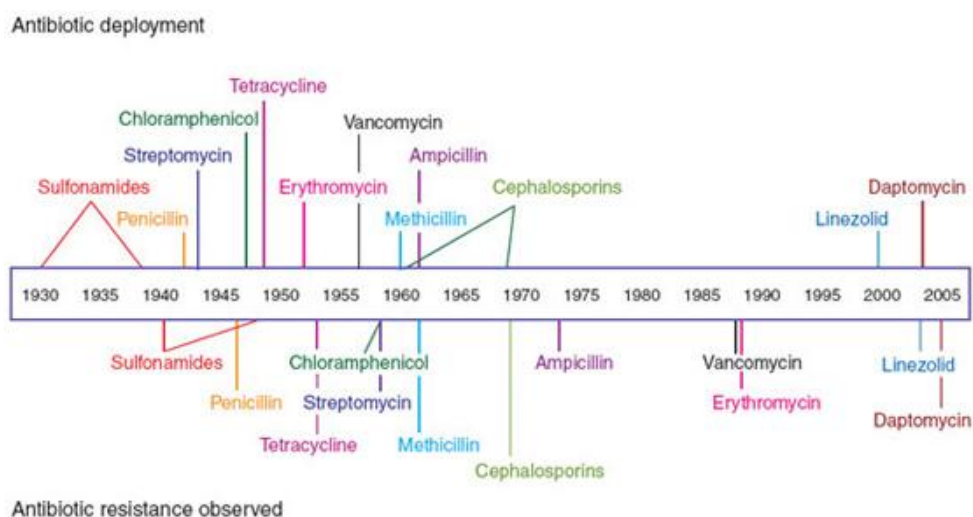


Fig.2.1. Emergența rezistenței la antibiotice (Clatworthy ș.a., 2007)

Fig.2.1. Timeline of antibiotic resistance(Clathworthy ș.a., 2007)

Apariția cefalosporinelor, cele mai active pe gram pozitiv (respectiv stafilococi) fiind cele de generația I (cephadroxil, cephalexina, etc), a constituit un progres în tratarea infecțiilor dermatologice, cu excepția MRSA. În infecțiile cutanate primare cu coci gram pozitivi sunt recomandate cefalosporinele de generația I orale: cefalexina (Parish ș.a.,1992; Năstasă, 2012).

O altă clasa utilizată în dermatologie în special în infecții pluribacteriene profunde este cea a betalactaminelor cu inhibitor de betalactamază, dintre care cel mai frecvent administrat este amoxicilina potențată cu acid clavulanic. Aminoglicozidele reprezintă, după beta lactamine, substanțele bactericide cele mai utilizate în terapia topică.

Familia polipeptidelor ciclice (Polimixina B și E) sunt active în special pe gram negativ (în mai mică măsură și pe gram pozitiv). În dermatologie sunt utilizate în terapia topică singure sau în asociere cu bacitracina.

Rifampicina, din familia Rifampicinelor este o moleculă bactericidă cu spectru larg, cu o bună permeabilitate tisulară și intracelulară care, pentru a diminua apariția de tulpini rezistente se asociază cu antibiotice din alte clase.

Acidul fusidic, bacteriostatic și în doze mari bactericid este activ în special în MRSA.

Tratamentul în piodermatite este unul etiologic (Fig.2.2.), scopul fiind acela de a inhiba creșterea și/sau a elimina bacteriile patogene. Prescrierea antibioticelor, după efectuarea antibiogramei, va ține cont în același timp și de:

- urmărirea în primul rând a efectului bactericid a antibioticului ales
- o buna difuzie la nivelul țesutului cutanat și subcutanat
- o toxicitate minimă (Ivana, 2007).

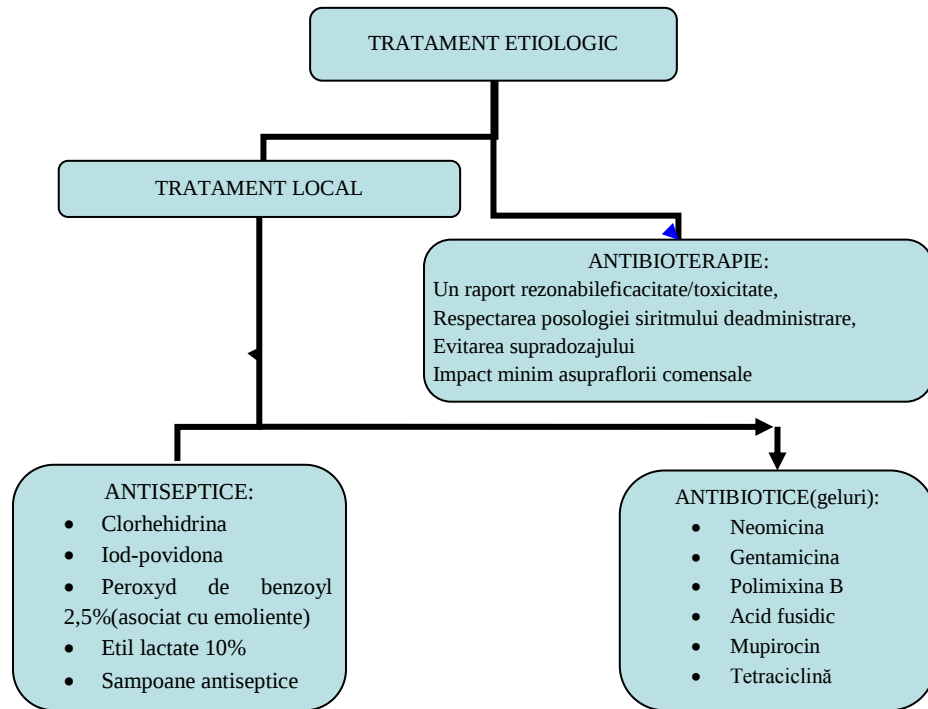


Fig.2.2. Tratament etiologic în Piodermite la Carnivore de Companie (original)

Fig.2.2. Etiological treatment in pets pyoderma (original)

Antisepticele au un mod de acțiune variabil și dependent de numeroși factori locali: concentrația, temperatura, pH-ul pielii, timpul de contact, precum și de natura aditivilor și excipienților:

- Clorhexidina 0,5-5% – are acțiuni antibacteriană și fungistatică la nivelul membranei citoplasmatică și a citoplasmei, cu acțiune maximă la un pH cuprins între 5,5-7; rar a fost descrisă rezistența la *Pseudomonas spp.* Studii de biologie moleculară confirmă prezența genelor de rezistență la *S.aureus* cu o incidență cuprinsă între 4 și 44% (Smith ș.a., 2008; Vali, 2008; Mayer ș.a., 2001). În ceea ce privește *S.pseudintermedius*, studii recente (Dulman, 2016) au pus în evidență prezența acestor gene de rezistență într-un procentaj cuprins între 5 și 60%.

- Betadina (iodina povidona) 0,05% - are un efect antibacterian rapid, fungicid și virucid. Este eliberat lent în piele, incompatibil cu derivate de mercur, datorită formării iodurii de mercur care prin acțiunea sa poate provoca ulcerații cutanate.

- Peroxidul de benzoil 2,5% - efectul antimicrobian derivă din metabolizarea în acid benzoic și acidifierea pH-ului cutanat. Are efecte antiseborice, comedolitic. Se asociază cu emoliente în caz de uscare excesivă a pielii.

- Lactatul de etil – efect antibacterian echivalent peroxidului de benzoil, aplicat pe piele este hidrolizat în etanol și acid lactic, care diminuează pH-ul cutanat și inhibă lipazele bacteriene. Reduce secreția sebacee, se utilizează în concentrație de 10% (Paterson, 2008).

În cazul abordării empirice a antibioterapiei, având în vedere că 90% din dermatite (la câini) sunt provocate de *S. pseudintermedius* care produce beta-lactamaze, se va ține cont de antibioticele care au făcut dovada eficacității în dermatologia veterinară pe baza caracteristicilor fizico chimice și modului de acțiune (Tabelul 2.5.) (Theuretzbacher, 2011).

Tabelul 2.5./Table 2.5.

Caracteristici fizico-chimice și mod de acțiune ale diferitelor clase de antibiotice
Physicochemical characteristics and action of different antibiotics classes

CLASA	CARACTERISTICI FIZICO-CHIMICE	MOD DE ACȚIUNE
Macrolide și Lincosamide (eritromicina, spiramicina, tylosin)	Bază slabă, concentrare în celule, o bună distribuție în țesuturi, eliminare biliară	Bacteriostatic – dependent de timp – prin inhibiția translocării la nivelul ribosomilor
Peniciline rezistente la penicilinaze (oxacilin, cloxacilin, flucloxacilin)	Acid slab hidrofil, bună difuzie în mediul extracelular, eliminare rapidă, mai ales urinară	Bactericid- dependent de timp – prin inhibarea sintezei peretelui bacterian
Cefalosporine (cefalexin, cefadroxil, ceftiofur, cefalotin)	Bună solubilitate în apă, biodisponibilitate orală, timp de înjumătățire biologic	Bactericid–timp dependent – prin distrugerea peretelui bacterian
Fluoroquinolone (flumequin, enrofloxacin, norfloxacin, marbofloxacin)	Amfoter, bună difuzie celulară; la nivel cutanat	Bactericid – concentrație dependent – prin inhibarea replicării ADN
Diaminopyrimidine asociate cu sulfamide (trimetoprim+ sulfadiazin/ sulfamethoxazol/sulfadoxin)	Bună difuzie în lichidul extracelular, fixare pe diverse proteine, eliminare urinară	Bactericid prin inhibiția metabolismului bacterian (inhibă sinteza acidului folic)

Recomandările privind antibioterapia sistemică sunt făcute după unii autori, după spectrul de acțiune al antibioticului (tabelul 2.6.) iar după alți autori, după indicația etiologică (tabelul 2.7.).

Tabelul 2.6./Table 2.6.

Recomandări antibioterapie sistemică (după Miller ș.a., 2013)

Systemic antibiotherapy recommendations

Spectrul de acțiune	Antibiotic	Doză
Îngust	Erythromycin	15 mg/kg q8h
	Clindamycin	5 mg/kg q12h 11 mg/kg q24h
	Lincomycin	15 mg/kg q8h 22 mg/kg q12h
	Tylosin	10-20 mg/kg q12h
Larg	Amoxicillin+clavulanate	13.75 mg/kg q12h
	Oxacillin	22 mg/kg q8h
	Cefadroxil	22 mg/kg q12h (D) 22 mg/kg q24h (C)
	Cefovecin	8 mg/kg q7-14 days
	Cephalexin	22 mg/kg q8-12h
	Chloramphenicol	50 mg/kg q8h (D) 50 mg/cat q12h (C)
	Enrofloxacin	5 mg/kg q24h
	Marbofloxacin	2.75 mg/kg q24h
	Orbifloxacin	2.5 mg/kg q24h
	Trimethoprim+sulfadiazine	15-30 mg/kg q12h
Diverși	Doxycycline	5-10 mg/kg q12h-24h
	Rifampicin	5-10 mg/kg q24h

D- câine, C – pisică

Tabelul 2.7./Table 2.7.

Recomandări antibioterapie sistemică (după Paterson, 2008)**Systemic antibiotherapy recommendations**

Antibiotic	Doză	Indicație
Amoxicilin	11–22 mg/kg po 8/12h	Abces mușcătură pisică
Ampicilin	20 mg/kg po 6/12h	Actinomyces, Nocardia
Cephalexin	25 mg/kg po 12h	Nocardia
Amoxicilina+acid clavulanic	12.5–25 mg/kg po 8/12h	Abces mușcătură pisică, stafilococie
Clindamicin	5.5 mg/kg po 12h	Nocardia, Abces mușcătură pisică, stafilococie
Enrofloxacin	5.0 mg/kg po 12h	Bacili gram negativi, micobacterii atipice, M.avium, stafilococii
Lincomicin	22 mg/kg po 12h	stafilococii
Penicilina G	10–15 mg/kg im or sq 12h	Actinomyces, Nocardia,
Trimetoprim+sulfonamide	30 mg/kg po 12h	Actinobacillus
Rifampin	5 mg/kg po 12h	M. lepraemurium
Streptomycin	10 mg/kg im or sc 8/24h	Actinobacillus
Tetracilin	10–22 mg/kg po 8/12h	Actinomyces

În alegerea empirică a antibioticului, Mircean recomandă să se țină cont de tipul piodermitei (Tabelul 2.8.)

Tabelul 2.8./Table 2.8.

Alegerea empirică a antibioticului (după Mircean, 2014)**Empiric choice of antibiotic**

Primul puseu de piodermită	Clindamicin
	Lincomicin
	Sulfamide potențate
Piodermite recidivante sau rezistente	Amoxicilină+acid clavulanic
	Cefalexin
	Cefadroxil
Piodermite rezistente la toate antibioticele cu excepția fluoroquinolonelor	Enrofloxacin
	Pradofloxacin
	Marbofloxacin

În ceea ce privește asocierea de antibiotice, deși în principiu se recomandă monoterapia cu un antibiotic cu spectru redus; aceasta se practică în următoarele situații: etiologie necunoscută, infecții pluribacteriene, în scopul intensificării efectului antibacterian, precum și pentru prevenirea selectării de tulpini rezistente.

Prezentăm în tabelul de mai jos principalele asocieri cu efect sinergic și antagonic.

Tabelul 2.9./Table 2.9.

Principalele asocieri de antibiotic și acțiunile lor (Vâță ș.a., 2011).**The main antibiotic associations and their actions**

SINERGIE	ANTAGONISM
Oxacilina + gentamicina	Rifampicina + amoxicilina Fluoroquinolone + glicopeptidice
Glicopeptidice + gentamicina	Acid fusidic + fluoroquinolone
Beta-lactamine+ fosfomicina/glicopeptide/cefalosporine	Clindamicina + gentamicina
Amoxicilina + acid clavulanic	Eritromicina + clindamicina

Pentru terapia topică se recomandă asocierea unguentelor cu gentamicină/neomicină sau polimixină + bacitracină. Cele mai recomandate antibiotice, conform literaturii de specialitate sunt: cefalosporinele de prima generație (Cephalexin, Cefadroxil, Cephadrine), macrolidele, rifampicina și quinolonele (Vâță ș.a., 2011).

Scopul terapiei antimicrobiene este eradicarea patogenilor nu numai de la nivelul leziunilor evolutive, dar în egală măsură și de la nivelul zonelor de portaj (cavitatea nazală, cavitatea orală, anus) de unde aceștia recolonizează pielea. Un studiu realizat în 2009 - Anglia, de Fazakerley J., prezintă distribuția *S.pseudintermedius* și *S.aureus* la câinii sănătoși și atopici, după cum urmează (Tabelul 2.10.).

Tabelul 2.10. /Table 2.10.

Distribuția *S.pseudintermedius* și *S.aureus* în diferite site-uri, la câinii atopici și sănătoși (după Fazakerley ș.a., 2009)***S.pseudintermedius* and *S.aureus* distribution in different sites in atopic and healthy dogs**

SITE	<i>S.intermedius</i>		<i>S.aureus</i>	
	atopici	sănătoși	atopici	sănătoși
mucoasa nazală	62,5%	14,0%	8,3%	2,3%
ureche	50%	7,0%	0,0%	0,0%
perineu	79,2%	32,6%	4,2%	4,7%
leziuni cutanate	100	N/A	0,0%	N/A

În ceea ce privește otitele externe, epidemiologia patogenilor este diferită, în sensul că cele mai frecvente sunt infecțiile cu *Pseudomonas spp.* urmate de cele cu *Staphylococcus spp.*, ambele fiind de cele mai multe ori asociate cu *Malassezia*. Modelul de susceptibilitate pentru *Pseudomonas spp.* este mai greu de prezis, deși majoritatea infecțiilor la primul puseu, sunt susceptibile la aminoglicozide topice, polimixina B, sulfadiazine, ciprofloxacin, ș.a. (Cole, 1998; Nuttall, 2016).

2.3.2. Tratamente adjuvante și terapii alternative

Completarea/ întărirea unui tratament etiotrop, cu tratamente adjuvante și/sau terapii alternative este argumentată de:

- Limitările existente în testările *in vitro* față de antibiotice;
- Dezvoltarea mecanismelor de rezistență bacteriană, în special a stafilococilor (incriminați în 90% din piodermite) la diferite clase de antibiotice; răspândirea MRSA, apariția MRSP, MRSE;
- Apariția, la nivel mondial a tulpinilor XDR și PDR, răspândirea acestora fiind o chestiune de timp;
- Efectul de recul al tratamentului prelungit cu glucocorticoizi (Solcan ș.a., 2003);
- Necesitatea limitării în timp a tratamentului antibiotic- știut fiind că în piodermitele superficiale, durata acestuia este de aprox. trei săptămâni, iar în piodermitele profunde este de minim șase săptămâni. În nocardioze tratamentul este prelungit chiar până la 12 luni (Sykes J.E., 2014). Este o perioadă lungă de timp, în care efectele secundare, nedorite, ale antibioticelor se pot instala;
- Caracterul zoonotic a *Staphylococcus spp.* și în mod special a *S.aureus* metilino-rezistent (Sing, 2008; Witte, 2007; Strommenger, 2006).

Tratamentele adjuvante pot include multe categorii de produse, de la banalul acid acetic până la substanțe imunomodulatoare. Acidul acetic utilizat în concentrații mai mici de 5%, prin pH-ul acid creat pe suprafața pielii, ajută la diminuarea populației bacteriene (în special *Pseudomonas spp.* dar și *Staphylococcus spp.*) fiind o variantă terapeutică adjuvantă extrem de ieftină. Substanțe imunomodulatoare precum levamisolul, cimetidina, interferonul alfa 2b, potențează activarea și rata de diferențiere a limfocitelor T, receptivitatea antigenilor și a mitogenilor. Vaccinul precum Staphage Lysate®, preparat din sușa de *S.aureus*, și-a dovedit eficiența în piodermite (studiu dublu orb contra placebo), conținând anatoxina stafilococică asociată cu stafilococi inactivați. Acționează prin stimularea sintezei de anticorpi antibacterieni și/sau stimularea nonspecifică de limfocite și macrofage. Utilizat injectabil, cu o frecvență săptămânală apoi spațierea administrării, diminuează semnificativ frecvența recidivelor (Miller H.W., 2013; Paterson S., 2008).

Terapia cu bacteriofagi - Bacteriofagul, virus capabil să infecteze și să se replice în interiorul unei bacterii, este una din cele mai comune entități de pe suprafața pământului (McGrath, 2007; Kuhment, 2012). Fenomenul a fost semnalat de sute de ani doar empiric, ca observație a faptului că în diverse râuri de pe suprafața Terrei (Iordan, Gange, Juma) se puteau vindeca boli precum lepra, infecții cu *Vibrio cholera*, mai apoi *Bacillus subtilis*. Abia în 1914 bacteriologul Twort F. avansează ipoteza că aceasta activitate bactericidă s-ar datora unui virus iar câțiva ani mai târziu microbiologul Felix d'Herelle denumeste „mâncătorii de bacterii”- bacteriofag și testează pe un băiat de 12 ani. Obține vindecarea unei dizenterii severe, în numai 12 ore (Golkar Z., 2014). La ora actuală potențialul utilizării bacteriofagilor în biotehnologie, terapeutică, cercetare, are ca

direcții concrete: prevenirea infecțiilor bacteriene prin introducerea acestora ca vehicule pentru vaccinuri (ADNul și proteine); diagnosticarea unor boli precum și tratamentul cu fagi datorită proprietății acestuia de a liza celula bacteriană. Ar fi ușor de tratat o mare diversitate de infecții bacteriene rezistente la antibiotice, prin realizarea unui cocktail de bacteriofagi. Studii relativ recente au pus la punct metode de dezinfecție și decontaminare cu bacteriofagi a clădirilor, în speță spitale infectate (Chanishvili ș.a., 2007). Preocupările actuale și cercetările în desfășurare caută răspunsuri la probleme precum siguranța și eficacitatea utilizării, răspunsul imun consecutiv administrării, optimizarea creșterii și purificării bacteriofagului, farmacocinetica diferită a fagilor (Golkar Z., 2014).

PAW - apa încărcată cu plasmă rece - Non-thermal plasma activated water (PAW) este studiată la momentul actual ca metodă de decontaminare și dezinfecție. Diferite cercetări la nivel mondial au ca subiect utilizarea plasmei în industria alimentară (Vleugels ș.a., 2005); tratamentul antimicrobian (Laroussi ș.a., 2003); materiale sensibile la căldură (Deilmann ș.a., 2008); boli parodontale și suprafața dinților (Dexi ș.a., 2011; Sladek ș.a., 2007).

Utilizarea PAW în dermatologie ar putea reprezenta o soluție viabilă, având în vedere mecanismele de rezistență bacteriană la antiseptice și dezinfectante precum și fenomenul de antibio rezistență. În "bătălia" mondială asupra infecțiilor stafilococice, un caz aparte este reprezentat de *Staphylococcus aureus* metilicilino-rezistent (MRSA), considerat a fi o amenințare globală (Grundmann ș.a., 2006), astfel încât dezvoltarea unor tratamente topice alternative este obligatorie.

Terapia homeopată În farmacologia modernă, acțiunea remediilor homeopatice este explicată prin intervenția mecanismelor de feed-back, în cadrul cărora specificitatea și semnificația informațională pentru sistemul dereglat, a elementului identic sau similar reglator (remediul homeopat) sunt mult mai importante față de cantitatea de substanță-informație (Boiron,, 2011; Dobrescu, 2011; Năstasă, 2008).

În dermatologie, terapia homeopată utilizează cel mai des: *Belladonna*, *Apis Mellifica*, *Rhus Toxicodendron*, *Mezereum*, *Hepar Sulfur*, *Kalium Bichromicum*, *Lycopodium*, *Natrum Sulfuricum*; remedii ce vin în completarea strategiei de vindecare alături de antibioterapie. Dacă aceasta din urmă are ca scop distrugerea agentului patogen, terapia homeopată vine să elimine/diminueze efectele infecției bacteriene asupra organismului: leziunile eritematoase și edematoase; pustule, cruste, exudat purulent, prurit, alopecie, abcese. Reușita unei terapii homeopate se bazează pe identificarea corectă a remediilor simptomatice și a remediului de teren (urmează modul de reacție al pacientului în timp și spațiu) (Vithoulkas G., 2002).

Prezentăm succint cele mai utilizate remedii în piodermatite, sub aspectul utilizării în patologia dermatologică veterinară:

Staphilococcinum– remediu bioterapic, se prepară din lizatul a două culturi de *S. aureus*, unul hemolitic și unul nehemolitic. Indicațiile clinice sunt: furuncule, impetigo, panarițiu, flegmon, stafilococia malignă a feței, toate indicațiile clinice ale stafilococului, ș.a.

Belladonna– indicată în: inflamații la debut, abces în formare (tumor, calor, dolor, rubor), dermatită eritematoasă (piele roșie și caldă), în mod particular dermatitele pavilionului urechii, dermatitele inghinale sau abdominale.

Apis Mellifica– remediu al inflamației acute cu apariție bruscă și dezvoltare violentă. Se utilizează în toate tipurile de edem acut sau cronic, alergic sau inflamator, însoțit de prurit și ameliorat de aplicații reci, dermatite eritematoase ameliorate de aplicații reci, prurit, abces, panarițiu la debut.

Rhus Toxicodendron– utilizat în dermatoze veziculoase sau eritemato-edematoase; eczema acută veziculoasă a câinelui, cu prurit intens și roșeața pielii; toate afecțiunile microbiene sau virale în prezența semnelor caracteristice.

Hepar Sulfur – sulfura de calciu a lui Hahnemann (amestec de sulf și calcar din cochilia de stridie) obținut prin calcinarea unui amestec în părți egale de floare de sulf purificată și calcar de scoică. Acțiunea remediei se manifestă electiv asupra pielii și mucoaselor: inflamație cu tendință marcată la supurație. Este utilizat în medicina veterinară în procese supurative acute (alături de *Pyrogenium*, *Mercurius*, *Echinacea*, *Silicea*, isoterapicele puroiului); abcese, furuncule, hidrosadenita, panarițiu, otită (prevenirea evoluției spre supurație), abcese ale conductului auditiv. Este remediu dominant al supurației acute. Se administrează și în supurațiile cronice cu miros dezagreabil; catar auricular cu secreție urât mirositoare.

Kalium Bichronicum – substanța care se prezintă sub formă de cristale roșii-portocalii, acțiune electivă și asupra pielii, nivel la care provoacă și vindecă erupții de diverse forme și ulcerații cu margini nete. La nivelul pielii este indicat în: erupții exantematoase, papuloase sau pustuloase, exudații vâscoase, galbene sau galben-verzui, puțin sau deloc dureroase; supurații cronice; otită catarală sau seroasă cu secreții galbene pruriginoase, cu tendința purulentă; impetigo.

Lycopodium Clavatum– se prepară prin triturarea sporilor de lycopodium (pedicuță). Acționează în: dermatoze seboreice, otite recidivante cu leziuni eczematoase sub formă de pelicule, secrețiile sunt galbene, vâscoase, purulente, iar pruritul persistă chiar și în timpul somnului; alopecie; erupții dorso-lombare crustoase și umede, cu prurit intens ameliorat la răcoare (Toma ș.a., 2002, Issautier, 1988, Năstasă, 2008).

Înainte de administrarea remediei simptomatice și/sau teren, frecvent se procedează la un drenaj: hepatic, renal, intestinal. Pielea nu este doar un organ prin ea însăși, reprezintă o proiecție, arată starea internă a organismului. Atunci când există blocaje la nivelul organelor de drenaj, fie că este vorba de ficat, rinichi, intestine aflate în suferință, pancreas, se constată adeseori probleme de suprainfecție la nivel dermic. În același timp, un dezechilibru în statusul hormonal, poate favoriza o suprainfecție cutanată cu germeni banali, comensali. Remediile folosite frecvent în drenajul homeopat sunt: *Berberis Vulgaris*, *Chelidonium Majus*, *Nux Vomica*, *Saponaria Officinalis*, *Fumaria Officinalis*, ș.a.

2.3.3. Managementul terapiei în piodermită

Putem defini managementul terapiei în piodermită ca fiind modul în care se aplică setul de măsuri terapeutice pentru obținerea celor mai bune rezultate în intervalul de timp cel mai rezonabil pentru situația dată. Desigur vorbim de management în cazuri ceva mai complicate, respectiv acele situații în care există:

- imunodeficiență primară sau secundară: alergii, autoimunopatii, tratamente cu corticosteroizi, etc;
- endocrinopatii (hipotiroidism, hiperadrenocorticism) și/sau neuropatii;
- sindrom seboreic și/sau tulburări de cheratinizare;
- dermatopatii de origine parazitară, micotică.

În oricare din cazurile enumerate mai sus, managementul terapiei va avea ca scop:

1. Diagnosticarea și tratarea entității **patologice primare**.
2. Începerea **tratamentului piodermitei**, ținând cont de: gravitate, dacă este primul puseu sau recidivantă/trenantă, starea generală a pacientului, vârsta, parametrii hepato-renali (având în vedere hepato/nefro toxicitatea anumitor antibiotice), semnalarea eventualelor alergii la antibiotice, etc..
3. Inițierea **tratamentului antipruriginos**, acolo unde este cazul, recunoscut fiind ca factor agravant al piodermitei (Miller, 2013).
4. Urmărirea **eradicării entității bacteriene** incriminate, atât din aria lezională cât și din zonele de portaj, pentru a se preveni reinfectarea.
5. Măsuri de **igienizare a habitatului** pacientului, a celorlalte animale cu care acesta vine în contact, pentru a preveni astfel recolonizarea bacteriană.

În tratamentul piodermitelor, utilizarea pe termen lung a glucocorticoizilor este interzisă. Chiar dacă duce la diminuarea inflamației și a pruritului, simptome deloc de neglijat prin disconfortul creat animalului dar și proprietarului, efectul de recul este considerabil. Utilizarea îndelungată a acestora reprezintă o cauză majoră de cronicizare; o banală foliculită se poate transforma astfel în furunculoză (Solcan, 2003).

Pentru prevenirea recidivelor, trebuie avut în vedere în primul rând ca, pe lângă tratamentul specific piodermatitelor, boala primară să fie corect diagnosticată și tratată. Managementul unei piodermite recurente cronice trebuie să ia în considerare și o stare de imunodeficientă. Indiferent dacă aceasta este confirmată sau nu de examenele paraclinice, imunomodularea poate fi o opțiune, acest tip de tratament îmbunătățind răspunsul imun al animalului. Administrarea de levamisol (2,2 mg/kg q12h) și cimetidină (6-10mg/kg , q 8h) este benefică la aproximativ 10% din câinii cu infecții recurente idiopatice (Miller, 2013).

PARTEA A- II -A - CERCETĂRI PROPRII
PART II – PERSONAL CONTRIBUTION

CAPITOLUL 3. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR

CHAPTER 3. PURPOSE AND OBJECTIVES OF THE RESEARCH

Cercetările desfășurate au avut un puternic caracter interdisciplinar, clinică-microbiologie, propunându-ne să oferim o perspectivă mai degrabă etiologică asupra dermatitelor bacteriene la câini și pisici. Am considerat interesantă și oportună o astfel de abordare pentru aprofundarea „motivelor” pentru care clinicianul are în față un anumit tablou clinic, piodermita are o anumită evoluție și mai ales o parte din motivele pentru care antibioterapia are sau nu succes. Acest ultim aspect se referă în mod deosebit la prezența tulpinilor MRSA și MRSP, cu implicații majore în conduita terapeutică, în cazurile grave chiar cu decizii medicale radicale.

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*. Desigur, scopul final a fost acela de a aduce clinicienilor veterinari un set de 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”. Utilitatea unui astfel de studiu a fost argumentată de realitatea instituirii tratamentelor de primă intenție, în lipsa unui diagnostic de laborator și a unei antibiogramme și a fost confirmată de datele obținute.

Implicit rezultatele obținute au avut ca scop să contribuie la stoparea selectării de tulpini rezistente, antibiorezistența fiind un subiect de mare actualitate și importanță.

Dealtfel, la nivel mondial există o asiduă preocupare privind nu atât descoperirea de noi antibiotice, cât găsirea de alternative terapeutice, substanțe sau molecule din natură, semisinteză sau chiar sintetice; cum ar fi de exemplu nano peptide polimerice cu efecte antimicrobiene (Lam S.J., 2016).

Subscris scopului general al cercetărilor a fost și analiza eventualelor corelații între „bagajul” genetic (o parte din factorii de patogenitate) și tabloul lezional prezentat de pacient.

Obiectivele și activitățile prin care s-au realizat cele prezentate mai sus, 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 fenotipice a speciilor *S.aureus* și *S.pseudintermedius*

Abalașei (Lipovan) Irina Elena

- Caracterizarea genotipică a *S.aureus* și *S. pseudintermedius*, privind unele gene de virulență și rezistența la unele antibiotice.
- 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 activată cu plasmă rece (PAW).
- Analiza statistică.

CAPITOLUL 4. INVESTIGAȚII EPIDEMIOLOGICE PRIVIND PIODERMITELE ÎN REGIUNEA DE NORD EST A ROMÂNIEI

CHAPTER 4. EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATIONS REGARDING PYODERMAS IN DOGS AND CATS IN THE NORTH- EAST REGION OF ROMANIA

4.1. Materiale și metode

Cazuistica a provenit din clinicile Facultății de Medicină Veterinară, cabinetele veterinare din județul Iași, județe limitrofe – Vaslui, Neamț, Suceava și Botoșani precum și cazuri individuale, fiind reprezentată de un total de 163 pacienți. Diagnosticul clinic, după criteriile prezentate în prima parte a tezei, a încadrat cazurile luate în studiu în dermatite superficiale și profunde, precum și otite externe (Tabelul 4.1.):

Tabelul 4.1./Table 4.1.

Cazuistica luată în studiu în perioada 2013 – 2017.

Case study, during 2013 - 2017

Nr.total de cazuri	Specie		Dermatită superficială	Dermatită profundă	Otită externă
	Câine	Pisică			
163	98	65	86	42	35
%	60,12%	39,87%	40%	30,5%	29,4%

Probele analizate au fost reprezentate de cruste, exudat exprimat după îndepărtarea crustelor, scuame, secțeții purulente, sanguinolente, secreție otică (fig.4.1.-4.16).



Fig.4.1. Pisică, zona perianală, eritem, plăci de grataj (original)

Fig.4.1. Cat, perianal area, erythema, grating plates (original)



Fig.4.2. Câine, pustule, alopecie generală, cruste(original)

Fig.4.2. Dog, pustule, general alopecia, crusts (original)



Fig.4.3. Pisiță, cruste zona cervicală (original)
Fig.4.3. Cat, crusts, cervical area (original)



Fig.4.4. Pisiță, ulcerații cutanate (original)
Fig.4.4. Cat, cutaneous ulceration (original)



Fig.4.5. Câine, vezicule-diferite stadii (original)
Fig.4.5. Dog, vesicles different stages (original)



Fig.4.6. Câine, fistule interdigitale (original)
Fig.4.6. Dog, interdigital fistulas (original)



Fig.4.7. Câine, piogranulom (original)
Fig.4.7. Dog, piogranuloma (original)



Fig.4.8. Câine, scuame psoriaziforme (original)
Fig.4.8. Dog, psoriasiform flakiness (original)



Fig.4.9. Câine, ulcerare pavilionul auricular (original)

Fig.4.9. Dog, ulceration auricular pavilion (original)



Fig.4.10. Pisică, supurație, abces, zona pelvină (original)

Fig.4.10. Cat, suppuration abscess, pelvis area (original)



Fig.4.11. Câine, cruste, fisuri, dermatită de jonțiunecutaneo-mucoasă(original)

Fig.4.11. Dog, crusts, cracks, dermal cutaneous mucosal junction (original)



Fig.4.12. Câine, ulcerare cu exudație seropurulentă (original)

Fig.4.12. Dog, ulceration with seropurulent exudation(original)



Fig.4.13. Pisică, cruste, eritem, exudat purulent(original)

Fig.4.13. Cat, crusts, erythema, purulent exudate(original)



Fig.4.14. Câine, abces zona toracală(original)

Fig.4.14. Dog, abscess thorax area (original)



Fig. 4.15. Câine, abces , pavilion auricular(original)

Fig. 4.15. Dog, hemorrhagic absces, auricular pavilion(original)



Fig.4.16. Câine, hiperkeratoză, seboree (original)

Fig.4.16. Dog, hyperkeratosis, seborrheic(original)

Metodele de încadrare a dermatitelor în bacteriene, micotice sau parazitare au fost cele descrise în prima parte a tezei, diagnosticul diferențiat făcându-se pe baza suspiciunilor date de tabloul lezional, urmat de examenele de laborator specifice fiecărui tip de dermatită (Mircean, 2014) (Tabelul 4.2.).

Tabelul 4.2./Table 4.2.

Diagnosticul dermatitelor bacteriene, micotice și parazitare
Diagnosis of bacterial, fungal and parasitic dermatitis

	Dermatită bacteriană	Dermatită micotică	Dermatită parazitară
Tablou lezional	Leziuni frecvent umede , supurative cu exudație seroasă sau sero-hemoragică, urmate de secreții purulente. Ulcerații, fistulizări , alopecie și eritem. Descumări și cruste.	Smocuri de păr cere devin casante și rezultă aspectul de “ros de molii” . Evoluție centrifuga. , placarde numulare foarte bine delimitate. Leziunile sunt asimetrice , au un aspect uscat .	Tabloul lezional este extrem variat și oarecum specific fiecărei forme de: demodecie localizată sau generalizată Râie sarcptică sau otodectică Cheiletieloză, malofagoza, parazitismul cu pulicide
Examine paraclinice	Ex. citologic, Ex.bacterioscopic direct Ex.bacteriologic Antibiograma aprofundează diagnosticul etiologic	Ex.microscopic direct , citologic, lampa wood, cultural	Raclajul cutanat , Ex.coproparazitologic, biopsie cutanată, test serologic(pt.râia sarcptică)

Materialele și metodele utilizate, precum și pașii urmați în diagnosticarea piodermitelor au fost:

- Examenul citologic – colorația uzuală este DiffQuik, însă la fel de utilă a fost colorația Gram, asimilând citologia cu examenul bacterioscopic direct. Preparatele au fost realizate prin tehnici diferite (bandă scotch, amprentare sau etalarea secreției) funcție de tipul de piodermită (Mendelsohn, 2006). (Fig.4.17., 4.18).

- Examenul bacterioscopic direct s-a efectuat de fapt simultan cu cel citologic și a urmat tehnica colorării Gram. Acolo unde au existat suspiciuni de bacterii acido-rezistente s-a efectuat colorația Zielh-Nelson clasică și modificată Fite-Faraco, pentru suspiciunile de *Nocardia* spp. (Greene, 2006; Sykes, 2014).(Fig.4.19- 4.22.)

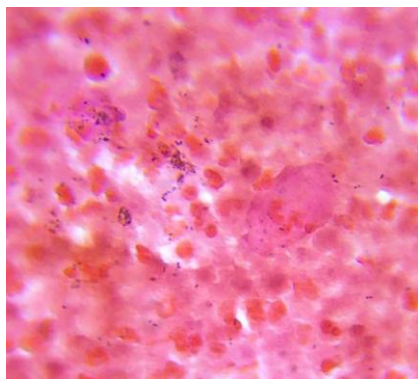


Fig.4.17 F.D., col Gramx100, neutrofile degenerate, coci gram pozitivi (original)
Fig.4.17 F.D., Gram x100, degenerated neutrophils, gram positive cocci (original)

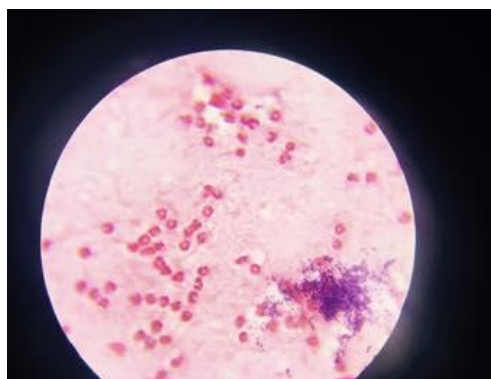


Fig.4.18. F.D., col Gramx100, neutrofile nedegenerate, coci gram pozitivi(original)
Fig.4.18. F.D., Gram x100, non-degenerated neutrophils, gram positive cocci (original)

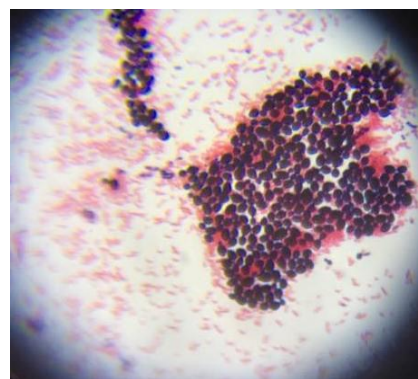


Fig.4.19. FD, col Gramx100, Malassezia (original)
Fig.4.19. FD, col Gramx100, Malassezia(original)

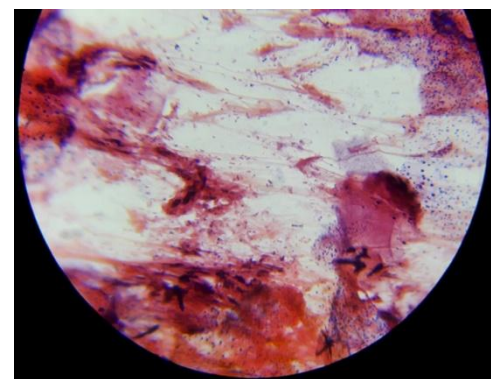


Fig.4.20. col Gram x 100, bacterii gram pozitiv și gram negativ (original)
Fig.4.20. Gram x 100 gram, gram positive and negative bacteria (original)

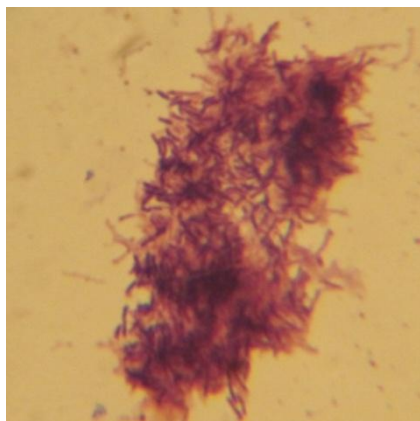


Fig.4.21. FD, col.Gram x 100,filamente *Nocardia* spp(original)

Fig.4.21. FD, col.Gram x 100, *Nocardis* spp. filaments(original)

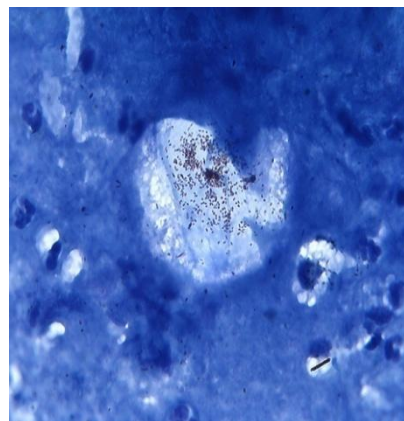


Fig.4.22. FD, col.Ziehl-Neelsen x 100 bacilli acido-rezistenți(original)

Fig.4.22. FD, col.Ziehl-Neelsen x 100 acid-resistant bacilli (original)

- Examenul bacteriologic a constat în cultivarea pe bulion BHI, în cazul probelor mai uscate (cruste) și pe medii solide, uzuale și speciale: Agar Sânge, Chapman, Sabouroud, Pseudomonas CN Selective, Levine, Lowenstein, etc. Colorațiile au fost cele indicate pentru fiecare caz în parte (Carp Cărare C., 2014). Întrucât *Staphylococcus* spp. reprezintă agentul etiologic principal al piodermitelor, (Paterson, 2008) examenul bacteriologic a urmărit identificarea speciilor de *Staphylococcus* izolate. Identificarea inițială a tulpinilor, a constat în însămânțarea probelor pe agar sânge de cal (fig.4.23) și agar sare manitol (fig.4.24)- mediu selectiv pentru bacterii Gram pozitive, halofile, urmărindu-se fermentarea manitolului. Incubarea a fost făcută la 37°C timp de 18-24 ore. Izolatele au fost identificate după caracterele culturale și morfologice în frotiuri colorate Gram , capacitatea de a crește pe agar sare manitol. Tulpinile, care în plăci au schimbat culoarea mediului în galben intens și persistent, au fost notate prezumtiv ca aparținând speciei *S. aureus*.

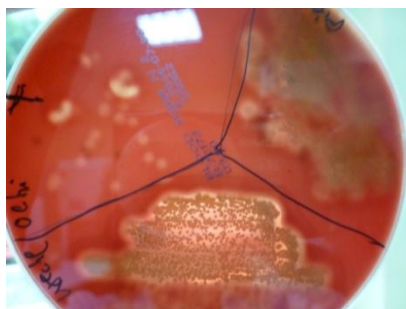


Fig.4.23. *Staphylococcus*.spp mediu agar sânge (original)

Fig.4.23 *Staphylococcus* spp., blood agar medium(original)



Fig.4.24. Fermentarea manitolului (original)

Fig.4.24. Fermentation of mannitol(original)

Pentru fiecare din coloniile izolate obținute s-a efectuat testul catalazei (peroxid de hidrogen 3%). Tulpinile care au dat un rezultat intens manito pozitiv au fost testate cu STAPHYTECT PLUS, test de aglutinare latex pentru identificarea *S.aureus* prin detectarea factorului de agregare, proteina A și anumite polizaharide care se regăsesc la tulpinile metilicilino-rezistente (Fig.4.25).

Restul tulpinilor de *Staphylococcus* spp. izolate prin metodele descrise, au fost identificate cu ajutorul RapiD Staph Plus Panel – Remel (SUA), pe baza a 18 teste biochimice (Fig.4.26).

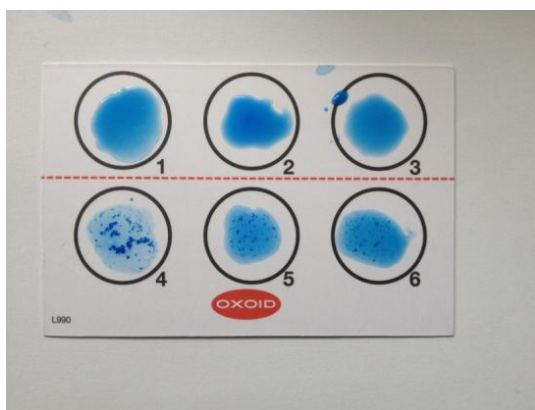


Fig.4.25. Test de aglutinare latex. Stanga, tulpina martor pozitiv *S.aureus* ATCC 25923 (original)

Fig.4.25. Latex agglutination test. Left, positive control strain *S.aureus* ATCC 25923 (original)



Fig.4.26. Galerii RapiD Staph Plus Panel (original)

Fig.4.26. RapiD Staph Plus Galleries Panel (original)

S-a efectuat testul coagulării plasmei citratate de iepure (BioRad), cel mai important test de patogenitate în ceea ce privește *Staphylococcus* spp. (Fig.4.27).



Fig.4.27. Testul de coagulare a plasmei citratate de iepure (original)

Fig.4.27. The Clotting of Rabbit Plasma (original)

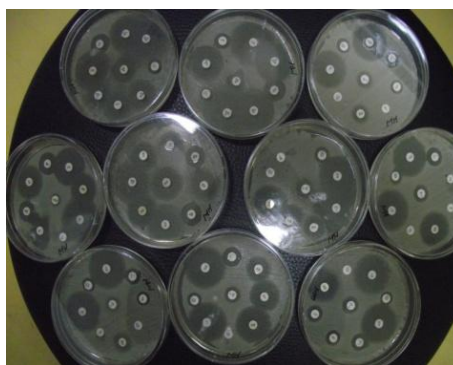


Fig.4.28. Antibioame (original)

Fig.4.28. Antibioamograms (original)

- Antibiograma – s-a utilizat metoda Kirby-Bauer cu interpretare după standardul CLSI (CLSI, 2014) (Fig.4.28.). Tulpinile de *S.aureus* izolate și identificate au fost testate privind metililino-rezistența (martor pozitiv ATCC 43300). S-au utilizat microcomprimate (Oxoid) de cefoxitin (10μg)-incubare la 35°, 18-20h și oxacilin (1μg)-incubare la 30°, 24h (Kali, 2014). S-au utilizat suspensii de culturi la o dilutie de 0,5 McFarland (densitometru automat McFarland–DEN1). Conform recomandărilor BSAC, EUCAST, CLSI, detectarea metililino rezistenței este obligatorie la toate tulpinile de *S.aureus* obținute din cazurile clinice (Andrews ș.a., 2011).

4.2. Rezultate și discuții

4.2.1. Aspecte clinice în cazurile de dermatite și otite luate în studiu

Din punct de vedere clinic, anamneza și tabloul lezional au condus la un diagnostic prezumtiv, după cum urmează: cele 86 de cazuri de dermatită superficială au fost reprezentate într-un procentaj de peste 80 (68 cazuri) de sindrom de proliferare bacteriană, exprimate clinic prin leziuni localizate inițial în zonele cu o mai mare secreție sebacee- inghinal, axilar, pliurile gâtului (leziuni care ulterior se generalizează la nivel toraco-abdominal); alopecie eritematoasă, zone de îngroșare ale pielii, hiperpigmentație, uneori miros neplăcut, zone cu eroziuni, lichenificație.

Dermatitele profunde au fost clasificate în: furunculoză (11 cazuri), acnee (9), celulită (12), abces (2), dermatita interdigitală (2), furunculoză eozinofilică nazală (2), pododermatită (2).

Având în vedere continuitatea țesutului cutanat la nivelul pavilionului urechii și a conductului auditiv extern precum și infectarea ascendentă, de la nivelul dermului, 35 cazuri (29,4%) de otită externă au fost incluse în cazuistica dermatologică. Probele recoltate au constatat în secreții otice seropurulente și/sau purulente, de culoare alb gălbuie și/sau galben-verzuie. Pacienții au prezentat în unele cazuri eritem sau abces hemoragic la nivelul pavilionului auricular, cruste, uneori miros neplăcut, durere.

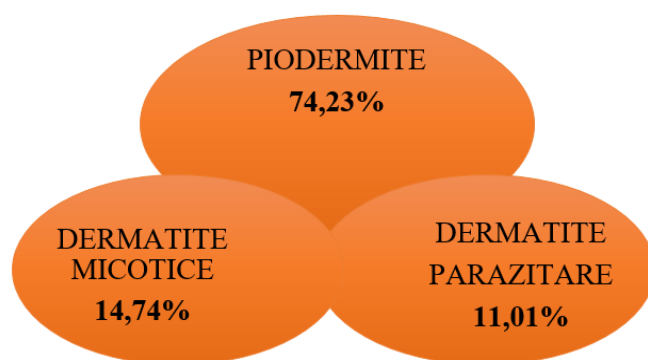


Fig. 4.29. Ponderea dermatitelor și otitelor funcție de natura lor
Fig.4.29 The proportion of dermatitis and otitis depending on their nature

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. Considerăm că sunt valori relativ mari explicabile, pe de o parte din cauza întârzierii prezentării la medicul veterinar, pe de altă parte din cauza lipsei laboratoarelor de specialitate pentru un diagnostic cert și în consecință, instituirea unor tratamente greșite sau incomplete. Nu a fost diagnosticat nici un caz cu toate cele trei forme de dermatită (Fig.4.29.).

Boala primară diagnosticată cu cea mai mare prevalență, a fost dermatita atopică. Din cei 98 de câini prezentați pentru diagnosticarea piodermitei, 23 au fost prezentați cu diagnostic confirmat de dermatită atopică (23,4%), cu tabloul clinic specific acestei patologii. Criteriile de diagnosticare au fost cele propuse de Favrot (Favrot, 2010). La toate cele 23 de cazuri a fost confirmată infecția bacteriană cutanată cu *S.pseudintermedius*.

Unul din cele mai grave cazuri de piodemodectie a fost diagnosticat la un Boxer în vârstă de 1 an, mascul, la care în jurul vârstei de 5 luni a debutat o alopecie localizată la nivelul feței, nepruriginoasă, cu piele eritematoasă și acoperită cu scuame. Fără analize de laborator, s-a instituit un tratament pe care proprietarul nu l-a putut preciza. Ulterior leziunile s-au extins pe tot corpul, devenind și pruriginoase. Chiar dacă s-a instituit antibioterapia, tabloul lezional s-a agravat și a trenat până în momentul prezentării pentru examene specifice de microbiologie. Ridicându-se suspiciunea de demodectie, în urma raclajului cutanat au fost identificate două specii de demodex, *D.canis* și *D.cornei*. A fost singurul caz la care s-au identificat la același câine două specii de Demodex, fapt care a explicat eșecul terapeutic anterior și trenarea piodermitei, în ciuda antibioterapiei instituite.

Într-o ierarhizare a gravității lezionale s-a constatat că cele mai grave cazuri au prezentat triada: supurație – ulceratie - fistulizare, însoțite de la caz la caz de durere, activarea limfonodurilor regionale, inapetență, apatie, în unele cazuri stare subfebrilă. Acest tablou lezional a fost identificat în două cazuri de otite la câine (fig. 4.9., 4.15.), patru cazuri de pododermatite la câine, un caz de nocardioză la pisică (fig.4.4.) și un caz de abces la câine (fig.4.14.).

Fiind mai rar diagnosticat, prezentăm în continuare, din punct de vedere al tabloului clinic, unul din cele două cazuri de nocardioză. Pisică, în vârstă de patru luni, a fost adusă la clinica de medicală cu dilacerare dermică începând de pe partea posterioară a coapsei drepte până la ultima coastă a hemitoraxului drept și fractură deschisă femurală, răni produse de mușcătura profundă a unui câine. S-a intervenit chirurgical și s-a inițiat antibioterapia cu AMC (12,5 mg/kg PO q12h), timp de 7 zile. Recuperarea a fost completă în trei săptămâni, după care în săptămâna 4, pisica a fost adusă înapoi cu multiple ulceratii apărute în 24h, în zona dilacerării inițiale (fig.4.30.). Starea generală era bună, afebrilă, apetit prezent, cu excepția utilizării cu greutate a membrilor posterioare, durerea fiind

intensă. S-au identificat mase indurate ale țesuturilor subcutanate, cu buzunare care conțineau material purulent cu granulații fine (fig.4.31.).



Fig.4.30. Pisică, ulceratii (original)
Fig.4.30. Cat, ulcerations (original)



Fig. 4.31. Material purulent, nocardioză (original)
Fig. 4.31. Purulent material, nocardiosis (original)

Prezența acestor granulații fine, este un amănunt important pentru clinicieni, întrucât ridică suspiciunea de actinomicoză/nocardioză, piodermite care necesită o perioadă mare de antibioterapie (peste 3 luni), examenul microbiologic fiind cu atât mai important și obligatoriu (Wheeler ș.a., 2005). Cel de-al doilea caz de nocardioză a fost unul fatal. A fost vorba de o pisică care a avut o înțepătură profundă în zona toracală, eveniment tratat de proprietar cu dezinfecție locală, fără antibioterapie, fără a se prezenta la medicul veterinar. După aproximativ o lună, pisica a prezentat brusc febra ridicată (41°C), dispnee pronunțată, stare generală alterată. După examenul radiologic care a evidențiat pleurezie, a fost recoltată o probă care avea același aspect ca în cazul prezentat anterior. Deși a fost instituită antibioterapia de primă intenție (Enr, 5mg/kg/24h), pacientul a decedat, prezentarea la cabinetul veterinar fiind tardivă. Emitem ipoteza că nocardioza pulmonară a fost o consecință a formei cutanate, întrucât forma cutanată a nocardiozei, netratată, evoluează sistemic cu forma osoasă, urmată de cea pulmonară (Sykes, 2014).

În cazul celor două suspiciuni de tuberculoză cutanată, anamneza a arătat că pacienții- un ciobănesc, mascul de 6 ani și un metis, mascul în vârstă de 3ani - locuiau în afara orașului, la marginea unei păduri. Leziunile cutanate au apărut după un episod de scăldat în lacurile din preajma pădurilor și au constatat în apariția unor formațiuni nodulare, cu dimensiuni cuprinse între 2- 8 cm (fig.4.32; fig.4.33.).

Lipsa simptomatologiei sugestive pentru tuberculoza pulmonară sau abdominală, confirmată prin analize paraclinice, investigații radiologice și ecografice, au dus la concluzia că au fost implicate specii nontuberculoase (saprofite/ comensale), ocazional patogene cum ar fi: *M. intracellulare* (dau infecții sporadice la om și animale), *M. smegmatis* (prezent pe mucoase la om și animale, rar în sol, apă), etc.(Falkinham, 2016).

Examenul bacteriologic direct, efectuat după recoltarea din formațiunile nodulare a unui material purulent grunjos, a confirmat prezența de bacili de dimensiuni mici, acido-rezistenți (colorația Ziehl-Nielsen). Cultivarea pe medii speciale pentru mycobacterii (Lowenstein) a confirmat prezența de *Mycobacterium spp.*



Fig.4.32. Câine, formațiune nodulară articulația humero-radio-ulnară (original)

Fig.4.32. Dog, nodular formation the humero-radio-ulna joint (original)



Fig.4.33. Câine, formațiune nodulară reg.buccinatorie stângă (original)

Fig.4.33. Dog, nodular left buccinatorie region(original)

Cazurile în care piodermita a trenat, pe o perioadă lungă de timp (între 3 și 6 luni) în ciuda antibioterapiei, au fost determinate de existența patologiilor primare nediagnosticate. Au fost patru cazuri confirmate de hipotiroidism și șase cazuri de demodecie (Lipovan, ș.a., 2015). Deși au existat două suspiciuni de Cushing la câine, acestea nu au fost confirmate de examenele paraclinice.

Prezentăm succint cazul de piodermită trenantă, secundară hipotiroidismului, reprezentativ pentru importanța diagnosticării precoce și corecte a oricărei afecțiuni primare.

La indicația medicului curant, a fost prezentat un cockel spaniel în vârstă de 9 ani, pentru investigații microbiologice privind piodermita severă recurentă și otita externă bilaterală, care în ciuda tratamentelor anterioare (antibiot terapie cu AMC, ENR, indicate de antibiogramă) nu se vindeau. La examenul clinic dermatologic s-au observat părul uscat și fragil, coada șobolanului, hiperpigmentarea și hiperkeratoza pe zona axială și inghinală, seboree, mixoedem și expresia facială tragică (fig.4.34. și fig.4.35.). Examinările clinice și fizice au evidențiat, de asemenea, o frecvență cardiacă scăzută de 70 bpm, letargie, obezitate (BSC: 7 din 9) și intoleranță la efort fizic și frig.

Examentele microbiologice au evidențiat o piodermită stafilococică și otită bacteriană cu floră asociată: *Proteus spp*, *Pseudomonas spp* și *S.pseudintermedius*. Testele de susceptibilitate la antibiotice au indicat următoarele antibiotice pentru toate speciile bacteriene izolate: penicilină, marbofloxacină și neomicină. Tratamentul pentru

piodermită a constat în administrarea de marbofloxacină 2 mg / kg sc / 24 ore, timp de cinci zile, a continuat cu administrare orală timp de șapte zile, iar pentru otită, soluția topică 3 mg / ml, 10 picături per ureche o dată pe zi . De asemenea, au fost prescrise băi zilnice cu șampon sau mouse de gluconat de clorhexidină 3,5%.



Fig.4.34. Cocker spaniel, 9 ani, piodermita recidivantă (original)

Fig.4.34.Cocker spaniel, 9 years, recurrent pyodermatitis (original)



Fig.4.35. Păr uscat și fragil, hiperpigmentare și hiperkeratoză (original)

Fig.4.35. Dry and brittle hair, hyperpigmentation and hyperkeratosis (original)

De asemenea, având în vedere aspectul fizic al câinelui, s-au recomandat investigații specifice pentru hipotiroidism. Biochimia serului a confirmat suspiciunea de hipotiroidism, relevând un nivel foarte scăzut de FT4 0,3 pmol / L (10-45 pmol / L), TT4 8,88 nmol / L (15-50 nmol / L), fosfatază alcalină crescută 208 U / L 10-101 U / L) și hipercolesterolemie ușoară de 269 mg / dl (116-254 mg / dl). Strategia terapeutică a hipotiroidismului a constat în administrarea de levothyroxină 10 µg / kg / 12 ore.

Câinele a fost reprogramat pentru evaluarea dermică și monitorizarea FT4 și TT4 în decurs de două săptămâni de la începerea tratamentului. La 8 săptămâni de la inițierea terapiei specifice pentru hipotiroidism, în paralel cu tratamentul pentru otită și piodermită, pacientul se prezenta precum este ilustrat în fig. 4.36 și fig. 4.37.



Fig.4.36. Regenerarea părului și dispariția leziunilor după 8 săptămâni de tratament (original)

Fig.4.36. Hair regeneration, lesions well Reduced (original)



Fig. 4.37. Rezoluția otitei externe cu refacerea aspectului normal al pavilionului urechii (original)

Fig. 4.37. External otitis resolution, restoration of normal appearance of ear pavilion (original)

Considerăm că este un exemplu clasic de piodermită și otită severă recurentă, la care terapiile anterioare nu au dat rezultate din cauza nediagnosticării afecțiunii primare.

4.2.2. Prevalența piodermatitelor și a diferiților agenți etiologici

Din totalul celor 163 de cazuri, 121 au avut etiologie bacteriană. Distribuția agenților bacterieni izolați și identificați este prezentată în tabelul 4.3.

Tabelul 4.3./Table 4.3.

Agenții etiologici identificați în piodermite și otite Etiological agents identified in pyoderma and otitis

Nr. Caz.	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Nocardia</i> spp.	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Proteus*</i> spp.
121	85	17	15	2	2	5

* izolat din otite în cultură mixtă cu *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp.

Asocierea *Proteus* spp. în cazurile de otită externă, într-un procent de 14,28%, este apropiată de raportările altor studii (Petrov ș.a., 2013)

Repartiția procentuală a bacteriilor implicate, este ilustrată în fig.4.38.

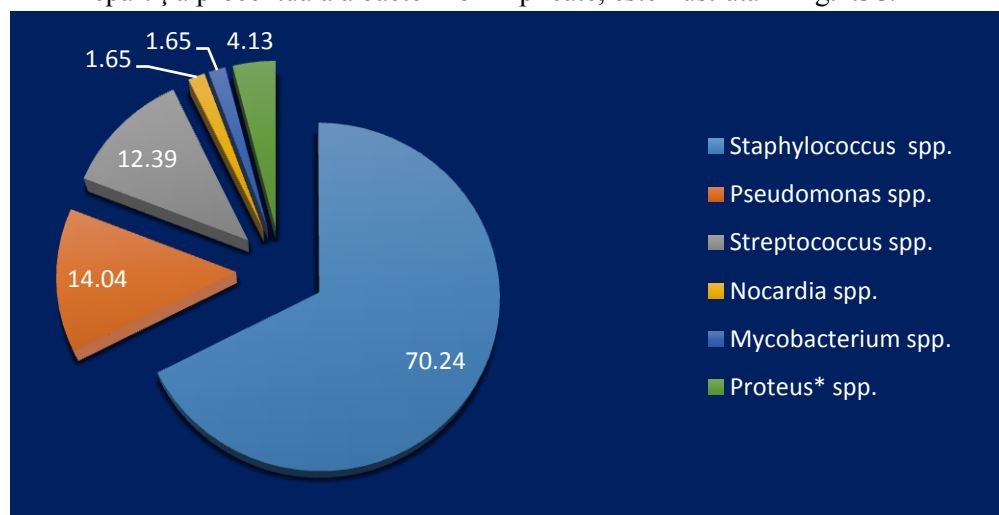


Fig.4.38. Diagrama prevalenței agenților etiologici în piodermatite la câini și pisici (original)

Fig.4.38. Diagram of prevalence of etiologic agents in dogs and cats pyoderma and otitis (original)

Identificarea fenotipică a celor 85 izolate de *Staphylococcus*, a evidențiat distribuția speciilor conform ilustrației din fig.4.39.

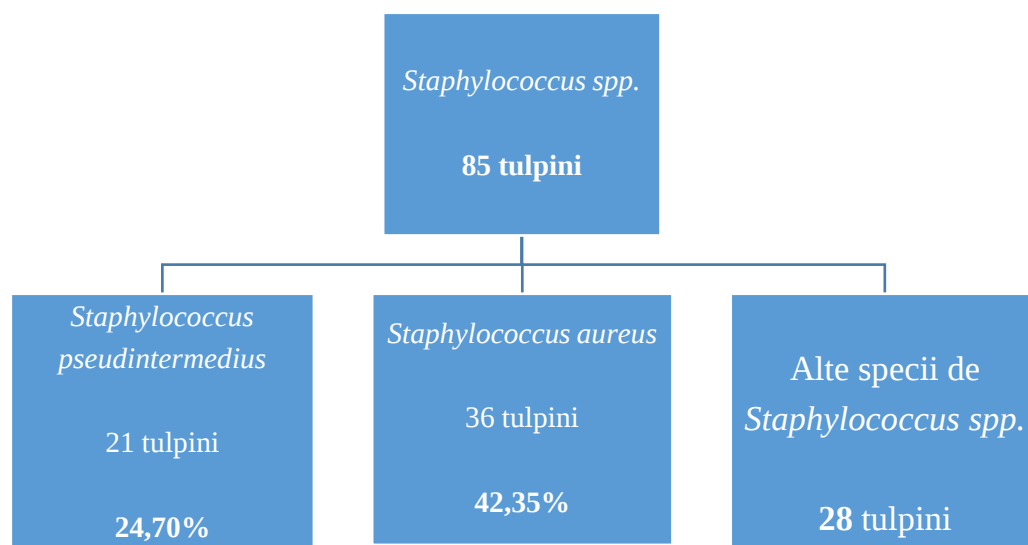


Fig.4.39. Principalele specii de Staphylococcus identificate
Fig.4.39. The main species of Staphylococcus identified

Din totalul de 36 tulpini de *Staphylococcus aureus*, 21 au fost identificate ca metilino-rezistente (58,33 %). Toate cele 21 tulpini de MRSA au provenit din material purulent.

Pe plan mondial, raportările privind incidența MRSA la nivel cutanat la animalele de companie, sunt diferite. În SUA (Rees ș.a., 2008), raportează o prevalență a MRSA de 10% la câinii sănătoși și 15% la pisicile sănătoase. În Germania, un studiu raportează o prevalență a MRSA la nivel cutanat de 41,37% (Vincze, 2014) (Tabelul 4.4.).

Tabel 4.4./Table 4.4.

Incidența MRSA la nivelul țesutului cutanat în diferite țări
The incidence of MRSA in the skin tissues in different countries

ȚARA/ANUL	SUA(2008)	GERMANIA(2014)	STUDIUL PREZENT
MRSA PREZENT LA NIVEL CUTANAT	25 %	41,37%	58,33%

Procentul de 58,33% depășește raportările din medicina omului - 39,86% MRSA raportat în 2006, într-un studiu efectuat în Spitalul Clinic de Urgență Târgu Mureș (Szekely ș.a., 2006).

O explicație posibilă a prevalenței crescute de MRSA raportat la total tulpini de *S.aureus* identificate, poate fi aceea că mai mult de jumătate din probe provin de la animale de companie la care s-a aplicat într-un mod neadecvat terapia de primă intenție. Recidivele sau lipsa de rezultate în protocolul terapeutic au convins proprietarii să accepte examenul de laborator microbiologic. 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 antibioretizente, fapt care, în final, afectează și sănătatea umană, lucru firesc având în vedere coabitarea atât de strânsă între om și animalul său de companie.

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/ulcerații/fistulizări.

4.3. Concluzii parțiale

1. În lotul inițial luat în studiu (163 cazuri), provenite de la 98 câini și 65 pisici, prevalența dermatitelor bacteriene a fost de 74,23%.
2. Complicațiile cu piodermite au fost identificate într-un procent de 60% la dermatitele micotice și 30% la dermatitele parazitare.
3. Din punct de vedere clinic, din totalul cazurilor de piodermatite luate în studiu, 40% s-au încadrat în dermatite superficiale, 30,5% în dermatite profunde, iar 29,4% au fost cazuri de otite.
4. Bolile primare diagnosticate, pe lotul studiat, au fost: dermatita atopică, hipotiroidismul și demodecia.
5. Agentul etiologic cel mai implicat în piodermite este *Staphylococcus spp.*(70,24%), urmat de *Pseudomonas spp.*(14,04%) și *Streptococcus spp.*(12,39%).
6. În lotul studiat, specia de stafilococi cu cea mai mare prevalență în piodermite și otita externă la câini și pisici a fost *S. aureus* (42,35%), urmată de *S. pseudintermedius* (24,7%).
7. Testările realizate au condus la identificarea unui procentaj de 58,33 tulpini MRSA.

CAPITOLUL 5. CARACTERIZAREA GENOTIPICĂ A IZOLATELOR STAFILOCOCICE ȘI ANALIZA STATISTICĂ

CHAPTER 5. GENOTYPIC CHARACTERISATION OF STAPHYLOCOCCAL ISOLATED STRAINS AND STATISTICAL ANALYSIS

Scopul epidemiologiei moleculare este atât clasificarea taxonomică sau filogenetică a microorganismelor, cât și identificarea patogenilor, determinarea surselor lor fizice, relațiile biologice, calea de transmitere; identificarea genelor responsabile pentru virulență, genelor ce codifică rezistența la antibiotice, etc.(Zadoks ș.a., 2006). Antibio rezistența, problema majoră în terapia bolilor infecțioase, impune aprofundarea cunoașterii agenților patogeni până la nivel de gene pentru a se putea deschide noi direcții de cercetare, pentru noi compuși antimicrobieni. Cel mai cunoscut și răspândit exemplu de antibio rezistență este cel al penicilinelor; dacă în 1941, când s-a utilizat pentru prima dată penicilina în infecțiile stafilococice, sensibilitatea acestora era de 100%, în prezent făcând parte din grupul antibioticelor betalactamice, se raportează procente mari de rezistență stafilococică. Dealtfel, încă din 1960 peste 80% din izolatele stafilococice (din spitale și comunitare) erau raportate ca fiind rezistente la penicilină. Tiparul de rezistență a apărut mai întâi în spitale și s-a răspândit ulterior în comunitate (Lowy, 2003).

5.1. Materiale și metode

Cercetările privind identificarea genetică și caracterizarea genotipică a izolatelor stafilococice s-au desfășurat prin Multiplex PCR, în cadrul laboratorului de Chimioterapie Antimicrobiană din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași și laboratoarele de Diagnostic Bacteriologic din cadrul FMV din Leahurst, Universitatea Liverpool, Marea Britanie. Linia pentru PCR a fost formată din: termociclor 2720 Applied BioSystems (Anglia) și termociclor BIORad (România); aparat de electroforeză BIO-RAD; transiluminator UVITEC (Anglia) și GelDoc de la BioRad (SUA). Față de PCRul clasic, Multiplex PCR utilizează mai multe perechi de primeri, fiind amplificate simultan mai multe secvențe țintă. Metoda generează mai multă informație, într-un timp mai scurt și costuri mai reduse. În acest caz, perechile de primeri trebuie să aibă temperaturile de alipire cât mai apropiate, lungimea fragmentelor amplificate să fie similară (Germini ș.a., 2004). Pentru identificarea speciilor de stafilococi au fost utilizate oligonucleotidele descrise (Sasazaky ș.a., 2010) pentru secvențele *au-F3* și *au-nucR* pentru *S.aureus* și secvențele *pse-F2* și *pse-R5* pentru identificarea *S.pseudintermedius* (Tabelul 5.1.).

Tabelul 5.1./Table 5.1.

Caracteristicile primerilor utilizați pentru PCR-multiplex
Characteristics of primers used for PCR-multiplex

Specia	Primer	Talia prod. amplificat (pb)	Secvența (5' - 3')	Temp. Dehibrid.
S. aureus	au-F3/ au-nucR	359	5'- TCGCTTGCTATGATT GTGG -3' 5'- GCCAATGTTCTACCA TAGC -3'	56°C
S. Pseudinterm.	pse-F2/ pse-R5	926	5'-TRGGCAGTAGGATT CGTTAA-3' 5'- CTTTTGTGCTYCMTT TTGG-3'	56°C

Principiul *Polimerase Chain Reaction* (PCR) are la bază mecanismul de replicare *in vitro* a ADN-ului, urmată de amplificarea unei secvențe țintă de ADN într-un număr mare de copii (Kubista ș.a., 2006). Etapele PCR, care se desfășoară în cadrul unui ciclu repetitiv de temperaturi, sunt:

1. **Denaturarea** -amestecul de reacție este încălzit la 95°C, moment în care cele două catene ale ADNului țintă sunt separate. Acest proces trebuie să fie complet, în caz contrar cele două catene se vor realipi (hibrida) odată cu scăderea temperaturii, iar primerii nu vor putea acționa (Kubista ș.a., 2006)

2. **Hibridarea primerilor** - după scăderea temperaturii la 45-68°C, primerii se atașează complementar la capetele 3' ale celor două catene.

3. **Elongația** – la temperatura de 72°C ADN polimeraza termostabilă extinde primerii atașați în lungul matriței și apare produsul PCR care reprezintă o copie a ADN/ARN țintă original denumit *amplicon*. Acest proces se repetă automat într-un număr de 30-35 cicluri; la fiecare ciclu cantitatea de ampliconi se dublează (Solcan ș.a., 2012).

Amestecul de reacție din *Thermal Cycler* -ul în care are loc amplificarea a conținut:

- **ADN-** ul țintă, extras din proba de analizat
- **Enzima** care facilitează sinteza lanțului complementar de acid nucleic
- **ADN polimeraza Taq** (izolată din *Thermophilus aquaticus*) pentru ținta ADN
- **Cofactori enzimatici** – Mg^{2+} și/sau Mn^{2+}
- **Primeri (P1 și P2)** - secvențe scurte, monocatenare, cu lungimea maximă de 20-30 nucleotide. Servesc ca punct de plecare pentru sinteza lanțului complementar cu ajutorul ADN polimerazei, marchează începutul și sfârșitul regiunii care va fi amplificată.
- **Deoxinucleotidele**, se atașează la capătul primerilor, pentru sinteza noii catene ADN. Ampliconul va conține deoxiuridina în loc de deoxitimidina, deosebindu-se astfel de ADNul nativ (Solcan ș.a., 2012).

Primerii utilizați reprezintă o componentă esențială a PCR, elementele importante pentru construirea primerilor fiind: lungimea, temperatura de alipire (depinde de temperatura de denaturare), gradul de omologie cu alte secvențe decât cea dorită, gradul de complementaritate dintre secvențele primerilor, conținutul G-C, secvențele A, G sau T,C, secvența de la capătul 3' (Somma ș.a., 2006).

Pentru extracția ADN-ului au fost folosite tulpini cultivate pe mediul Baird-Parker. Coloniile izolate obținute au fost suspendate în 0,5 ml sau 1 ml de apă distilată

Tulpinile bacteriene au fost inactivate prin căldură la 94°C timp de 20 de minute. ADN-ul a fost extras prin șoc termic (Heat Shock), cu treceri alternative timp de două minute într-o baie de apă la 100°C și gheață. După purificarea extractului, ADN-ul obținut a fost lipsit de proteine, nucleaze și alți contaminanți sau inhibitori.

Pentru a putea realiza amplificarea fragmentelor de ADN s-a utilizat mix-ul de la BIO-RAD, IQ Supermix, care este o modalitate convenabilă de amplificare, datorită reducerii riscului de contaminare și erorilor de pipetare.

Reacția de amplificare a avut loc în trei etape, prima dintre acestea desfășurându-se la 95°C, temperatură la care dublul helix al ADN-ului se desface. Într-o primă fază primul ciclu de denaturare a fost la 95°C, timp de 2 minute apoi 30 de cicluri de amplificare ce constau în denaturare la 95°C timp de 30 secunde, după care a avut loc hibridarea timp de 30 secunde la temperatura de 56 °C. Faza de elongare a avut loc la 72°C, timp de 1 minut și extensia finală la 72°C timp de 2 minute. După terminarea programului, probele au fost ținute la 4°C. Verificarea electroforetică a produșilor obținuți prin PCR-multiplex a fost realizată în gel de agaroză, metodă standard pentru separarea, purificarea și identificarea moleculelor de ADN, fiind o etapă obligatorie în orice protocol de analiză a acizilor nucleici. Analizarea ampliconilor a fost făcută prin utilizarea agarozei standard 1%, în tampon Tris-Acetate-EDTA (TAE) 1x.

Pentru vizualizarea ADN-ului amplificat, mixul pentru migrare a fost compus din 3 μl de marker (1000 pb Ladder, Promega) și câte 6 μl de amplicon din volumul total de reacție de 50 μl, care au fost depuși într-un gel de agaroză de 1% preparat cu tampon Tris-Acetate-EDTA și 0,5 μg/ml⁻¹ bromură de etidium (BET). Migrarea prin electroforeză s-a realizat cu o tensiune de 60V, timp de o oră. Benzile fluorescente rezultate au fost vizualizate cu ajutorul unui transiluminator GelDoc de la Biorad, iar imaginile au fost prelucrate cu softwer-ul QuantiOne® 4.2.1.

Pentru caracterizarea genetică a izolatelor stafilococice, au fost efectuate testări pe un număr de 76 tulpini de *Staphylococcus spp.* (Tabelul 5.2). Acestea au provenit de la 64 cazuri dermatite și 12 tulpini izolate din otite externe.

Tabelul 5.2./Table 5.2.

Proveniența și distribuția tulpinilor de stafilococi testate prin PCR
The origin and distribution of staphylococcus tested strains

Nr.de tulpini	Specie		S. pseudintermedius	S. aureus	Alți stafilococi	Manifestări	
	câini	pisici				cutanate	otite
76	52	24	36	5	35	64	12
	68,4%	31,5%	47,3%	6,5%	46%		

Am urmărit, utilizând primerii prezentați în tabelul 5.3, identificarea genelor ce codifică:

- ❖ Rezistența la antibiotice: *mecA*, *mup*, *fusB*, *FusC*, *fusD*, *mecC*
- ❖ Rezistența la antiseptice: *smr*, *qacA/B*
- ❖ Gene de virulență: *lukS*, *lukF*, *siet*, *sec_{canine}*, *expA/B*, *pvl*, *spa*
- ❖ Proteine formatoare de biofilm: *icaA*, *icaD*, *bap*,

Pentru extracția ADN, amestecul (2,3 colonii din cultură de 24h, suspensionate în 90 µl apă sterilă cu 10µl lizostafină) a fost incubat la 37°C (10 minute) și supus șocului termic (95°C, 10 min.). După adăugarea de 400 µl apă sterilă și vortexare, amestecul a fost centrifugat la 10.000 rpm-3 minute. Suspensia de ADN din supranatant a fost apoi separată de sediment. Aceasta etapă, de extracție a ADNului, a urmat protocolul prezentat mai sus pentru toate genele urmărite a fi identificate. Etapele ulterioare ale PCR au fost individualizate în funcție de specificațiile de identificare ale genei căutate (tabelul 5.3.– Referințe). Vizualizarea s-a realizat la iluminatorul UVITEC.

Tabelul 5.3./Table 5.3.
Primeri utilizați pentru identificarea genelor studiate
Primers used to identify the genes sought

Gene	Primeri	Annealing temp.	Dimensiune produs	Referințe
<i>lukS</i>	fw: 5'-TGTAAGCAGCAGAAAAATGGGG-3' rev: 5'-GCCCCGATAGGACTTCTTACAA-3'	57°C	503 bp	Futagawa, 2004
<i>lukF</i>	fw: 5'-CCTGTCTATGCCGCTAATCAA-3' rev: 5'-AGGTCATGGAAGCTATCTCGA-3'		572 bp	
<i>siet</i>	fw: 5'-ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGG-3' rev: 5'-CCATTACTTTTCGCTTGTGTGC-3'	56°C	359 bp	Lautz, 2006
<i>seC_{canine}</i>	fw: 5'-GGGAAGCTTGTAATTTGATATTCGCACT-3' rev: 5'-CCCGATCCTATCAAAATCGGATTAACA-3'	40°C	800 bp	Edwards, 1997
<i>expA</i>	fw: 5'-GCGCGTCCTTCTGATCCAGAACT-3' rev: 5'-AACGTCCCCCTTTACCTACGTGAAT-3'	58°C	574 bp	Walter, 2012
<i>fusB</i>	fw: 5'-CCGTCAAAGTTATTCAATCG-3' rev: 5'-ACAATGAATGCTATCTCGACA-3'	50°C	492 bp	Chen, 2010
<i>fusC</i>	fw: 5'-GGACTTTATTACATCGATTGAC-3' rev: 5'-CTGTCATAACAAATGTAATCTCC-3'	50°C	411 bp	
<i>fusD</i>	fw: 5'-AATTCGGTCAACGATCCC-3' rev: 5'-GCCATCATTGCCAGTACG-3'	57°C	465 bp	
<i>mupA</i>	5'-TATATTATGCGATGGAAGGTTGG-3' 5'-AATAAAATCAGCTGGAAGTGTTG-3'	57°C	458 bp	Anthony, 1999
<i>smr</i>	fw: 5'-ATAAGTACTGAAGTTATTGGAAGT-3' rev: 5'-TTCCGAAAAATGTTTAACGAAACTA-3'	48°C	285 bp	Couto, 2008
<i>qac A/B</i>	fw: 5'-GCTGCATTTATGACAATGTTTG-3' rev: 5'-AATCCCACCTACTAAAGCAG-3'	40°C	628 bp	
<i>icaA</i>	fw: 5'-CCTAACTAACGA AAGGTA G-3' rev: 5'-AAG ATATAGCGA TAA GTG C-3'	49°C	1315 bp	Vasuvedan, 2003
<i>icaD</i>	fw: 5'-AAA CGT AAG AGA GGT GG-3' rev: 5'-GGC AAT ATG ATC AAG ATA C-3'	49°C	381 bp	Eurlar, 2012
<i>spa</i>	fw: 5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3' rev: 5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'	59°C	180-600 bp	
<i>mec A</i>	fw: 5'-TCCAGATTACAACCTCACCAGG-3' rev: 5'-CCACTTCATATCTTGTAAGG-3'	59°C	162 bp	
<i>pvl</i>	fw: 5'-CGTGGACAAAACCTTCTTGAATAT-3' rev: 5'-GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG-3'	59°C	85bp	
<i>mecC</i>	fw: 5'-GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC-3' rev: 5'-GAAGATCTTTCCGTTTTCAGC-3'	59°C	138bp	

5.2. Rezultate și discuții

5.2.1. Identificarea genotipică a tulpinilor de *S. aureus* și *S. pseudintermedius*

Cercetările privind identificarea moleculară a speciilor de *Staphylococcus* izolate din piodermite la animale de companie, au fost efectuate pe tulpinile coagulazo-pozitive, în număr de 83 tulpini de *Staphylococcus spp.* Cercetări similare, publicate în America (Beca ș.a., 2015), au evidențiat un procent de 65,2% tulpini de *Staphylococcus spp.* coagulazo pozitive prezente în procese infecțioase la nivel cutanat. Coagulaza, unul din factorii de agresivitate stafilococică, este o proteină care coagulează plasma, acțiune prin care se blochează accesul în exsudatul inflamator a leucocitelor și a factorilor bactericizi din plasma extravazată. Aceste tulpini au provenit de la 60 de câini și 23 pisici. Au fost identificate 36 tulpini *S. aureus*, 19 tulpini *S. pseudintermedius*, iar 28 de tulpini s-au încadrat în alte specii de *Staphylococcus spp.* (fig.5.1.; fig.5.2.).

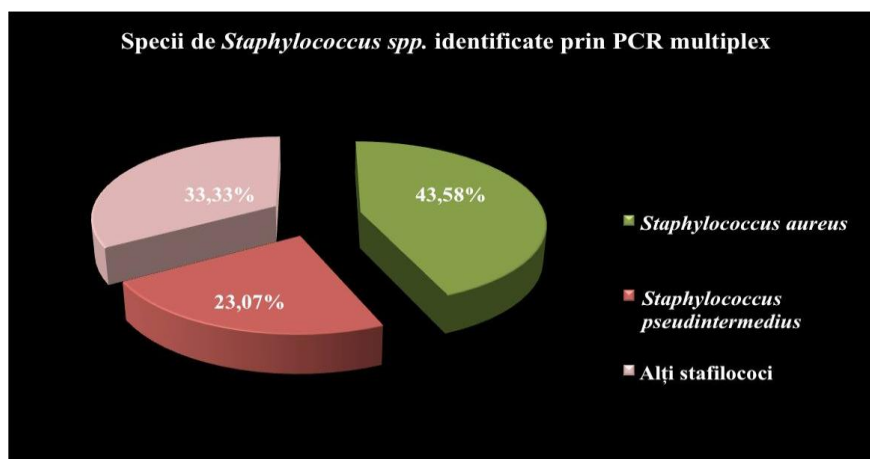


Fig.5.1. Specii de *Staphylococcus spp.* identificate prin PCR Multiplex
Fig.5.1. *Staphylococcus spp.* PCR Multiplex identified



Fig.5.2. Electroforeza după PCR multiplex. Benzile: 1, 2, 4-12 = *S. aureus*; 2 = *S. aureus* (M+); 3 = M - 13; 18-20 = *S. pseudintermedius*; 18 - *S. pseudintermedius* (M+). M+ = martor pozitiv M - = martor negativ
Fig.5.2. Electrophoresis after multiplex PCR. Bands: 1, 2, 4-12 = *S. aureus*; 2 = *S. aureus* (M +); 3 = M - 13; 18-20 = *S. pseudintermedius*; 18 - *S. pseudintermedius* (M +) M + = positive control M = negative control

Corelațiile clinice privind speciile de *Staphylococcus* spp. confirmate prin metoda PCR Multiplex, au fost făcute vis a vis de:

- Specia de animal de companie: câine și pisică.
- Categoriile de piodermatite: dermatite superficiale, profunde și otite; cu tabloul clinic specific fiecăreia (Tabelul 5.4.).

Tabelul 5.4./Table 5.4.

Prevalenta tulpinilor de Stafilococi pe specii de animale și afecțiuni
The prevalence of Staphylococcus strains by animal species and affections

Tulpini Stafilococi Coagulazo-pozitive	Specie		Dermatită superficială	Dermatită profundă	Otita externă
	câini	pisici			
83	60 71,79%	23 28,20%	33 39,75%	37 44,57%	13 14,91%

Tulpinile de *Staphylococcus* spp. recoltate de la cei **60 de câini**, au fost identificate după cum urmează: 15 tulpini de *S. aureus*, 19 tulpini de *S. pseudintermedius*, iar 26 tulpini s-au încadrat în alte specii de *Staphylococcus*.

La cele **23 de pisici**, s-au identificat: 21 tulpini de *S. aureus*, 2 tulpini alte specii de *Staphylococcus* și zero tulpini de *S. pseudintermedius* (Tabelul 5.5.).

Tabelul 5.5./Table 5.5.

Ponderea speciilor de Staphylococcus spp. pe specii de animale de companie
Prevalence of Staphylococcus spp. by pets species

SPECIA	<i>Staphylococcus aureus</i> %	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> %	Alte specii de <i>Staphylococcus</i> %
CÂINI	25,00	31,66	43,33
PISICI	91,30	0	8,69

În cazul piodermatitelor de suprafață și superficiale, au fost identificate 12 tulpini de *S. aureus*, 9 tulpini de *S. pseudintermedius* și 12 tulpini din alte specii de *Staphylococcus*. Dermatitele profunde au avut ca etiologie stafilococică: 14 tulpini de *S. aureus*, 10 tulpini de *S. pseudintermedius* și 13 tulpini din alte specii.

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 0 tulpini de *S. pseudintermedius* (Fig.5.3.).

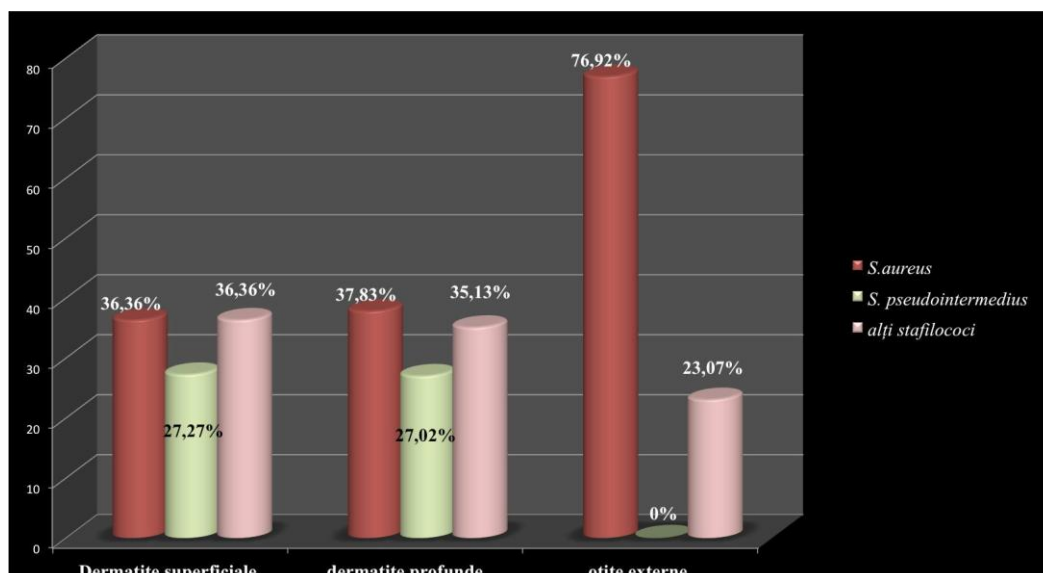


Fig.5.3. Repartizarea procentuală a speciilor de *Staphylococcus* coagulazo-pozitivi pe categorii de de piodermite și otite

Fig.5.3. Percentage distribution of coagulase-positive *Staphylococcus* spp. on categories of pyodermatitis and otitis

5.2.2. Caracterizarea genotipică a izolatelor de *S. aureus* și *S. pseudintermedius*

❖ Identificarea unor gene de rezistență la antibiotice: *mecA*, *mup*, *fusB*, *fusC*, *fusD*, *mecC*

Acestea sunt o parte din genele ce codifică rezistența la acțiunea moleculelor de antibiotice. Prezentăm succint modul de acțiune, pentru o mai bună înțelegere a mecanismelor de antibioretistență:

- *MecA*, *mec C* (*mec ALGA251*)– codifică proteina PBP 2A, care împiedică legarea structurii inelare a antibioticelor beta-lactamice de transpeptidaza (enzima ce ajută la formarea peretelui celular bacterian); ca urmare, bacteria este capabilă să se replice în mod normal. Aceste gene intră în categoria elementelor genetice mobile și reprezintă singura cale cunoscută de transfer genetic orizontal (Rossi CC., ș.a., 2016).

- *Mup* – este gena ce codifică rezistența la mupirocin și a fost testată în contextul în care acest antibiotic este utilizat pentru decolonizarea purtătorilor de stafilococi metilino-rezistenți. Sunt detectate pe plasmide, elemente mobile ce pot transmite orizontal *mup* și implicit rezistența la mupirocin (Rossi CC., ș.a., 2016).

- *FusB*, *FusC*, *FusD* – Efectul antibacterian al acidului fusidic apare datorită legării acestuia de factorul de alungire EF-G, împiedicând eliberarea acestuia din ribozom, blocând astfel sinteza proteinelor bacteriene. Rezistența crescută la acid fusidic este de obicei cauzată de mutații ale genei *fusA*, care codifică EF-G. Rezistența la nivel scăzut este în general cauzată de mecanismele orizontal transferabile *fusB* și *fusC*, care au un rol protector putativ asupra EF-G. *FusD* este responsabil pentru rezistența intrinsecă la acid

fusidic a *S. saprophyticus*. Modificările în porțiunea L6 a *fusE*, au de asemenea un rol în rezistența la acidul fusidic (Farrell DJ., ș.a., 2011).

Rezultatele obținute au fost în corelație cu informațiile rezultate din anamneză. Din totalul celor 76 de tulpini analizate, la 21 de tulpini a fost identificată câte o genă de rezistență din cele 6, patru tulpini “purtând” câte trei gene de rezistență (*mecA*, *mecC* și *fusC*). *MecA* a fost identificată la 15 tulpini: 7 *S.aureus*, 1 *S.pseudintermedius*, iar 7 tulpini au făcut parte din categoria alți stafilococi. Gena *mup* a fost identificată la 1 tulpină (alți stafilococi) iar genele ce codifică rezistența la acid fusidic a fost găsită la 9 tulpini, dintre care 2 tulpini de *S.pseudintermedius*. Contrar altor studii (Chen HJ., ș.a., 2010; Farrell DJ., ș.a., 2011), în testările noastre am identificat gena *fusD* și la 2 tulpini de *S.pseudintermedius*.

Raportarea rezultatelor la numărul de tulpini la care s-au identificat gene de rezistență la antibiotice (n=27), relevă o prevalență crescută a *mecA* ce codifică metilino-rezistența (tabelul 5.6.).

Tabelul 5.6./Table 5.6.

Repartiția procentuală a genelor de rezistență la beta lactamice, mupirocin și acid fusidic la total gene rezistente la antibiotice
Percentage distribution of beta lactam resistance, mupirocin and fusidic acid genes to total antibiotic resistant genes

Gene	S. pseudintermedius	%	S. aureus	%	Alți stafilococi	%	TOTAL GENE	%
<i>fusB</i>	0	0	0	0	2	8	2	7,4
<i>fusC</i>	0	0	0	0	3	12	3	11,1
<i>fusD</i>	2	8	0	0	2	8	4	14,8
<i>mup</i>	0	0	0	0	1	4	1	3,7
<i>mecA</i>	1	4	7	28	7	28	15	55,5
<i>mecC</i>	0	0	2	2	0	0	2	7,4

Prevalența scăzută a genelor de rezistență la mupirocin și acid fusidic este explicabilă prin prisma faptului că sunt două antibiotice puțin folosite în aria geografică de proveniență a tulpinilor (pacienților), respectiv județul Iași și cele limitrofe (Vaslui, Neamț, Suceava). Din anamneza luată proprietarilor, a rezultat că nici un pacient nu a fost tratat cu mupirocin și doar doi pacienți (un câine și o pisică) au beneficiat de tratament topic cu acid fusidic. În schimb, în aceeași regiune, în intervalul recoltării probelor, tratamentul de primă intenție a constat în administrarea de amoxicilină potențată cu acid clavulanic. Frecvența administrare a acestui antibiotic potențat cu un inhibitor de beta-lactamază, poate crea presiune pe selecția de tulpini rezistente la beta-lactamice. Acest fapt, poate explica procentul de 55,5% a prezenței genei *mecA* obținut în prezentul studiu, față de rezultatele obținute în cazul celorlalte 2 antibiotice.

❖ **Identificarea unor gene care codifică rezistența la antiseptice: *smr*, *qac A/B*, prin activarea pompelor de eflux.**

Aceste gene sunt identificate pe cromozomi și/sau plasmide, fiind generatoare a rezistenței naturale, intrinseci și a celei dobândite. Localizarea pe elemente genetice mobile (plasmide sau transpozomi) permite răspândirea cu ușurință a genelor, chiar între specii îndepărtate. Prezența acestor gene, ce codifică rezistența la sărurile cuaternare de amoniu din componenta dezinfectantelor și antisepticelor, este relevantă prin prisma faptului că a fost semnalat faptul că există o corelație între acest tip de rezistență și metilino-rezistența (Nakipoğlu Y., ș.a., 2012). Din cauza dublului caracter: hidrofil și hidrofob a moleculelor de antibiotice, acestea sunt recunoscute cu ușurință de multe astfel de pompe de eflux (Sun J., ș.a., 2014).

Din cele 6 gene de rezistență la antiseptice identificate, două au fost *smr* iar patru au fost *qacA/B*. Toate cele 6 gene au fost identificate la tulpini din grupul „alți stafilococi”. O singură tulpină a prezentat gene de rezistență la antiseptice (*qacA-B*) și o genă de rezistență la antibiotice (*mecA*). Analiza statistică a relevat o corelație medie ($R=0,5$), dar cu o înaltă semnificație statistică ($p=0$) a asocierii acestor două gene cu *fusC*.

❖ **Identificarea unor gene de virulență: *luk S*, *luk F*, *siet*, *sec_{canine}*, *exp*, *expB*, *pvl***

- *Luk S*, *Luk F* – prezente la *S. pseudintermedius* codifică o leucotoxină, similar PVL produsă de *S. aureus* (Futagawa S., ș.a., 2009). Aceste leucocidine au efect citotoxic prin crearea de pori în membrana celulelor țintă (Guillet V., ș.a., 2004).

- *PVL* - 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}* - sunt gene care codifică enterotoxigenitatea stafilococilor, dar au fost identificate 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).

- *Spa* – codifică proteina A din peretele celular a *S.aureus* (prezentată în subcapitolul 1.3.)

Grupul genelor ce codifică diferiți factori de virulență la *Staphylococcus spp.*, a cuprins 8 gene ce codifică leucotoxine necrolitice, toxine exfoliative, enterotoxine. Au fost identificate 181 de gene în total lot de 76 tulpini stafilococice. Prevalența cea mai mare a

avut-o gena *siet* (23,2%), urmată de *lukIS* (21,5%), *lukIF* (20,9%) și *spa* (19,8%) (Tabelul 5.7.).

Tabelul 5.7./Table 5.7.

Repartiția procentuală a genelor de virulență pe 76 tulpini *Staphylococcus spp.* testate
The percentage distribution of virulence genes in the 76 strains of *Staphylococcus spp.* tested

Gene	S. Pseudintermedius	%	S. aureus	%	Staphylococcus spp.	%	TOTAL GENE	%
<i>lukIS</i>	35	46	0	0	4	5,2	39	21,5
<i>lukIF</i>	35	46	0	0	3	3,9	38	20,9
<i>expA</i>	4	5,2	1	1,3	3	3,9	7	3,8
<i>expB</i>	8	10,5	0	0	1	1,3	9	4,9
<i>Siet</i>	36	47,3	2	2,6	4	5,2	42	23,2
<i>Sec_{canine}</i>	0	0	0	0	1	1,3	1	0,5
<i>Pvl</i>	0	0	9	25	0	0	9	4,9
<i>spa</i>	0	0	36	100%	0	0	36	19,8

Procentul cel mai mare în ceea ce privește prezența genei *siet* (23,2%) la *S. pseudintermedius* este în concordanță cu studii similare ce au evidențiat prezența masivă atât la tulpinile izolate de la animale sănătoase, cât și de la cele ce prezintă semne ale unei infecții din care s-a izolat *S. pseudintermedius* (Bannoehr ș.a., 2012; Lautz ș.a., 2006).

Patogenitatea determinată de prezența *siet* a fost sugerată experimental prin injectare cu *siet* la câini, care au dezvoltat simptome similare cu cele observate în piodermite: eritem, exfolieri, cruste (Terauchi ș.a., 2003). Cu toate acestea, rolul pe care aceasta genă îl are în patogenitate este încă neclar, existând studii în care injectarea intradermică a *siet* recombinant, la trei câini, nu a provocat nici o modificare clinică sau histopatologică (Garbacz ș.a., 2013). Alte două gene *expA* și *expB*, care codifică prezența toxinei exfoliative, au fost detectate în procentaj de 8,7% ; comparativ cu alte specii, *S. pseudintermedius* prezintă cea mai mare prevalență a acestor gene (81,2 %). Efectul exfoliativ a toxinei codată de aceste două gene, a fost demonstrată *in vivo* prin injectarea în piele la câini, producând vacuolizări finalizate cu eroziuni și bule (Iyori ș.a., 2011).

Un procentaj ridicat a fost găsit la *lukS* și *lukF*; din totalul celor 36 de tulpini de *S. pseudintermedius*, la 35 au fost identificate simultan cele două gene ceea ce reprezintă 97,2%. Rezultatele au fost similare cu cele găsite pe loturi de tulpini din UK, Spania (Dulman, 2016; Gomez, 2014). În ceea ce privește gena *sec_{canine}*, aceasta a fost confirmată la o singură tulpină încadrată la alți stafilococi.

Analizând întregul grup al celor 8 gene de virulență, s-a constatat că din cele 76 de tulpini, 17 tulpini au fost pozitive pentru 4 gene, iar 25 de tulpini au prezentat câte 3 gene de virulență.

❖ **Identificarea unor gene care codifică proteine formatoare de biofilm: *icaA*, *icaD*, *bap*.**

Formarea biofilmului are loc atunci când microorganismele se atașează la o suprafață.

Bacteriile secretă polimeri extracelulari care asigură o matrice structurală ce facilitează aderența la suprafețe. Această formă de rezistență bacteriană duce la eșecul tratamentelor tradiționale antimicrobiene, ceea ce reprezintă un risc major pentru sănătate (Donlan RM., 2001).

- *icaA*, *icaD*, -aparțin operonului *ica*, responsabile de producția de biofilm, Genele *ica* sunt identificate în infecțiile stafilococice, apărute în special în prezența cateterelor intravenoase (Arciola ș.a., 2001).

- *bap*- se găsește pe transpozom, ceea ce evidențiază capacitatea de transfer orizontal (Torno ș.a., 2005).

Din grupul genelor ce codifică proteine formatoare de biofilm au fost confirmate un total de 9 gene, o prevalență mică în acest studiu (5,85%). Toate cele 9 gene au fost identificate la alți stafilococi decât *S.aureus* sau *S.pseudintermedius*. Distribuția numărului de gene/tulpină a fost: 2 tulpini cu câte 2 gene (*icaA* și *icaD*) și 5 tulpini cu câte o singură genă. De remarcat este faptul că 5 din cele 7 tulpini „purtoare” de gene *ica*, au provenit din cazuri de otite externe cronice (3 de la pisici și 2 de la câini).

Corelațiile clinice au fost făcute vis a vis de:

- Specia de animal de companie: câine și pisică (tabelul 5.8.).

Tabelul 5.8./Table 5.8.

Repartiția tulpinilor de stafilococi analizate genotipic pe specii de animale și afecțiune

Distribution of strains of staphylococci analyzed genotypically by animal species and affection

Tulpini Stafilococi	Specie		Dermatită	Otita externă
	Câini	Pisici		
76	52 68,4%	24 31,5%	64 84,2%	12 15,7%

În prezentul studiu, cazurile cele mai numeroase au fost reprezentate de piodermatite cu manifestare cutanată la câini.

• Localizarea (cutanată/ otite), cu tabloul clinic specific fiecăreia și prevalența genelor pe cele 4 grupuri : A= rezistența la antiseptice; R= rezistența la antibiotice; V= factori de virulență; B= producerea de biofilm.

Analizând cele 4 mari categorii de gene (tabelul 5.9.) identificate la tulpini provenite de la pacienți diagnosticați cu piodermită (64 cazuri), s-a constatat că factorii de virulență au cel mai mare impact asupra mecanismului patogenic. S-a constatat că la cele 40 de tulpini „purtoare” de gene de virulență s-au identificat nu mai puțin de 179 de gene. Au fost identificate 26 tulpini cu câte 4 gene de virulență, 14 tulpini cu câte 3 gene de virulență și 1 tulpină cu o singură genă ce codifică factori de virulență. Se confirmă astfel, la nivel molecular, agresivitatea izolatelor de *Staphylococcus spp.* din piodermite.

Tabelul 5.9./Table 5.9.

Repartiția genelor identificate în piodermite cu localizare cutanată și otite
Distribution of genes identified in piodermatitis and otitis

Patologie cutanată	** G.A.	** G.R.	** G.V.	** G.B.
Piodermită (64 cazuri)	7	25	179	0
Otită (12 cazuri)	1	3	2	9

*C.A./C.R./C.V./C.B.= număr de cazuri care au prezentat gene din grupul A, V, R, sau B

** G.A/G.R./G.V./G.B.= număr de gene identificate din grupul A, V, R sau B

Prevalența cazurilor de piodermită la care s-au identificat gene ce codifică rezistența la betalactamice, mupirocin și acid fusidic a fost de 28,1%.

Numărul cazurilor ce au prezentat rezistență la aceste antibiotice este mic pentru mupirocin (1,39%) și de 13,15% pentru acid fusidic, explicabil prin faptul că sunt antibiotice utilizate foarte rar sau deloc de către clinicienii din zona geografică de unde au provenit cazurile. Comparativ cu acestea, rezistența la betalactamice a fost identificată în proporție de 51,76%, (clasa peniciline) fapt iarăși explicabil, în zona Moldovei tratamentul de primă intenție constând, în general, în amoxicilină potențată cu acid clavulanic (56,36%). Utilizarea acestui inhibitor (acidul clavulanic) de betalactamază pe termen lung într-un areal geografic, a creat o presiune pe selecția de tulpini rezistente la betalactamice.

Testările fenotipice, realizate pe un lot de 85 tulpini, au identificat un procent de 11,76% rezistență la acid fusidic, respectiv 23,52% rezistență la oxacilină (tabelul 5.10.).

Tabelul 5.10./Table 5.10.

Rezistența la oxacilină și acid fusidic, identificate prin metode fenotipice și PCR
Fusidic acid and oxacillin resistance, identified by phenotypic methods and PCR

REZISTENȚA	FENOTIPIC	GENOTIPIC
OXACILINĂ	23,5%	19,7%
ACID FUSIDIC	11,76%	13,1%

În cazul otitelor, s-a constatat un procent de rezistență la antibioticele urmărite mai mic decât în infecțiile cutanate, în schimb au fost identificate în 7 cazuri gene ce codifică formarea de biofilm. Acestea au fost identificate 100%, la tulpini din grupul alți stafilococi.

Este posibil ca acest lucru să fi fost un factor de întreținere a otitei, toate cele 7 cazuri fiind cronice, cu perioade de acutizare. Pe de altă parte, nu putem evalua cu certitudine acest lucru întrucât, toate cazurile au fost diagnosticate cu infecție polibacteriană (asociere cu *Pseudomonas spp.*, *E.Coli*, *Proteus*) și/sau *Malassezia spp.*

5.3. Analiza statistică

Analiza statistică a datelor a fost realizată cu ajutorul softului SPSS IBM vs. 17.

Pentru testarea normalității au fost folosite testele Kurtosis și Skweness. După testarea normalității grupurile au fost comparate cu testele Mann – Whitney U și Kruskal Wallis.

Pragul de semnificație statistică a fost stabilit la 0,05. Studiile privind existența corelațiilor între variabilele urmărite au fost realizate cu testul Spearman, cu același prag de semnificație statistică.

Cele mai puternice corelații ($R \geq 0,9$) cu înaltă semnificație statistică ($p < 0,01$), au fost reprezentate de prezența și asocierea concomitentă a genelor *luKS*, *luKF*, *expA*, *expB*, *siet*, la izolatele de *S. pseudintermedius*, reprezentând un puternic complex de virulență-agresivitate ce conferă patogenitate respectivelor izolate (fig.5.4.).

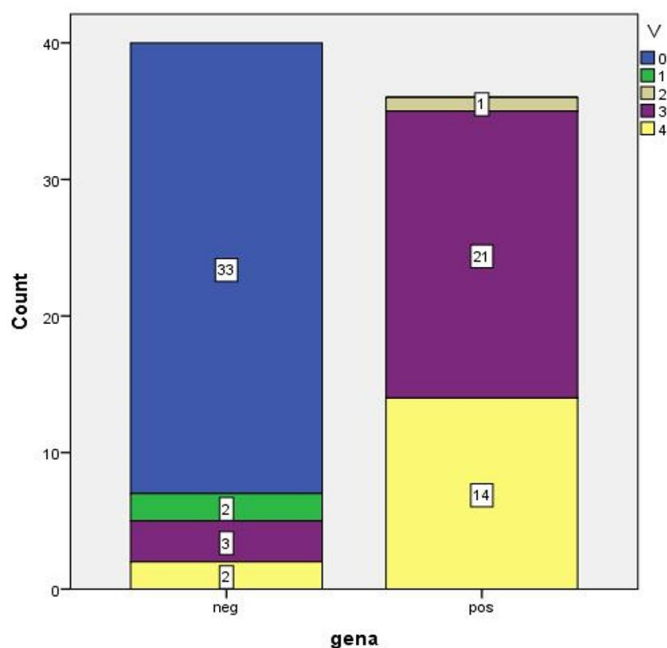


Fig.5.4. Distribuția genelor de virulență în lotul de *Staphylococcus spp.*

Fig.5.4. Distribution of virulence genes at *Staphylococcus spp*

Corelații puternice ($R \geq 0,7$), cu înaltă semnificație statistică ($p < 0,01$) au fost identificate în ceea ce privește implicarea *S. pseudintermedius* în piodermite cu manifestare cutanată. Corelații medii ($0,3 < R < 0,5$) și slabe ($R < 0,3$), dar cu înaltă semnificație statistică au fost identificate în ceea ce privește prezența genelor ce codifică producerea de biofilm la izolatele din otite (fig.5.5.), precum și prezența concomitentă a celor două gene testate, *icaA* și *icaD*; asocierea genelor ce codifică rezistența la acid fusidic, cu cele ce codifică rezistența la săruri cuaternare de anioniu.

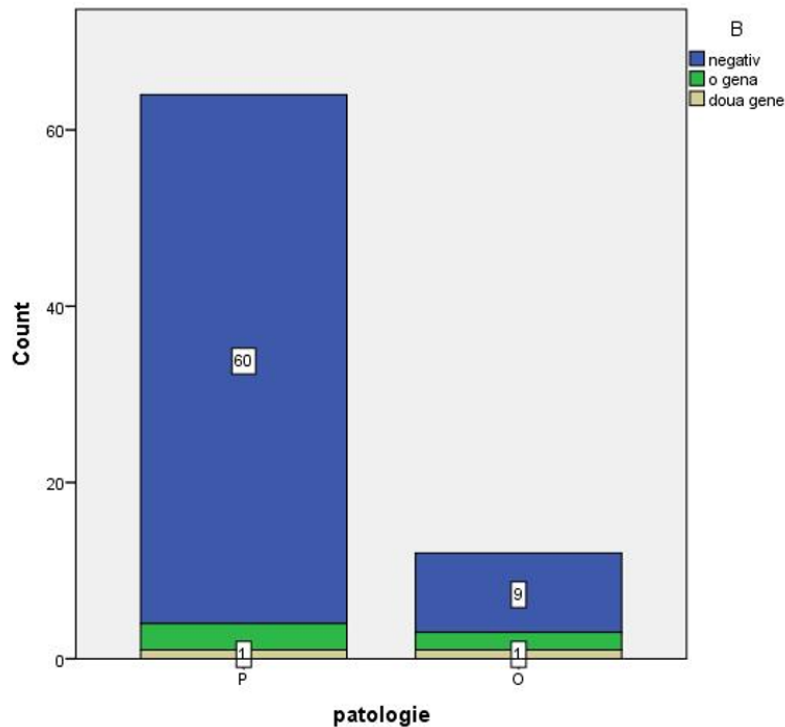


Fig.5.5.Distribuția producției de biofilm în otite
Fig.5.5.Distribution of biofilm production in otitis

În grupul genelor ce codifică rezistența la oxacilină (betalactamic), mupirocin și acid fusidic, 3 tulpini au prezentat câte 2 gene de rezistență, iar 20 de tulpini au prezentat câte o genă de rezistență. Distribuția pe patologii este reprezentată în fig.5.6.

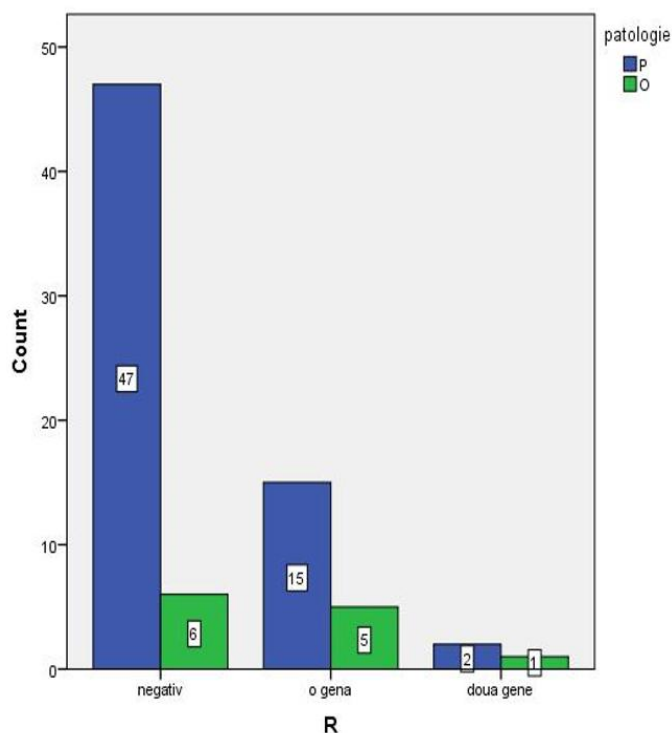


Fig.5.6.Distribuția rezistenței la antibiotice/patologii
Fig.5.6.Distribution of resistance to antibiotics/pathologies

5.4. Concluzii parțiale

1. Identificarea genotipică a arătat că în cazul piodermatitelor și otitelor, prevalența *S. aureus* a fost de 43,58%; *S. pseudintemedius* 23,07%; iar 33,33% s-au încadrat în alte specii de *Staphylococcus*.
2. Tulpinile, provenite de la 60 de câini și 23 pisici, au fost identificate în proporție de: 31,66% *S. pseudintemedius* și 25% *S. aureus* la câini; respectiv 91,30% *S. aureus* și 0% *S. pseudintemedius* la pisici.
3. Corelarea rezultatelor parțiale obținute, pe categorii de dermatite luate în studiu au evidențiat principalul agent etiologic ca fiind *S. aureus* în următoarele procente: 76,92% în otite; 36,36% în dermatite superficiale și 37,83% în dermatitele profunde.
4. În cazul dermatitelor superficiale a fost identificată implicarea etiopatologică în egală măsură a *S. aureus* cu alte specii de *Staphylococcus* (36,36%).
5. Studiile de biologie moleculă au confirmat prezența *S.pseudintermedius*. ca principal agent etiologic în dermatite bacteriene cutanate la câine ($p < 0,01$).
6. Cercetările au confirmat, la nivel genetic, prezența genei *mecA* și *mecC* ce codifică metilino-rezistența în procent de 60, raportat la numărul total de gene ce codifică rezistența la antibiotice.

7. Genele ce codifică rezistența la mupirocin și acid fusidic au fost identificate într-un procentaj relativ mic, corelat cu utilizarea în practica veterinară a acestor antibiotice, fapt ce le recomandă în tratamentul bacteriozelor cutanate la câine și pisică.

8. Interpretarea statistică a relevat prezența concomitentă la aceleași izolate a câte 3 și 4 determinanți ai factorilor de virulență ($p < 0,01$), indicând tulpini cu un înalt potențial patogen, în ambele manifestări clinice luate în studiu.

9. Genele ce codifică rezistența la săruri cuaternare de amoniu au fost identificate la tulpini din grupul alți stafilococi..

10. La izolatele stafilococice din otite, s-au depistat gene care codifică producerea de biofilm ($p < 0,01$), ceea ce poate fi pus în legătură, la cazurile luate în studiu, cu caracterul cronic al acestora.

CAPITOLUL 6. ÎNȚIEREA TERAPIEI ETIOTROPE ÎN STAFILOCOCCII LA CÂINE ȘI PISICĂ ȘI POSIBILITĂȚI ÎN UTILIZAREA UNOR NOI COMPUȘI ANTIBACTERIENI

CHAPTER 6. INITIATION OF ETIOTROPIC THERAPY IN STAPHYLOCOCCI IN DOGS AND CATS, AND PERSPECTIVES IN USING NEW ANTIBACTERIAL COMPOUNDS

6.1. Materiale și metode

- Testarea *in vitro* a fenomenului de antibioretistență a *Staphylococcus spp.*(85 tulpini) a fost concretizată prin realizarea a 255 antibiogramme, utilizând următoarele antibiotice (microcomprimate): gentamicina (10μg), kanamicina (30μg), neomicina (30μg), streptomycin (300μg), norfloxacin (10μg), enrofloxacin (10μg), marbofloxacin (5μg), ampicilina (10μg), amoxicilina (30μg), oxacilina (1μg), amoxicilina+acid clavulanic (20-10μg), vancomicina (30μg), bacitracina (10μg), polimixinaB(300μg), rifampicina (5μg), trimetoprim+sulfodiazina (1,25/23,75μg), eritromicina (15μg), clindamicina (2μg), tetraciclina (30μg), doxiciclina (30μg), linezolid (30μg), cloramfenicol (30μg), cefoxitin (30μg), acid fusidic (10μg), fosfomicina (200μg). Antibiogrammele au fost efectuate după metoda Kirby-Bauer cu interpretare după standardul CLSI (CLSI 2014).

- Prin inițiativa Centrului European de Prevenire a Bolilor, a fost creată o terminologie standardizată la nivel internațional prin care să fie descrisă profilurile de rezistență dobândite 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 Food and Drug Administration (FDA) din Statele Unite ale Americii.

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 oxacilina/cefoxitin, induce rezistența la toate beta lactamicele existente. Similar, rezistența la clindamicină, este raportată ca rezistență la toate lincosamidele (lincomicina) și macrolidele (clindamicina, spiramicina, claritromicina, azitromicina, roxitromicina) , izolatele fiind încadrate MDR.

Clasele de antibiotice și agenții antimicrobieni testați pentru încadrarea MDR, XDR și PDR sunt prezentați în tabelul 6.1.

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, am adaptat unele antibiotice cu cele utilizate în zona geografică inclusă în studiu.

Tabelul6.1./Table 6.1.

**Antibioticele utilizate pentru încadrarea tulpinilor de Staphylococcus spp.
în MDR, XDR, PDR**

Antibiotics for assigning Staphylococcus spp.in MDR, XDR, PDR

CLASA ANTIBIOTIC	AGENT ANTIMICROBIAN
AMINOGLICOZIDE	Gentamicina
	Kanamicina
	Neomicina
	Streptomicina
QUINOLONE	Norfloxacin
	Enrofloxacin
	Marbofloxacin
PENICILINE	Ampicilina
	Amoxicilina
	Oxacilina
	Amoxi.+ acid clavulanic
POLIPEPTIDICE	Vancomicina
	Bacitracina
	Polimixina B
RIFAMICINE	Rifampicina
DIAMINOPIRIDIMINA+SULFONAMIDA	Trimetoprim+sulfodiazina
MACROLIDE	Eritromicina
	Clindamicina
TETRACICLINE	Tetraciclina
	Doxiciclina
	Linezolid
CLORAMFENICOLI	Cloramfenicol
CEFALOSPORINE	Cefoxitin
ALTE STRUCTURI	Acid fusidic
	Fosfomicina

- Testarea *in vitro* a efectului antibacterian al apei încărcate cu plasmă rece (PAW) a fost realizată după un algoritm propus de echipa lui Hnatiuc și colaboratorii săi, bazat pe un sistem multielectrod, folosind un tip de reactor electrochimic GlidArc (Ursache ș.a., 2014). Efectul antibacterian al PAW a fost testat pe un număr de 38 de tulpini de stafilococi. Tulpinile au fost izolate din colecțiile purulente de la subiecți diagnosticați cu foliculită, furunculoză, acnee juvenilă, abcese, otită externă. Identificarea fenotipică pe baza caracteristicilor culturale și biochimice ale tulpinilor de stafilococi a arătat că din cele 38 de tulpini, 27 au fost *S. aureus* și 11 tulpini non-*S. aureus*. Patogenicitatea a fost testată prin efectuarea coagulării plasmei de iepure citrat (BioRad). Ca martor pozitiv s-a utilizat tulpina de *S. aureus* ATCC 25923. Cele 38 tulpini au fost identificate ca fiind coagulazo-pozitive, la 23 dintre ele coagularea având loc în 30 de minute și la 15 tulpini, în 24 de ore.

Un inocul echivalent cu standardul 3 McFarland (aproximativ 109 celule / ml) a fost obținut din cultura bacteriană, incubat la $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 24 de ore în condiții de aerobioză. Concentrația bacteriană inițială a fost evaluată cu exactitate prin metoda diluțiilor în serie, până la 10^{-7} , în duplicate. Pentru ultimele două diluții, respectiv 10^{-6} și respectiv 10^{-7} , o cantitate echivalentă de 100 μl a fost descărcată în plăci Petri cu Agar și distribuită uniform folosind granule de sticlă sterile. Plăcile au fost incubate la $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, în condiții de aerobioză timp de 24 de ore, după care CFU/ml au fost calculate folosind următoarea formulă: $\text{CFU} / \text{ml} = \Sigma (n \cdot d) / N$, unde "n" este numărul de colonii numărate pe placa Petri; "D" este factorul de diluție, "N" este numărul de plăci Petri luate în considerare pentru fiecare diluție. CFU-ul inițial determinat în acest mod a fost utilizat drept control pentru calcularea reducățiilor.

Pentru fiecare tulpină, 90 ml PAW au fost puse în contact cu 10 ml din inoculul inițial. La momente diferite de contact, respectiv, 3, 5, 7 și respectiv 10 minute, volumele cunoscute ale amestecului (0,1 și 1,0 ml) au fost distribuite pe plăci Petri cu agar mediu Baird-Parker. Câte 0,1 ml au fost distribuiți uniform pe suprafața mediului folosind sfere de sticlă sterile, iar 1,0 ml a fost plasat pe placa Petri, peste care s-a turnat mediul topit și răcit la 45°C , incubate la $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 24 de ore în condiții aerobe. După expirarea perioadei de incubare, CFU / ml a fost calculat din nou. Reducerea încărcăturii bacteriene a fost calculată ca $\log [(CFU / \text{ml} \text{ înainte de tratament}) / (CFU / \text{ml} \text{ după tratament})]$.

6.2. Rezultate și discuții

6.2.1. Studii *in vitro* privind fenomenul de antibio rezistență a tulpinilor de *Staphylococcus spp.* izolate din piodermite

Stabilirea profilului de sensibilitate/rezistență la antibiotice este 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 antibioretistenței, fapt ce îngreunează efortul clinicienilor de a trata piodermitele la animalele de companie.

O alternativa terapeutică este conceptul de “rotire” a antibioticelor pentru a se încerca reducerea presiunii de selecție a tulpinilor rezistente și prelungirea duratei de acțiune a compusilor. Practic, acest lucru implică înlocuirea periodică a antibioticelor de primă intenție cu alte clase de compusi (Masterton, 2005). Aceasta este o soluție doar temporară atâta timp cât tulpinile ce au selectat deja un anumit tip de rezistență nu dispar din populația rezidentă. Tulpinile problemă (sau genele *r*) vor fi rapid reselectate la reintroducerea antibioticului respectiv (Bergstrom, 2004). Sensul de “rotire” a antibioticelor sau chiar a claselor de antibiotice va trebui stabilit printr-un efort interdisciplinar: clinician–microbiolog, în a selecționa și testa antibioretistența tulpinilor implicate într-o anumită patologie; în cazul prezentului studiu, în piodermite/stafilococi la animale de companie.

Există la nivel mondial preocupări privind prelungirea “vieții” unui antibiotic, prin dezvoltarea unor instrumente conceptuale și metodologice care să ofere un tip de predicție privind apariția rezistenței la un antibiotic, chiar înainte de introducerea lui în clinică (Martinez ș.a., 2007).

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. Încadrarea fenotipică a tulpinilor, a fost prezentată în subcapitolul 4.2.2. (fig.4.34.).

Fenomenul cu un impact important asupra antibioticelor betalactamice, este apariția și evoluția MRSA (fig.6.1.).

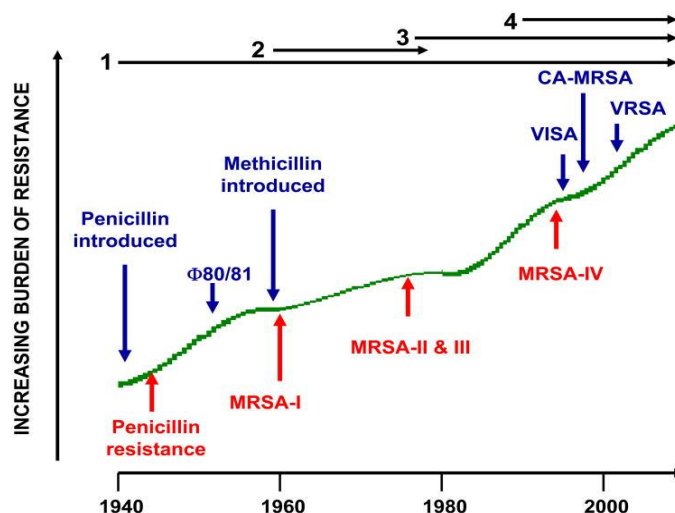


Fig.6.1. Apariția și evoluția MRSA (după Chambers ș.a., 2009)

Fig. 6.1. The emergence and evolution of MRSA (after Chambers ș.a., 2009)

Analizând tulpinile de *S.aureus* și testând rezistența la principalele beta lactamice folosite în practica veterinară, s-a constatat că această rezistență a fost aproape dublată de existență în lotul analizat a MRSA (tabelul 6.2, fig.6.2.). Din totalul celor 85 de probe de la care s-au identificat *Staphylococcus spp.*, 34 de tulpini au fost confirmate ca aparținând speciei *S.aureus* (40%).

Sensibilitatea celor 34 tulpini de *S. aureus* la cele 4 betalactamice testate, a scos în evidență faptul că: 11 tulpini (32,3%) au prezentat rezistență la toate antibioticele, 9 tulpini (26,4%) la 3 antibiotice; 5 tulpini (14,7%) au fost rezistente la 2 betalactamice, iar 1 tulpină (2,9%) a prezentat rezistență doar la amoxicilină.

Testările efectuate au demonstrat că, rezistența *S. aureus* la AMC, AMX și AML a fost prezentă în procente de 58,8; 70,5, respective 58,8. Deasemenea au fost identificate 11 tulpini MRSA, reprezentând 32,3% din totalul tulpinilor de *S. aureus* identificate. La numărul de tulpini rezistente la fiecare din cele 3 betalactamice, precizate mai sus, se adaugă câte două tulpini cu rezistență indusă de oxacilină deoarece, conform CLSI, EUCAST, BSAC, tulpinile de *S.aureus* metilicilino-rezistente sunt raportate ca fiind rezistente la toate beta lactamicele, indiferent de rezultatul *in vitro* pentru acești compuși (tabelul 6.3.). Astfel procentele de rezistență pentru cele 3 betalactamice au crescut cu 5,8%; rezultatele finale fiind cele din tabelul 6.2.

Tabelul 6.2./Table 6.2.

Repartiția MRSA și rezistența la betalactamice
MRSA and betalactam resistance distribution

85 TULPINI STAPHYLOCOCCUS SPP.			
34 STAPHYLOCOCCUS AUREUS			
Rezistența la Beta Lactamice			
MRSA(Oxacilin)	Amoxicilin+ Acid clavulanic	Amoxacilin	Ampicilin
11 tulpini	20 tulpini+ 2 tulpini MRSA	24 tulpini+ 2 tulpini MRSA	20 tulpini+ 2 tulpini MRSA
32,3%	64,7%	76,4%	64,7%

Analiza și corelarea rezultatelor obținute în urma testării sensibilității (tabelul 6.4) cu procesul patologic din care au fost recoltate probele, a arătat că tulpinile cu rezistență la toate cele 4 betalactamice au provenit din dermatite (7)și otite (4); tulpinile rezistente la 3 betalactamice au fost recoltate din dermatite (7)și otite (2). În cazul tulpinilor rezistente la 2 betalactamice, raportul între dermatite – otite, este aproximativ echilibrat 2/3; iar singura tulpina rezistentă doar la un singur betalactam, a provenit dintr-o dermatită. S-a constatat că cele mai rezistente tulpini au provenit din dermatite superficiale și/sau profunde, o posibilă explicație fiind aceea că prezentarea pentru examenul microbiologic, a fost făcută după instituirea tratamentelor de prima intenție (uneori în cure repetate) în 60% din cazuri cu amoxicilina+acid clavulanic și/sau ampicilină/amoxicilină. În cazul otitelor, deși

tulpinile par mai sensibile la betalactamice, pacienților le-au fost recoltate probele după tratamente topice de primă intenție (40%) cu produsele din cele existente pe piață (cel puțin în zona luată în studiu) ce conțin în marea lor majoritate antibiotice din clasa aminoglicozidelor (neomicină, gentamicină) și polipeptidice (polimixin B).

Un alt aspect remarcat este acela că, în cazul a 10 din cele 11 tulpini MRSA, pacienții au fost tratați cu amoxicilină+ acid clavulanic, fapt ce poate crea o presiune în selectarea tulpinilor metilino-rezistente (Worthington ș.a., 2013).

La ora actuală în lume, din cauza fenomenului de metilino-rezistență, antibioticele menționate mai sus nu reprezintă o opțiune de tratament de primă intenție. Prima generație de cefalosporine (cefazolin, cephalothin și cephalexin), clindamicina, lincomicina și eritromicina sunt recomandate pentru infecțiile cutanate cu MRSA (Rayner ș.a.,2005).

Tabelul 6.3./Table 6.3.

Profil de sensibilitate la OX, AMC, AMX, AML în lotul de 34 tulpini de *S. aureus* izolate din piodermită și otite
Sensitivity profile for OX, AMC, AMX, AML in the group of 34 strains of *S. aureus* isolated from pyoderma and otitis

Probe Antib.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
OX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
AMC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
AMX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AML	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R

Ox- oxacilin, AMC- amoxicilin+acid clavulanic, AMX – amoxicilin, AML - ampicilin

R – rezistența indusă de MRSA/ resistance induced by MRSA

R – rezistența proprie/ its own resistance

S – sensibilitate/ sensitivity

Tabelul 6.4./Table 6.4.

Patologia corespunzătoare fiecărei tulpini de *S. aureus* identificate
The pathology corresponding to each strain of *S. aureus* identified

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
Patologie	D	O	O	D	D	D	O	D	D	O	D	D	O	O	D	D	D	D	D	D	D	D	O	D	O	O	D	O	D	O	O	O	D	D

D – dermatita stafilococică/ staphylococcal dermatitis

Rezultatele testării tulpinilor de *Staphylococcus spp.* la cele 11 clase de antibiotice sunt prezentate în tabelul 6.5.

Tabelul.6.5./Table 6.5.

Profilul de rezistență a tulpinilor de *Staphylococcus spp.* la antibioticele testate

The resistance profile of *Staphylococcus spp.* to the antibiotics tested

CLASA	ANTIBIOTIC	% REZISTENȚĂ	% REZISTENȚĂ/ CLASĂ
AMINOGLICOZIDE	Gentamicină	4,7	27,93
	Kanamycină	31,76	
	Neomicină	51,76	
	Streptomicină	23,52	
QUINOLONE	Norfloxacin	4,7	5,09
	Enrofloxacin	1,17	
	Marbofloxacin	9,4	
PENICILINE	Ampicilină	65,88	51,76
	Amoxicilină	57,64	
	Amoxicilină+ Acid clavulanic	60	
	Oxacilină	23,52	
POLIPEPTIDICE	Vancomycină	5,88	48,62
	Bacitracină	82,35	
	Polimixina B	57,64	
RIFAMICINE	Rifampicină	1,17	1,17
DIAMINOPIRIDIMINA +SULFONAMIDA	Trimetoprim+ Sulfodiazină	9,4	9,4
MACROLIDE	Eritromicină	43,52	32,93
	Clindamicină	22,35	
TETRACICLINE	Tetraciclină	45,88	38,03
	Doxiciclină	40	
	Linezolid	28,23	
CLORAMFENICOLI	Cloramfenicol	5,8	5,8
CEFALOSPORINE	Cefoxitin	34,11	34,11
ALTE STRUCTURI	Acid Fusidic	11,76	8,82
	Fosfomicină	5,88	

S-a constatat că, primele trei clase de antibiotice la care tulpinile testate au prezentat cele mai mari procente de rezistență au fost penicilinele, urmate de polipeptidice și tetraciclina. 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).

O altă formă de rezistență identificată în studiul nostru 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) (fig.6.2.).

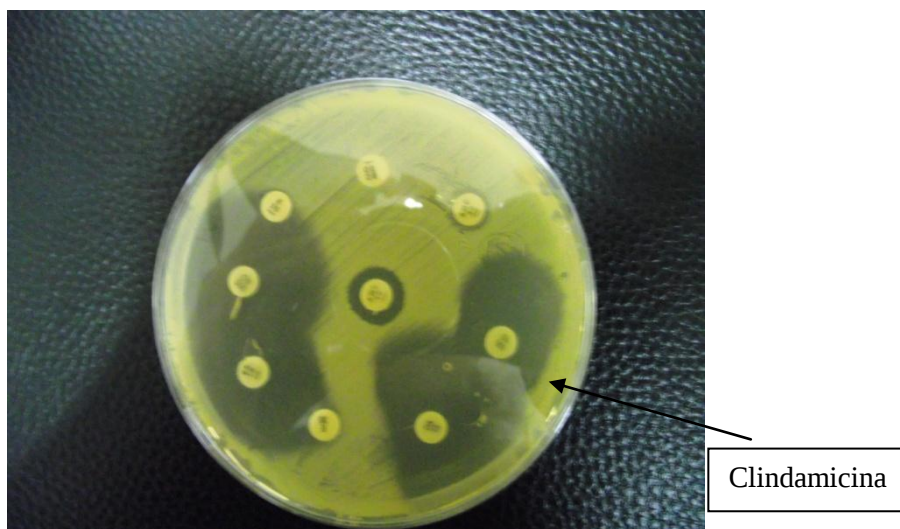


Fig.6.2. „forma D” între microcomprimătele de eritromicină și clindamicină

Fig.6.2. „D form” between erythromycin and clindamycin discs

Relevant pentru datele prezentate în tabelul 6.5. sunt informațiile obținute prin anamneză privind tratamentele de primă intenție sau cele făcute chiar în urma unui diagnostic microbiologic, anterior intrării în studiul nostru. S-a constatat că în peste 70% din cazurile tratate anterior, terapia a constat fie în asocieri de 2 antibiotice, fie în cure repetate de 2, 3 antibiotice. Antibioticul cel mai administrat a fost AMC (56,36%). Prezentăm în tabelul 6.6. procentele pentru fiecare antibiotic administrat în piodermite și otite.

Tabelul 6.6./Table 6.6.

Antibiotice utilizate în terapia piodermitelor și otitelor la câini și pisici**Antibiotics used in pyoderma and otitis therapy, in dogs and cats**

Antibiotic	Amc	N	C	Da	T	Pb	E	Ma r	En r	Te	S	Aml	Ax	Fox
Nr.cazuri	31	14	9	7	6	6	5	5	4	3	2	1	1	1
%	56,3	25,4	16,3	12,7	10,9	10,9	9,0	9,0	7,2	5,4	3,6	1,8	1,8	1,8

Compararea rezultatelor obținute în prezentul studiu cu date din literatura de specialitate este dificilă, întrucât nu au fost găsite studii recente referitoare strict la profilul de sensibilitate la AMC, AMX și AML a tulpinilor de *S.aureus* izolate din piodermite cu localizare cutanată și otite.

Solcan (Solcan, 1998) a prezentat rezultate cu privire la profilul de sensibilitate la 13 antibiotice, a tulpinilor de *Staphylococcus spp.* izolate din piodermite la carnivore de companie. Luând ca punct de referință rezultatele obținute în 1998, prezentăm comparativ rezistența relevată de studiul nostru (tabelul 6.7.). Dinamica evoluției antibiotezistenței este prezentată în fig.6.3.

Tabelul 6.7./Table 6.7.

Antibiotezistența la *Staphylococcus spp.* izolat din piodermite la carnivore de companie

Antibiotic resistance of *Staphylococcus spp.* isolated from pyoderma to pet carnivores

ANTIBIOTIC	REZISTENȚA % (după Solcan, 1998)	REZISTENȚA % Perioada luată în studiu 2013-2017
Amoxicilină	0	57,64
Amoxicilină+ acid clavulanic	0	60
Ampicilină	20	65,88
Bacitracină	20	82,35
Cloramfenicol	0	5,8
Eritromicină	13,3	43,52
Kanamicină	13,3	31,76
Neomicină	0	51,76
Oxacilină	0	23,52
Polimixină	0	57,64
Streptomicină	40	23,52
Tetracilină	46,7	45,88

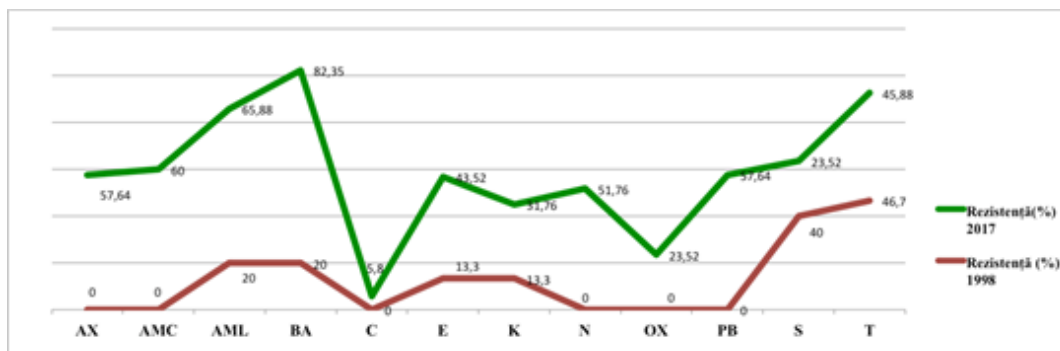


Fig.6.3. Dinamica antibioresistenței izolatelor de *Staphylococcus spp.* din piodermite în perioada 1998-2017
 Fig.6.3. Dynamics of antibioresistance in a bacterial isolates of *Staphylococcus spp.* pyoderma during 1998-2017

6.2.2. Încadrarea MDR, XDR și PDR a tulpinilor de *S. aureus* și *S. pseudintermedius*

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 au prezentat sensibilitate la toate clasele testate (cu rezistență la cel mult un antibiotic din cel mult 2 clase) (tabelul 6.8.). Conform definițiilor prezentate în subcapitolul 6.1., 61 tulpini pot fi încadrate MDR, prezentând rezistență la cel puțin un agent antimicrobian din cel puțin trei clase de antibiotic; iar 2 tulpini au prezentat rezistență la cel puțin un antibiotic din toate clasele (mai puțin două), încadrându-se XDR. Nu a fost detectată nici o tulpină PDR (Fig.6.4.)

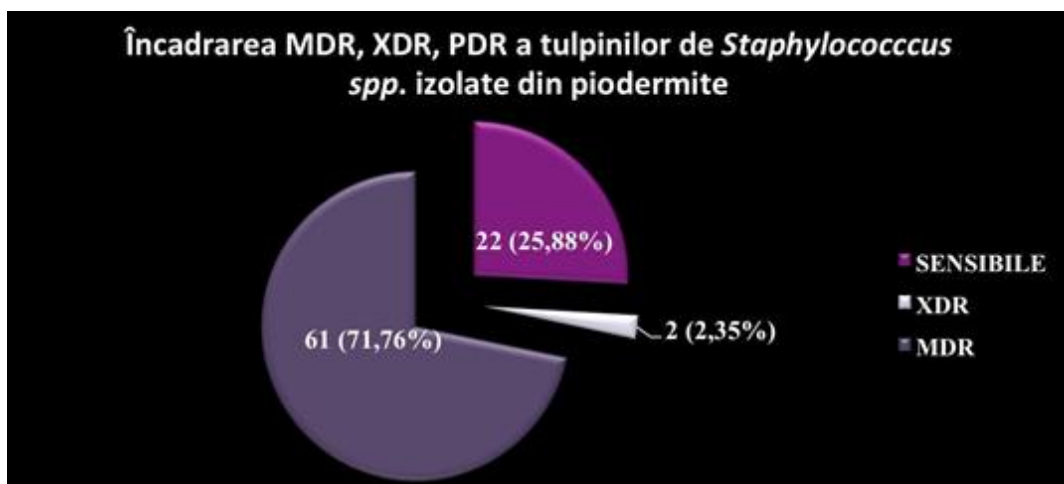


Fig. 6.4. Încadrarea MDR, XDR, PDR a tulpinilor de *Staphylococcus spp.* izolate din piodermite și otite externe

Fig.6.4. MDR, XDR, PDR framing of *Staphylococcus spp.* isolates from pyodermas and external otitis

Un studiu realizat pe tulpini de stafilococi izolate din diferite zone de portaj la câine, a arătat că prevalența tulpinilor MDR este mai mare la câinii bolnavi (54,01%), comparativ cu cei sănătoși (35,7%) (Garbacz, 2013).

Tabelul 6.8./Table 6.8.

Profilul de sensibilitate a tulpinilor de *Staphylococcus spp.*, la 11 clase de antibiotice și încadrarea MDR, XDR, PDR
Strains sensitivity profile of *Staphylococcus spp.* in 11 classes of antibiotics, and framing MDR, XDR, PDR.

Clasă antibiotic	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Nr.probă											
1. MDR	**	*		*		*					
2. MDR	**	*	*	*		*		*			
3. MDR	*	*	*	*	*	*					
4.	**	*									
5. MDR	**	*	*		**	*					
6. MDR	**	*	*		*		*			*	
7. MDR	**	*				*					
8. MDR	**	*	*	*	*	*					
9. MDR	**	*	*		**	**	*				
10. MDR			*		**			*			
11. MDR	**	*	*	**	**			*			
12. XDR	**	*	*	**	**	*	**			*	**
13. MDR	*	*				*					
14. MDR	*	*	*	**	**	*					
15.	*										
16.								*			
17.											
18.	*										
19. MDR	*	*						*			
20.		*									
21.		*									
22. MDR	**	*	*	**	*	*					
23. MDR	**	*	*	**	*	*					
24. MDR	**	*		**		*					
25.											
26. MDR	**	*	*	**		*	**		*	*	
27. MDR	**	*		**		*					
28. MDR	**	*		**		*					
29. MDR	*	*				*					
30. MDR	*	*	*		*	*					
31. MDR	**	*	*	**	*	*					
32. MDR	*	*				*					
33. MDR	*	**	*								
34. MDR	**	**		**		*					
35. MDR		*	**		**					*	
36. MDR	*	*	*			*		*			
37. MDR	*	*				*	**				
38. MDR	**	*		**	*			*			
39.	*	*									
40.	*	*									
41.		*									
42.		*					**				
43.		*									

Clasă antibiotic	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Nr.probă											
44. MDR	*	*	*		*	*					
45. MDR	**	**	*	**	**	**		*	**		
46. MDR		*	*		**	**					
47. MDR	**	**	*	**	**	*					
48. MDR	**	*		**	**	*		*			
49. MDR	**	*	*	**	*	*					
50. MDR	**	*	*	**	**			*			
51. MDR	**	*		**		*				*	
52. MDR	*	*				*					
53. MDR	*	*	*		**					*	
54.	*				**						
55. MDR	**	*	*	**	**	*					
56. MDR	*		*		*	*					
57. MDR	**	*	*	**	*	*					
58. MDR	*	*				*					
59.		*									
60.			*								
61.		*									
62.MDR	**	*	*	*	*	*					
63.MDR	**	*	*	**	*	*					
64.MDR	**			**	**	*		*			
65.MDR		*			*		**			*	
66.MDR	*		*		**	*			**		
67.											
68.											
69.MDR	*		*		**	*					
70.										*	
71.MDR	*	*	*		**	*					
72.MDR	*	*	*		**	*	**				
73.XDR	**	*	**	**	*	*	*	*		*	
74.MDR	**	*	*	**	**	*		*			
75.MDR	*	*	*			*					
76.MDR	*	*			*	*		*			
77.MDR	*	*	*			*		*			
78.MDR		*	*			*		*			
79.MDR	*	*				*					
80.MDR	*	*	*								
81.	*	*									
82.MDR	*	*	*		**	**					
83.MDR	*	*	*		**	**				**	
84.	*		*								
85.MDR	*	*	*								

*izolate rezistente la unele din antibiotice, dar nu la toate;

**izolate rezistente la toate antibioticele din clasa

A=Peniciline, B=Polipeptidice, C=Tetraciline, D=Cefalosporine, E=Macrolide, F=Aminoglicozide,
G=Diaminopiridimina+Sulfonamida, H=Alte structuri, I=Cloramfenicoli, J=Quinolone, Rifamicine.

6.2.3. Testarea *in vitro* a efectului antibacterian al apei încărcate cu plasmă rece (PAW), posibilități terapeutice

Utilizarea PAW în dermatologie reprezintă 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 metilicină considerat o amenințare globală. (Grundmann ș.a., 2006); dezvoltarea unor tratamente topice alternative fiind salutară.

Acest studiu a analizat eficacitatea acțiunii antimicrobiene a PAW asupra izolatelor clinice de *Staphylococcus spp.* coagulazo-pozitive.

Apa care este activată cu plasma rece, capătă un pH acid (2.78 ± 0.12) și conține, printre alte grupări: peroxid de hidrogen (H_2O_2), nitrat (NO_3) și nitrit (NO_2), O_3 , anioni responsabili de degradarea peretelui bacterian, prin intermediul unui efect oxidativ asupra proteinelor, lipidelor și ADNului (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 capsulei, capacitatea de a sporula) (Naitali ș.a., 2010; Kamgang-Youbi ș.a., 2008).

Studiile anterioare arată că acțiunea antimicrobiană a PAW crește în următoarea ordine: levuri, bacterii Gram-pozitive și Gram-negative (Kamgang Youbi ș.a., 2009; Ursache ș.a., 2014). Factorii care pot afecta acțiunea asupra bacteriilor depind de: • grosimea peretelui celular bacterian (la Gram + = 20-80nm, la Gram - = 10-15nm) (Kamgang-Youbi ș.a., 2008); rigiditatea (în Gram +, peretele este rigid, în comparație cu Gram - în cazul căruia peretele este elastic) și / sau structura chimică a peretelui (GLP – structura polipeptidică glucidică și lipidică în Gram- și structura glucidică și polipeptidică în Gram +); existența unor tulpini capsulate (Carp Cărare C., 2014; Guguianu, 2002). Reducerea încărcăturii bacteriene a fost calculată la 3, respectiv 10 minute, rezultatele fiind ilustrate grafic în figura 6.5.

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 7 log. Acțiunea PAW asupra stafilococilor coagulazo-pozitivi s-a dovedit a avea un caracter eterogen. Comportamentul eterogen este mai pronunțat la 3 minute de tratament, comparativ cu 10 minute de tratament. Pentru timpul de tratament de 3 minute, 26 tulpini de *Staphylococcus spp.* au fost plasate în intervalul mediu de reducere de 5 ± 1 log, iar pentru timpul de tratament de 10 minute, în intervalul mediu de reducere de 7 ± 1 log. Acest lucru demonstrează că acțiunea bactericidă este proporțională cu timpul de tratament.

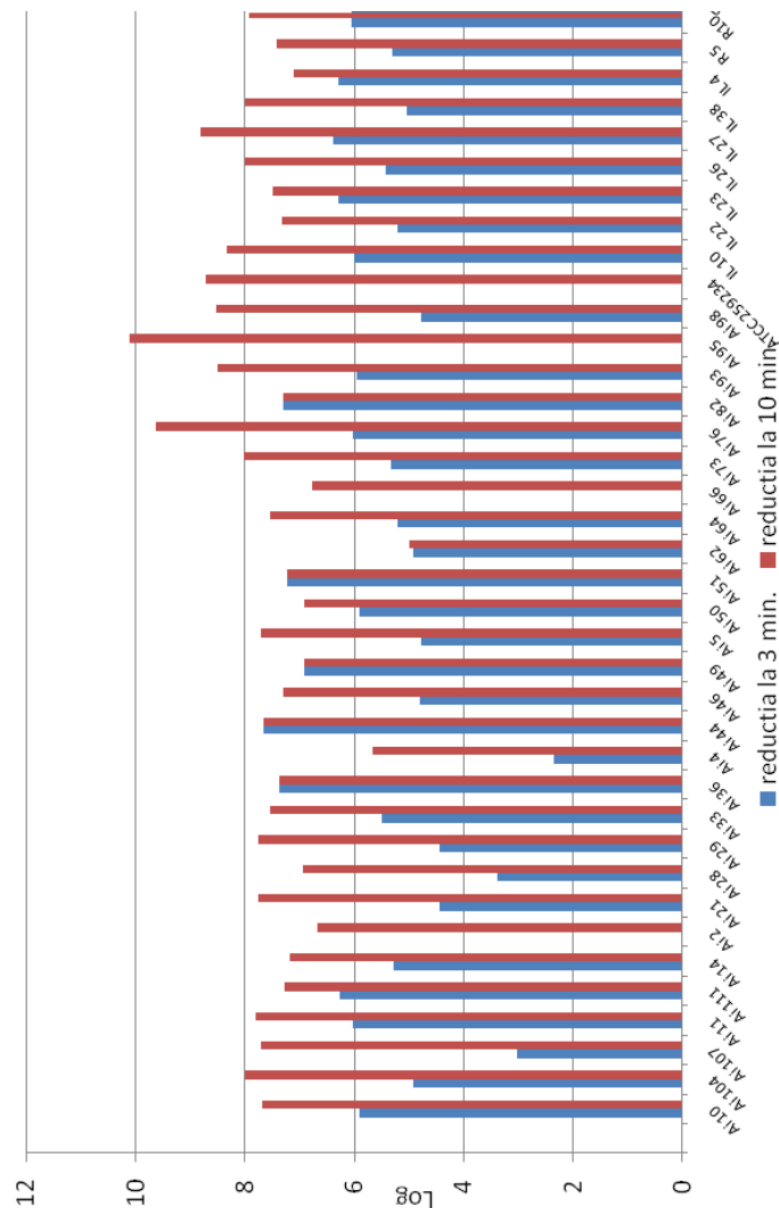


Fig. 6.5. The reduction of *Staphylococcus* spp. after the PAW treatment at 3 and 10 minutes

La patru din cele 39 de tulpini, deși în decurs de 10 minute reducerea a fost completă, a existat o reducere de 0 observată la 3 minute de la tratamentul cu PAW. În cazul a 23 din numărul total de tulpini testate, efectul "cid" a fost complet în 10 minute de la tratamentul cu PAW. La aceste tulpini, s-a observat că inactivarea totală a fost independentă de CFU-ul inoculului inițial, înainte de tratamentul cu PAW, acestea variind între $4,78 \times 10^8$ și $8,3 \times 10^{10}$.

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 (Heinlin ș.a., 2011), considerăm că rezultatele reducăției obținute *in vitro* sunt concludente pentru utilizarea PAW ca agent antimicrobian.

Studii *in vivo* a efectului antiseptic a două tipuri de plasmă (plasmă rece și cea cu barieră dielectrică) asupra degetelor (la om) contaminate artificial cu *S. epidermidis* și *M. luteus*, au confirmat un factor de reducăție cuprins între 0,8 și 1,4. Rezultatele au demonstrat potențialul antiseptic al PAW asupra epidermului (Daeschlein ș.a., 2012)

6.3. Concluzii parțiale

1. Antibioticele cele mai utilizate în terapia de primă intenție a piodermitelor și otitelor externe la câini și pisici, cel puțin în arealul geografic luat în studiu, au fost Amoxicilina potențată cu Acid Clavulanic, Neomicina și Gentamicina.

2. Coroborarea datelor obținute privind rezistența la AMC, AX și AML cu metilino-rezistența, duce la concluzia că terapia etiotropă de primă intenție cu antibiotice betalactamice este riscantă, în 7 din 10 cazuri putând duce la eșec terapeutic.

3. În lotul studiat, detectarea rezistenței inductibile la clindamicină (15,29%) limitează și mai mult obținurile antibioterapiei.

4. Antibioticele cu cele mai mari procentaje de sensibilitate au fost: rifampicina, cloramfenicolul, gentamicina.

5. Prevalența tulpinilor MDR și XDR a fost de 71,76%, respectiv 2,35%, nefiind identificată nici o tulpină PDR, iar peste 50% din tulpinile MDR au fost rezistente la 6 clase din cele 11 testate. Aceste rezultate demonstrează că practica terapiei de primă intenție a devenit riscantă, lipsa unor programe de supraveghere.

6. Analizând evoluția în dinamică a rezistenței la antibiotice a *Staphylococcus spp.* izolate din piodermite, în intervalul 1998- 2017, s-a observat creșterea considerabilă a antibioretistenței cu predilecție la antibioticele utilizate în terapia piodermitelor.

7. Recomandăm evitarea administrării AML, AMX și AMC ca antibioterapie de primă intenție în piodermite la câini și pisici, cel puțin în zona geografică inclusă în studiu, și efectuarea în mod obligatoriu a examenelor bacteriologice și antibiogramelor.

8. Rezultatele studiului *in vitro* privind acțiunea antibacteriană a PAW asupra tulpinilor de *Staphylococcus spp.*, recomandă această metodă ca o variantă de decontaminare

9. În ceea ce privește utilizarea PAW în dermatologie, studiile clinice viitoare vor dovedi impactul asupra organismului căruia i se aplică acest tratament.

CAPITOLUL 7 . CONCLUZII FINALE ȘI RECOMANDĂRI

1. Cercetările au fost realizate în perioada 2013- 2017 pe un lot de 163 cazuri, (98 câini și 65 pisici); prevalența dermatitelor bacteriene fiind de 74,23%.
2. Complicațiile cu piodermite au fost constatate într-un procentaj de 60 la dermatitele micotice și 30 la dermatitele parazitare.
3. Din punct de vedere clinic, din totalul piodermatitelor, 40% s-au încadrat în dermatite superficiale, 30,5% în dermatite profunde și au fost 29,4% cazuri de otite.
4. Bolile primare diagnosticate au fost: atopia, hipotiroidism și demodectie.
5. Agentul etiologic cel mai implicat în piodermite este *Staphylococcus spp.*(70,24%), urmat de *Pseudomonas spp.*(14,04%) și *Streptococcus spp.*(12,39%).
6. În lotul studiat, specia de stafilococi cu cel mai mare prevalență în piodermita și otita externă la câini și pisici a fost *S. aureus* (42,35%), urmată de *S. pseudintermedius* (24,7%).
7. Testările fenotipice au demonstrat prezența tulpinilor MRSA (58,33%).
8. Studiile de biologice moleculară au demonstrat că prevalența ***S. aureus* a fost de 43,58%; *S. pseudintemedius* 23,07%; iar 33,33% s-au încadrat în alte specii de *Staphylococcus* coagulazo-pozitive.**
9. Distribuția tulpinilor de *Staphylococcus spp.* identificate genetic, pe specii a fost: 31,66% *S. pseudintemedius* și 25% *S. aureus* la câini; respectiv 91,30% *S. aureus* și 0% *S. pseudintemedius* la pisici.
10. Corelarea rezultatelor obținute, pe categorii de dermatite luate în studiu a evidențiat faptul principalul agent etiologic ca fiind ***S. aureus*** în următoarele procente: 76,92% în otite; 36,36% în dermatite superficiale și 37,83% în dermatitele profunde.
11. În cazul dermatitelor superficiale a fost identificată implicarea etiopatologică în egală măsură a *S. aureus* cu alte specii de *Staphylococcus* (36,36%).
12. Studiile de biologie moleculară au confirmat prezența *S. pseudintemedius*. ca principal agent etiologic în dermatite bacteriene cutanate la câine ($p < 0,01$).
13. Cercetările au confirmat, prezența genei *mecA* și/sau *mecC* ce codifică metilino-rezistența în proporție de 60%, raportat la numărul total de gene testate, ce codifică rezistența la antibioticele.
14. Genele ce codifică rezistența la mupirocin și acid fusidic au fost identificate într-un procentaj relativ mic, corelat cu utilizarea în practica veterinară a acestor antibiotice, fapt ce le recomandă în tratamentul bacteriozelor cutanate la câine și pisică.
15. Interpretarea statistică a relevat prezența concomitentă la aceleași izolate a câte 3 sau 4 determinanți ai factorilor de virulență ($p < 0,01$), indicând tulpini cu un înalt potențial patogen, în ambele manifestări clinice luate în studiu.
16. Genele ce codifică rezistența la săruri cuaternare de amoniu au fost identificate la tulpini din grupul alți stafilococi..

17. La izolatele stafilococice din otite, s-au depistat gene care codifică producerea de biofilm ($p < 0,01$), ceea ce poate fi pus în legătură, la unele dintre cazurile luate în studiu, cu caracterul cronic al acestora.

18. Antibioticele cele mai utilizate în terapia de primă intenție a piodermitelor și otitelor externe la câini și pisici, cel puțin în arealul geografic luat în studiu, sunt Amoxicilina potențată cu Acid Clavulanic, Neomicina și Gentamicina.

19. Prin coroborarea datelor obținute privind rezistența la AMC, AX și AML cu metecilino-rezistența, concluzionăm că terapia etiotropă de primă intenție cu antibiotice betalactamice este riscantă, în 7 din 10 cazuri putând duce la eșec terapeutic.

20. În lotul testat fenotipic, detectarea rezistenței inductibile la clindamicină (15,29%) limitează și mai mult opțiunile antibioterapiei.

21. Antibioticele cu cele mai mari procentaje de sensibilitate au fost: rifampicina, cloramfenicolul, gentamicina.

22. Prevalența tulpinilor MDR și XDR a fost de 71,76%, respectiv 2,35%, nefiind identificată nici o tulpină PDR. Peste 50% din tulpinile MDR au fost rezistente la 6 clase din cele 11 testate. Aceste rezultate demonstrează că practica terapiei de primă intenție a devenit riscantă, cel puțin în lipsa unor programe de supraveghere a evoluției profilurilor de sensibilitate pe un palier cât mai larg de antibiotice.

23. Comparând datele privind rezistența la antibiotice a *Staphylococcus spp.* izolate din piodermite, în 1998 și 2017, s-a observat creșterea considerabilă a antibioretistenței cu predilecție la antibioticele utilizate frecvent în terapia piodermitelor.

24. Recomandăm evitarea administrării AML, AMX și AMC ca antibioterapie de primă intenție în stafilococii la câini și pisici, cel puțin în zona geografică inclusă în studiu, și efectuarea în mod obligatoriu a examenelor bacteriologice și antibiogramelor.

25. Rezultatele studiului *in vitro* privind acțiunea antibacteriană a apei activate cu plasmă rece asupra tulpinilor de *Staphylococcus spp.*, recomandă această metodă ca o variantă de antisepsie.

26. În ceea ce privește utilizarea PAW în dermatologie, studiile clinice viitoare vor dovedi impactul asupra organismului căruia i se aplică acest tratament.

Elemente de originalitate:

Considerăm un element de originalitate modul de abordare a temei propuse, din perspectiva etiologică, testările fiind făcute pe tulpini izolate din cazuistica provenită din regiunea de nord-est a României și aprofundate până la nivel genetic. *Staphylococcus spp.* a fost identificat genetic și apoi caracterizat genotipic în ceea ce privește rezistența la anumite antibiotice, antiseptice, producerea de biofilm, precum și identificarea unor gene le ce conferă patogenitatea.

Un alt element de originalitate a constat în testările efectuate pe apă activată cu plasmă rece, privind efectul antimicrobian, în vederea utilizării în dermatologia veterinară.

Toate etapele cercetării au fost susținute de o bogată iconografie, originală.

CHAPTER 7. FINAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

1. The research carried out in the period 2013-2017 started from an initial batch of 163 cases coming from 98 dogs and 65 cats; in the studied batch, the prevalence of bacterial dermatitis was 74.23%.

2. The complications with pyodermas were noticed in a percentage of 60% in mycotic dermatitis and 30% in parasitic dermatitis.

3. From a clinical point of view, of the total cases of pyodermas taken into study, 40% were classified as superficial dermatitis, 30.5% as deep dermatitis, and there were 29.4% cases of otitis.

4. The primary diseases diagnosed on the studied batch were: atopic dermatitis, hypothyroidism and demodicosis.

5. The etiological agent most involved in pyodermas is *Staphylococcus spp.* (70.24%), followed by *Pseudomonas spp.* (14.04%), and *Streptococcus spp.* (12.39%).

6. In the studied batch, the staphylococcus species with the highest prevalence in pyoderma and otitis externa in dogs and cats was *S. aureus* (42.35%), followed by *S. pseudintermedius* (24.7%).

7. The studies proved a percentage of 58.33% of MRSA strains.

8. In the case of pyodermas and otitis, the prevalence of ***S. aureus* was 43.58%, *S. pseudintermedius* of 23.07%, and 33.33% were classified in other species of *Staphylococcus coagulase positive*.**

9. The strains from 60 dogs and 23 cats were identified in the following proportions: 31.66% *S. pseudintermedius* and 25% *S. aureus* in dogs, and 91.30% *S. aureus* and 0% *S. pseudintermedius* in cats, respectively.

10. The correlation of the partially obtained results, by categories of dermatitis taken into study, revealed that the main etiological agent is ***S. aureus*** in the following percentages: 76.92% in otitis, 36.36% in superficial dermatitis, and 37.83% in deep dermatitis.

11. In the case of superficial dermatitis, the etiopathological involvement of *S. aureus* with other species of *Staphylococcus* (36.36%) has been identified to an equal extent.

12. The molecular biology studies confirmed the presence of *S. pseudintermedius* as main etiological agent in bacterial skin dermatitis in dogs ($p < 0.01$).

13. The research confirmed, the presence of the *mecA* and/or *mecC* genes, which codifies the methicillin resistance in a percentage of 19.7%.

14. The genes that codify the resistance to mupirocin and fusidic acid have been identified in a relatively low percentage, correlated with the use of these antibiotics in veterinary practice, which recommends them in the treatment of skin bacterioses in dogs and cats.

15. The statistical interpretation revealed the concomitant presence in the same isolated strains of 3, 4 determinants of virulence factors ($p < 0.01$), indicating strains with a

high pathogenic potential, in both clinical manifestations taken into study.

16. The genes that codify the resistance to quaternary ammonium salts have been identified in strains from the group of other staphylococci.

17. In the staphylococcal strains isolated from otitis, genes that codify the production biofilm ($p < 0.01$) have been detected, which can be related, in the cases taken into study, to their chronic characteristic.

18. The most used antibiotics in the first-line therapy of pyodermas and otitis externa in dogs and cats, at least in the geographical area taken into study, are Clavulanic acid-potentiated Amoxicillin, Neomycin and Gentamicin.

19. The corroboration of the obtained data regarding the resistance to AMC, AX and AML with methicillin resistance leads to the conclusion that first-line etiotropic therapy with beta-lactam antibiotics is risky, as in 7 out of 10 cases it might result in therapeutic failure.

20. In the studied batch, the detection of inducible resistance to clindamycin (15.29%) limits the options of antibiotic therapy even further.

21. The antibiotics with the highest percentages of sensitivity were: rifampicin, chloramphenicol, and gentamicin.

22. The prevalence of MDR and XDR strains was 71.76% and 2.35% respectively, while no PDR strain has been identified. More than 50% of the MDR strains were resistant to 6 classes of the 11 classes that we tested. These results prove that the practice of first-line therapy became risky, at least in the absence of programs that monitor the evolution of the sensitivity profiles on a range of antibiotics as wider as possible.

23. By analysing the dynamical evolution of resistance to antibiotics of strains of *Staphylococcus spp.* isolated from pyodermas in the interval 1998-2017, a considerable increase of antibiotic resistance has been noticed mainly in the antibiotics commonly used in the therapy of pyodermas.

24. We recommend to avoid giving AML, AMX and AMC as first-line antibiotic therapy in pyodermas in dogs and cats, at least in the geographical area included in the study, and bacteriological examinations and an antibiogram must be carried out.

25. The results of the *in vitro* study regarding the antibacterial action of PAW on the strains of *Staphylococcus spp.* recommend this method as an option of disinfection and antiseptis.

26. In regard to the use of PAW in dermatology, future *in vivo* clinical trials in histochemistry, histopathology, toxicity etc. will prove the impact on the system to which this treatment is applied.

Original elements:

We consider that an originality element of this Doctoral Thesis is the approaching manner of the proposed theme from the etiological point of view, the tests being made on isolated strains from cases originated from North-Eastern of Romania. Also, we must add that our reserarches have been deepened to a genetic level. *Staphylococcus spp.* was

Abalașei (Lipovan) Irina Elena

genetically identified and then genotypically characterized in terms of resistance to certain antibiotics, antiseptics, biofilm production, as well as genes identification which confer their pathogenicity.

Another originality element consisted in tests performed on cold plasma activated water, regarding the antimicrobial effect, for use in veterinary dermatology.

All stages of this research were supported by an original and rich iconography.

BIBLIOGRAFIE REFERENCES

1. Affinity Chromatography, 2016, *GE Healthcare* , Vol. 1: Antibodies, Ed.AF, Sweden, p. 48.
2. Ahmed E.M., 2014, *Enhancement of the hyaluronidase production from isolated Staphylococcus aureus using factorial design technique and partial purification*, Journal of Molecular Catalysis.B, Enzymatic, 180-187
3. Alhaidari Z., Feldman E.C., 2011, *Change in pigmentation*. Veterinary Internal Medicine, Ed.7, Elsevier Health Sciences, 55-58
4. Aly R., 1996, *Medical Microbiology*, Ed.med.Branch, Ed.IV, chapter 98, Texas
5. Andrews, J.M., R.A. Howe, 2011, *BSAC standardized disc susceptibility testing method(version 10)*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66: 2726-2757
6. Arciola CR., Baldassarri L., Montanaro L., 2001, *Presence of icaA and icaD genes and slime production in a Collection of Staphylococcal Strains from catheter- associated infections*, Journal of Clinical Microbiology, 39(6) 2151-56
7. Bannoehr J, Guardabassi L., 2012, *Staphylococcus pseudintermedius in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity*, Vet Dermatol., 23:253–66
8. Bauman R.W., 2015, *Microbiology with diseases by body system*, Ed.Pearson, SUA
9. Beca N., Bessa L.J., Mendes A., Santos J., Leite-Martins L., Matos A.J., Martins da Costa P., 2015, *Coagulase-Positive Staphylococcus: Prevalence and Antimicrobial Resistance*, Journal of the American Animal Hospital Association 51(6), 365-371
10. Benea V., Benea E., 1998, *Antibioticele in infectiile cutanate si ale partilor moi in "Terapia cu antibiotic*, Ed. Med, București
11. Bensignor E., Germain P.A., 2006, *Dermatologie du chien et du chat*, Éd. MED'COM,p. 256, Paris
12. Bensignor E., 2008, *Atlas des pyodermatites canines*, Editions Med'com, Paris,17
13. Bergstrom CT., Lo M., Lipsitch M., 2004, *Ecological theory suggests that antimicrobial cycling will not reduce antimicrobial resistance in hospitals*, Proc.Natl.Acsd.Sci.USA, 101:13285-13290
14. Boiron C., 2011, *Viitorul Homeopatiei*, Editura Humanitas, București
15. Bokarewa M., Tao J., Andrej T., 2006, *Staphylococcus aureus, Staphylokinase*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Vol.38-4
16. Borbil S., 2011, *Imunodermatologia la câine și pisică*, Ed.Risoprint, pg.135, 147, 196, 420-427, Cluj-Napoca
17. Brisset J-L, Naitali M., Herry JM., Hnatiuc E, Kamgang G., 2012, *Kinetics and Bacterial Inactivation Induced by Peroxynitrite in Electric Discharges in Air*, Plasma Chem Plasma Process, Vol.32, issue 4, pg.675-692

18. Bush k., Jacoby A.G., 2010, *Updated Functional Classification of Beta- Lactamases*, Antimicrob Agents Chemother, 54(3): 969–976.
19. Carlotti D.N., Fourrier P., Magnol J.P., 1988, *Les pyodermites profondes*, Prat.Med.Chir.Anim.Comp., , 23, 6, 487-498
20. Carp Carare M., Timofte D., 1998, *Imunologie și Imunopatologie*, Ed.Vasiliana, p.30, 49, 130, 174, Iași
21. Carp Cărare M., Timofte D., 2002, *Imunologie și Imunopatologie*, Casa de Editură Venus, pg.35, Iași
22. Carp-Cărare C., 2014, *Microbiologie Generală*, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași
23. Carp-Cărare C., 2015, *Bacteriologie Specială. Îndrumător de lucrări practice*, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași
24. Caubet, C., Jonca N., Brattsand M., Guerrin M., Bernard D., Schmidt R., Egelrud T., Simon M., Serre G., 2004, *Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7*, J Invest Dermatol, 122, 1235-1244, SUA
25. Chambers HF., DeLeo FR., 2009, *Waves of Resistance: Staphylococcus aureus in the Antibiotic Era*, Nature reviews Microbiology;7(9):629
26. Chanishvili N., Glonti T., 2007, *Method of disinfection or decontamination of infected pen or building interior using bacteriophages*, Official Bulletin of Industrial Property, p.15-22
27. Chen H.J., 2010, *Fusidic acid resistance determinants in Staphylococcus aureus clinical isolates*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol 54, No 12, 4985-4991,
28. Chesney CJ., 1993, *Water: its form, function and importance in the skin of domestic animals*, Journal of Small Animal Practice, 34, 65-71
29. Clatworthy A.E., Pierson E., Hung D.T., 2007, *Targeting virulence- a new paradigm for antimicrobial therapy*, Nature chemical biology
30. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014, *Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty fourth International Supplement M100-S24*, Wazne, PA, USA CLSI
31. Cole L.K., KwochkaK.W., Kowalski J.J., Hillier A., 1998, *Microbial flora and antimicrobial susceptibility testing of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media*.J Am Vet Med Assoc, 212(4): 534-538
32. Cotea C., 2003 – *Histologie specială*, Ed.Tehnopres, Iași
33. Cowell R., Tyler R., Meinkoth J., DeNicola D., 2008, *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*, 3th edition, Mosby Elsevier, 47-67
34. Cunnion K.M., BuescherE.S., Hair P.S., 2005, *Serum complement factor I decreases Staphylococcus aureus phagocytosis*, J.Lab.Clin Med, 146, 279+86.
35. Cunnion K.M., Hair P.S., Buescher E.S., 2004, *Cleavage of complement C3b to iC3b on the surface of Staphylococcus aureus is mediated by serum complement factor I*, Infection and Immunity, 72, 2858+63.

36. Daeschlein G., Scholz S, Ahmed R, von Woedtke T, Haase H, Niggemeier M, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Juenger M., 2012, *Skin decontamination by low temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma*, J Hosp Infect., 81(3) 177-83
37. DeBoer DJ., Marssella R., 2001, *The ACVD task force on canine atopic dermatitis(XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis*, Vet Immunol Immunopathol, 81:239-249, USA
38. Deilmann M., H.Halfmann, N.Bibinov, J.Wunderlich, P.Awakowicz, 2008, *Low-pressure microwave plasma sterilization of polyethylene terephthalate bottles*. J.Food Prot. 71 2119-23
39. Dexi L., X.Zilan, D.Tianfeng, Z.Xincan, C.Yingguang, L.Xinpei, 2011, *Bacterial-killing effect of atmospheric pressure non-equilibrium plasma jet and oral mucosa response*, J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 31(6):852-856
40. Donlan R.M., 2001, *Biofilm and Device-Associated Infections*, Emerging Infectious Diseases 7.2
41. Dulman O.M., 2016, *Cercetări privind diagnosticul și tratamentul în dermatita atopică la câine*, teză de doctorat, USAMV Iași, pg.185
42. Edwards V.M., Deringer J., Callantine SD., Deobald CF., Berger P., Kapur V., Stauffacher CV., Bohach GA., 1997, *Characterization of the Canine Type C enterotoxin produced by Staphylococcus intermedius pyoderma isolates*, Infection and Immunity, 65, 6, 2346-2352,
43. Elias P.M., 2007, *Semin Immunopathol*, 29: 3. doi:10.1007/s00281-007-0060-9
44. Falkinham JO, 2016, *Current Epidemiologic Trends of the Nontuberculous Mycobacteria (NTM)*, Environ Health Rep., 3(2):161 -7
45. Farrell DJ, Castanheira M., Chopra I., 2011, *Characterization of global patterns and the genetics of fusidic acid resistance*, Clinical Infectious Diseases, suppl.7; 487-92
46. Favrot C., Steffan J., Seewald W., Picco F., A prospective study on the clinical features of canine atopic dermatitis and its diagnosis, Journal Compilation ESVD and ACDV, Vet Dermatol., 21, 23-31.
47. Fazakerley J., Nuttall T., Sales D., Schmidt V., Carter S.D., Hart C.A., McEwan N.A., 2009, *Staphylococcal colonization of mucosal and lezional skin sites in atopic and healthy dogs*, Journal compilation ESVD and ACVD
48. Foster A., Foil C., 2003, *BSAVA Manual of Small Animal Dermatology*, Gloucester:British Small Animal Veterinary Association, 159-160, UK
49. Fourrier P., Carlotti D.N., Magnol J.P., 1988, *Les pyodermes superficielles*.Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie, 23:473-84.
50. Futagawa-Saito K., Makino S., Sunaga F., Kato Z., Sakurai K.N., Ba Thein W., Fukuyasu T., 2009, *Identification of first exfoliative toxin in Staphylococcus pseudintermedius*, FEMS Microbiol Lett 301: 176-180
51. Futagawa-Saito K., Sugiyama T., Karube S, Sakurai N., Ba Thein W., Fukuyasu T., 2004, *Prevalence and characterization of leukotoxin-producing Staphylococcus*

- intermedius* in isolates from dogs and pigeons, *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 11, 5324-5326,
52. Garbacz K., Zarnowska S., Piechowicz L., Haras K., 2013, *Staphylococci isolated from carriage sites and infected sites of dogs as a reservoir of multidrug resistance and methicillin resistance*, *Curr Microbiol.*, 66(2) 169-73
53. Garbacz K., Zarnowska S., Piechowicz L., Haras K., 2013, *Pathogenicity potential of Staphylococcus pseudintermedius strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs*, *Virulence*, 4(3): 255–259
54. Geoghegan J.A., Smith E.J., Speziale P., Foster T.J., 2009, *Staphylococcus pseudintermedius* expresses surface proteins that closely resemble those from *Staphylococcus aureus*, *Vet.Microbiol.*, 18;138(3-4):345-52
55. Germini A., Zanetti A., Salati C., Rossi S., Forre C., Schmid S., Marchelli R., 2004, *Development of a seven target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods*, *J. Agric. Food Chem*, 52, 3275+3280,
56. Golkar Z., Bagasra O., Pace G.D., 2014, *Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis*, *J Infect Dev Ctries*; 8(2):129-136
57. Gomez Sanz E., 2014, *Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in animals: molecular epidemiology, antimicrobial resistance, virulence and zoonotic potential.*, doctoral thesis, Universidad de la Rioja, Spain
58. Greene C.E., 2006, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Elsevier
59. Grundmann H., M.Aires de Sousa, J.Boyce, E.Tiemersma, 2006, *Emergence and resurgence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as a public health threat*. *Lancet*; 368: 874–885
60. Guaguere E., Hubert T., Muller A., Prelaud P., 2004, *Dermatologie du chien*, Masson-AFVAC, Paris, pg.16, 32, 64, 82, 91, 135, 142, 155
61. Guaguere E., Prelaud P., 2006, *Guide Pratique de Dermatologie Canine*, Ed.Merial, France, pg.66
62. Guguianu E., 2002, *Bacteriologie Generală*, Edit. Venus Iași, pg.49-53
63. Guillet V. Roblin P., Werner S., Coraiola M., Menestrina G., Monteil H., Prevost G., Mourez L., 2004, *Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the Staphylococcal β -barrel pore-forming toxins*, *J.Biol.Chem.*279(39) 41028-37
64. Heinlin J., Isbary G., Stolz W., G.Morfill, M.Landthaler, T.Shimizu, B. Steffes, T.Nosenko, L. Zimmermann, Karrer S., 2011, *Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology*, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol.25, pg.1-11
65. Hirsh D., MacLachlan J.N., Walker R.L., 2004, *Veterinary Microbiology*, Ed.Blackwell, Ed.II, SUA.
66. Holmes A, 2005, *Staphylococcus aureus Isolates Carrying Pantone-Valentine Leucocidin Genes in England and Wales: Frequency, Characterization, and Association with Clinical Disease*, *JCM*, SUA

67. Horehani H., Aissa I., Quertani S., Sayari A., 2012, *Staphylococcal lipases: Biotechnological applications*, ResearchGate
68. <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mechanisms-of-antibacterial-drugs/>
69. Iglewski H.B., 1996, *Medical Microbiology*, 4th edition, Ed.Samuel Baron, chapter 27, SUA
70. Issautier MN., 1988, *Precis de Therapeutique en Dermatologie:Homeopathie et Medication simple*, Ed. du Point Veterinaire Maisons Alfort
71. Ivana S., 2007, *Microbiologie Medicală Veterinară*, vol.1, Ed.Stiinte Medicale București, 201
72. Iyori K., Futagawa SK., Hisatsune J., Yamamoto M., Sekiuchi M., Ide K., Fukuyasu T., Iwasaki T., Nishifuji K., 2011, *Staphylococcus pseudintermedius exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes sunburned skin in canine epidermis*, Vet Dermatol, 22, 319-326
73. Kalii A., Stephen S., Umadevi S., 2014, *Laboratory Evaluation Phenotypic Detection Methods of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, Biomed J., 37(6), 411-414
74. Kamgang-Youbi G., Herry JM, Bellon Fontaine MN., Doubla A., Naitali M., 2008. *Impact on disinfection efficiency of cell load and of planktonic/adherent/detached state;case of Hafnia alvei inactivation by POW*. Appl Microbiol Biotechnol 81;449-457
75. Kamgang-Youbi G., J-M.Herry, T.Meylheuc, J-L.Brisset, M-N.Fontaine, A.Doubla and M.Naitali, 2009, *Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by electric discharges*, Applied Microbiology 48:13-18
76. Kil D.Y., 2014, *Companion Animals Symposium: Role of microbes in canine and feline health*, Journal of Animal Science, Vol. 89, No. 5, 2011, pp. 1498-1505.
77. Kubista M., Andrade Jm., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Zoric N., 2006, *The real-time PCR, Molecular Aspects of Medicine*, NCBI, 27, 95-125
78. Kuhment A., 2012, *The forgotten Cure: The past and Future of Phage Therapy*, Springer, New York, pg.170
79. Lam S.J., O'Brien-Simpson N.M., Pantarat N., Sulistio A., Wong E.H.H., Chen YY., Lenyo J.C., Holden J.A., Blencowe A., Reynolds E.C., Qiao G., 2016, *Combating multidrug resistant Gram negative bacteria with structurally nanoengineered antimicrobial peptide polymers*, Nature Microbiology, art.nr.16162
80. Laroussi M., D.Mendis, M.Rosenberg, 2003, *Plasma interactions with microbes*, New Journal of Physics 5, 41.1–10
81. Lautz S., Kanbar T., Alber J., Lammler C., Weiss R., Prenger E., Zschock M., 2006, *Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of Staphylococcus intermedius among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics*, J Vet Med, B53, 434-438
82. Lewis JS., Jorgensen JH., 2005, *Inducible clindamycin resistance in Staphylococci:should clinicians and microbiologists be concerned?*, Clin Infect Dis., 40(2):280-285

83. Lipovan I., Boghean D., Burlacu M., Vulpe V., 2015, *Severe pyoderma in a case of advanced canine hypothyroidism*, Lucrări științifice UȘAMV Iași, Ed.Ion Ionescu de la Brad, vol.58(2), pg.260-265
84. Lloyd H.D., 2008 – *The canine skin microbiota: habitats, acquisition, interactions and exchange*, The European Journal of Companion Animals Practice, Vol.18.
85. Loof T.G., Goldmann O., Naudin C., Morqelin m., Neumann Y., Pils MC., Foster SJ., Medina E., Herwald H., 2015, *Staphylococcus aureus induced clotting of plasma is an immune evasion mechanism for persistence within the fibrin network*, PubMed.gov
86. Lowy FD., 2003, *Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus*, J Clin Invest., 111(9), 1265-1273
87. Magiorakos AP., Srinivasan A., Carey RB., Carmeli Y., Falagas ME., Giske CG., Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL., 2012, *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*, Clin Microbiol Infect; 18: 268–281
88. Martinez JL., Baquero F., Andersson D., 2007, *Predicting antibiotic resistance*, Nat.Rev.Microbiol., 5:958-965
89. Masterton, R. G., 2005. *Antibiotic cycling: more than it might seem?* J.Antimicrob. Chemother. 55:1–5
90. Matousek JL., 2002 - *A comparative review of cutaneous pH*, Veterinary Dermatology, vol.13(6), 293-300.
91. Mayer S., Boos M., Beyer A., 2001, *Distribution of the antiseptic resistance genes qacA, qacB and qacC in 497 methicillin-resistant and -susceptible European isolates of Staphylococcus aureus*, J Antimicrob Chemother, 47, 893-5
92. McAdow M., Missiakas DM., Schneewind O., 2012, *Staphylococcus aureus secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections*, J Innate Immun.
93. McDonnell G., Denver Russell A., 1999, *Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance*. Clinical Microbiology Reviews, 158-166
94. McGrath S., Sinderen D., 2007, *Bacteriophage: Genetics and molecular Biology*, 1st edition, Caister Academic Press, 14-1
95. Medleau L., Hnilica K., 2006, *Small animal dermatology*, Edit. Saunders, Elsevier, SUA, 34-68
96. Melles DC., Van Leeuwen WB., Boelens HA., Peeters JK., Verbrugh HA., Van Belkum A., 2006 *Panton Valentine leukocidin genes in Staphylococcus aureus*, Emerging Infect. Dis., 12(7) 1174-5
97. Mendelsohn C., Rosenkrantz W., Griffin C.E., 2006, *Practical cytology for inflammatory skin diseases*, Clin Tech Small an p, 21(3):117-127
98. Meyer W., Neurand K., 1991, *Comparison of skin pH in domesticated and laboratory mammals*, Arch Dermatol Res 283:16

99. Miller H.W., Griffin G.E., Campbell K.L., 2013, *Muller&Kirk's Small Animal DERMATOLOGY*, 7thed., Elsevier, p.184-185, 192-199
100. Mircean V., 2014, *Dermatologie Veterinară- Îndrumător de lucrări practice*, Ed.Acad.Pres, 44-48
101. Mircean V., Cozma V., 2014, *Dermatologie Veterinară.Ghid practice de dermatologie canină*, ed.a II a., Editura AcademicPres, Cluj, pg.38, 44
102. Mishra A.K., Yadav P., Mishra A., 2016, *A Systemic Review on Staphylococcal Scalded Skin Syndrome(SSSS). A Rare and Critical Disease of Neonates*, Open Microbiol J., 10: 150-159
103. Moodley A., Stegger M., Ben Zakour N.L. et al., 2009, *Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (spa) gene in methicilin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*, Vet.Microbiol., 135, 320-6
104. Moradali M.F., Ghods S., Rehm B.H., 2017, *Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival and Persistence*, Front Cell Infect Microbiol., 7:39
105. Morgan A.P., Nina M.H., Hiruy S.M., Olson J., Gallo R.L., Nizet V., Kristian S.A., 2015, *Beta-Lactamase Repressor Blal Modulates Staphylococcus Aureus Cathelicidin Antimicrobial Peptide Resistance and Virulence*, PlosOne, v.10(8).
106. Moriello K.A., 2017, *Overview of Pyoderma*, MSD Veterinary Manual, available online at <https://www.msdvetmanual.com/integumentary-system/pyoderma/overview-of-pyoderma>
107. Murray P.R., 1995, *Manual of clinical microbiology*, ASM Press, Washington D.C.
108. Musteață M., Hrițcu L.D., Solcan G., 2016, *Medicina internă a animalelor de companie – Ghid Practic*, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași, pg.143- 198
109. Nakamura Y., Oscherwitz J., Cease KB., Chan SM., Munoz P.R., Haseqawa M., Villaruz AE, Cheunq GY., McGavin MJ., Travers JB., Otto M., Inohara N., Nunez G., 2013, *Staphylococcus δ -toxin induces allergic skin disease by activating mastcell*, Nature, 503(7476):397-401, Michigan
110. Nakipoğlu Y., Ignat S., Gurler N, 2012, *The prevalence of antiseptic resistance genes (qacA/B and smr) and antibiotic resistance in clinical Staphylococcus aureus strains*, Mikrobiyol Bul., 46(2):180-9
111. Năstasă V., 2008, *Farmacologie veterinară – ediția a IIa*, Editura Performantica, Iași
112. Năstasă V., 2012, *Farmacologie veterinară II*, Ed.Ion Ionescu de la Brad, Iași, pg.190-215
113. Nuttall T., 2016, *Successful management of otitis externa*, InPractice BMJ, vol.3 issue suppl.2
114. O'Neill AJ., Bostock JM., Moita AM., Chopra I., 2002, *Antimicrobial activity and mechanisms of resistance to cephalosporin P1, an antibiotic related to fusidic acid*, J Antimicrob Chemother., 50(6):839-48

115. Oehmigen K, Hahnel M., Branderburg R, Wilke C, Weltmann K, Woedtke T., 2010,. *The role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids*, Plasma Processes and Polymers, (7), 250-257
116. Papuc I., 2012, *Semiologie medicală veterinară*, Ed. Accent, Cluj, 148-170
117. Parish JC, Witkowski JA.,1992, *Cefalosporin therapy in dermatological practice*. Clin Dermatol; 9:459-69
118. Paterson S., 2008, *Manual of skin diseases of the dog and cat –2nd ed.*, Blackwell Publishing, United Kingdom, p.7-8,
119. Perianu T., 2011, *Tratat de boli infecțioase.Bacterioze.Vol.I*, Ed.Universitat, Iași
120. Petrov V., Mihaylov G., Tsachev I., Zhelev G., Marutsov P., Koev K., 2013, *Otitis externa in dogs:microbiology and antimicrobial susceptibility*, Revue Med Vet., 164, 1, 18
121. Proctor R.A., von Eiff C., Kahl B.C., 2006, *Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections*, Nat.Rev.Microbiol, 4, 295.
122. Proksch E., Brandner JM., Jensen JM., 2008, *The skin: an indispensable barrier*. Exp Dermatol, 17, 1063-1072, SUA
123. Rayner C., Munckhof W., 2005, *Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by Staphylococcus aureus*, Intern Med J, suppl.2, S3-16
124. Răpunțean S., Răpunțean Ghe., 2015, *Bacteriologie Veterinară Specială*, Ed.Press, Cluj Napoca
125. Rees C., 2008, *The new four letter word in veterinary dermatology(Proceedings)*, CVC In San Diego Proceeding
126. Riegel P.Morel LJ., B.Laventie, Boisset S., Vandenesch F., Prévost G., 2010, *Coagulase-positive Staphylococcus pseudintermedius from animals causing human endocarditis*, International Journal of Medical Microbiology, 301, pg.237-239
127. Rossi CC., Ferreira NC., Coehlo ML., Schuenck RP., Bastos C., Giambiaqui M., 2016, *Transfer of mupirocin resistance from Staphylococcus haemolyticus clinical strains to Staphylococcus aureus through conjugative and mobilizable plasmids*, FEMS microbial Lett., 363(14)
128. Ruedisueli F.L., 1998, *The measurement of skin pH in normal dogs of different breeds*, Advances in veterinary dermatology III, Butterworth Heinemann, p.521, Boston
129. Ruzauskas M., Couto N., Pavilonis A., Klimiene I., Siugzdiniene R., Virgailis L., Vaskeviciute L., Anskiene L., Pomba C., 2016, *Characterization of Staphylococcus pseudintermedius isolated from diseased dogs in Lithuania*, Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 19, No. 1, 7–14
130. Ryan J.K., Ray C.G., 2003, *Sherris Medical Microbiology. An introduction to Infectious Diseases*. 4th ed., McGraw Hill, pg.237
131. Sasaki T., Tsubakishita S., Tanaka Y., Sakusabe A., Fukata T., Hiramatsu K., 2010, *Multiplex PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci*, J Clin Microbiol., 48(3), 765-769

132. Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E., 2001, *Bacterial skin diseases*, In: Muller and Kirk's *Small Animal Dermatology*, 6th edition, Philadelphia PA:WB Saunders Co., 277-279
133. Scott DW, 1980, *Feline dermatology 1900-1978: A monograph*, J Am Anim Hosp Assoc 16:331, SUA
134. Sevilla L.M., Nachat R., Groot K.R., Klement F.J., Uitto J., Djian P., Maatta A., Fiona M.W., 2007, *Mice deficient in involucrin, envoplakin, and periplakin have a defective epidermal barrier*. J Cell Biol, 179, 1599-1612, UK
135. Sing A., Tuschak C., Hormansdorfer S., 2008, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in a family and its pet cat*, N Engl.J med, pg.1200-1201,
136. Sladek R.E.J., Filoche, S.K. Sissons, C.H., Stoffels E, 2007, *Treatment of Streptococcus mutans biofilms with a nonthermal atmospheric plasma*, Lett Appl Microbiol 45, 318-323
137. Smith K., Gemmell C. G., Hunter I. S., 2008, *The association between biocide tolerance and the presence or absence of qac genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates*, J Antimicrob Chemother, 61, 78-84
138. Solcan C., Sisea C.R., 2012, *Biologie Moleculară*, Edit. Ion Ionescu de la Brad , Iasi,153- 158
139. Solcan Ghe., 1998, *Contribuții la studiul afecțiunilor cutanate ale carnivorelor domestice*, teză de doctorat, USAMV Iași, pg.109
140. Solcan Ghe., Mitrea I.L., Miron L., Solcan C., 2003, *Dermatologia animalelor de companie*, Edit. Ion Ionescu de la Brad , Iasi, 51-60
141. Somma M., 2006, *The Polymerase chain reaction. Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organism*, Office for the Official Publications of the European Communities, Luxemburg, online <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals>
142. Strommenger B., Kehrenberg C., Kettlitz C., Cunz C., Verspohl J, 2006, *Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from pet animals and their relationship to human isolates*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, PG.461
143. Sun J., Deng Z., Yan A., 2014, „*Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations*”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 453(2):254-67
144. Sykes J.E., 2014. *Nocardiosis. Canine and Feline Infectious Diseases*, Elsevier, 409
145. Szekely E., Lorinczi L., Bilca D., Sabău M., 2006, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus involved in hospital-acquired infections in Mures County University Hospital*, Revista Română de Medicină de Laborator, nr.4(3)
146. Tankeshwar A., 2016, *Virulence factors of Streptococcus pyogenes and their roles*, available online at www.microbeonline.com

147. Terauchi R, Sato H., Hasegawa T., Yamaguchi T., Aizawa C., Maehara N., 2003, *Isolation of exfoliative toxin from Staphylococcus intermedius and its local toxicity in dogs*. Vet Microbiol., 94:19–29
148. Theuretzbacher U., 2011, *Resistance drives antibacterial drug development*, Current Opinion in Pharmacology, 11(5):433-438
149. Toma M., Toma A., 2002, *Homeopatie Veterinară*, Editura Argument, București
150. Torno MA., Knecht E., Gotz F., Lasa I., Penades JR., 2005, *Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer?*, Microbiology, 151(7) 2465-75
151. Ursache M., Moraru R., Hnatiuc E., Nastase V., Mares M., 2014, *Comparative assesment of the relation between energy consumption and bacterial burden reduction using plasma activated water. Optimization of Electrical and Electronic Equipment (OPTIM)*, International Conference on.1035-1041
152. Vali L., Davies S. E., Lai L. L. G., Dave J., Amyes S. G. B., 2008, *Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61, 524-532
153. Vasuvedan P., Nair MK., Annamalai T., Venkitanarayanan KS., 2003, *Phenotypic and genotypic characterization of bavione mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation*. Vet Microbiol, 92, 179-185,
154. Vâță D., Solovăstru L.G., Diaconu D., Vâță A., Dorobăț C., 2011, *Posibilități și limite ale antibioterapiei actuale în manifestările cutanate bacteriene*, Dermato Venerol.(Buc.), 56:273-280
155. Vincze S., Branderburg AG., Espelage W., Stamm I., Wieler LH., Kopp P., Lubke Becker A., Walther B., 2014, *Risk factors for MRSA infection in companion animals: Results from a case-control study within Germany*, Int J Med Microbiol., 307(7) 787-793
156. Vithoulkas G., 2002, *Un nou model pentru sănătate și boală*, Editura Pan Europe, Iași
157. Vleugels M., G. Shama, X. Deng, E.Greenacre, T.Brocklehurst, M.Kong., 2005, *Atmospheric plasma inactivation of biofilm-forming bacteria for food safety control*, IEEE Trans.Plasma Sci.33 824-8
158. Vulpe V., 2002, *Semiologie medicală veterinară, vol.1, Semiologie Generală*, Edit. Pim Iași, 72-90
159. Vulpe V., 2016, *Semiologie Generală Veterinară*, Ed.Pim, Iași, pg.63, 73, 151,116-12, 222
160. Walter B., Hermes J., Cuny C., Wieler LH., Vincze S., Elnaga YA., Stamm I., Kopp PA., Kohn B., Witte W., Jansen A., Conraths FJ., Semmler T., Eckmanns T., Lubke-Becker A., 2012, *Nasal Colonisation- Positive Staphylococci (CPS) and Co-Habitation Aspects of Dogs and Their Owners*, Plos One, Vol 7, Issue 4, e 35197

161. Wheeler C.K., DeCesare G.E., Manneri R.J., Payne W.G., Robson M.C., 2005, *Cutaneous Nocardiosis*, WOUNDS A Compendium of Clinical Research and Practice, vol.17(5), 131-136.
162. Witte W., 2007 *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus ST398 in humans and animals, central Europe*, Emerging Infectious Diseases, vol.13, pg.255-258
163. Worthington R.J., Melander C., 2013, *Overcoming Resistance to β -Lactam Antibiotics*, The Journal of Organic Chemistry, 78(9), 4207-13
164. Zadoks R.N., Schukken Y.H., 2006, *Use of Molecular Epidemiology in Veterinary Practice*, Vet Clin Food Anim 22, 229-261

ANEXA 1. LISTĂ ABREVIERI ANNEX 1. ABBREVIATIONS LIST

µg- microgram
 ADN- acid dezoxiribonucleic
 AMC- amoxicillin+ acid clavulanic
 AML- ampicilin
 ARN- acid ribonucleic
 ASLO- antistreptolizina
 AX- amoxicillin
 BA- bacitracin
 BET- bromură de etidiu
 BHI- infuzie creier cord (bulion)
 BPOC- bronho pneumonie cronică obstructivă
 BSAC- British Society for Antimicrobial Chemotherapy
 C- cloramfenicol
 CD1, CD14, CD35- cluster of differentiation
 CFU- inițări formatoare de colonii
 CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute
 CMI- concentrație minimă inhibitorie
 CN- gentamicin
 DA- clindamicin
 DO- doxiciclin
 E- eritromicin
 EF-G- elongation factor G
 ENR- enrofloxacin

EUCAST- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FD- acid fusidic
F.D. – frotiu direct
FOS- fosfomicin
FOX- cefoxitin
IgA- imunoglobulina A
K- kanamicin
LNZ- linezolid
Log- logaritm
MAR- marbofloxacin
MDR- multi drog resistance
ml- mililitru
MRSA- metililino rezistent *S.aureus*
MRSE- metililino rezistent *S.epidermidis*
MRSP- metililino rezistent *S.pseudintermedius*
N- neomycin
NOR- norfloxacin
OX- oxacilin
PAW- apă activată cu plasmă
pb- perechi de baze
PB- polimixin B
PBPs- penicillin binding protein 2A
PCR- Polimerase Chain Reaction
PDR- pan drog resistance
Ph- potențial de hidrogen
PO- per os
PVL- Pantan Valentine leukocidin
R- rifampicin
rpm- rotații pe minut
S- streptomycin
T- tetracilin
TAE- tampon Tris-Acetate-EDTA
TLR- receptori toll-like
TXS- trimetoprim+ sulfodiazin
VA- vancomycin
XDR- extended drog resistance
μl- microlitru

ANEXA 2. LISTA TABELELOR

Tabelul 1.1	Microbiota bacteriană cutanată la câine și pisică	33
.....		
Tabelul 2.1.	Clasificări ale piodermitelor	44
.....		
Tabelul 2.2.	Propunere de clasificare a piodermitelor (după Solcan, 2003), completată cu leziunile cutanate	45
.....		
Tabelul 2.3.	Criterii de încadrare a piodermitelor	46
.....		
Tabelul 2.4.	Examenul citologic și dermatopatii sugerate	47
.....		
Tabelul 2.5.	Caracteristici fizico-chimice și mod de acțiune ale diferitelor clase de antibiotice	51
.....		
Tabelul 2.6.	Recomandări antibioterapie sistemică (după Miller ș.a., 2013)	52
.....		
Tabelul 2.7.	Recomandări antibioterapie sistemică (după Paterson, 2008)	53
.....		
Tabelul 2.8.	Alegerea empirică a antibioticului (după Mircean, 2014)	53
.....		
Tabelul 2.9.	Principalele asocieri de antibiotic și acțiunile lor	54
.....		
Tabelul 2.10.	Distribuția S.pseudintermedius și S.aureus în diferite site-uri, la câinii atopici și sănătoși	54
.....		
Tabelul 4.1.	Cazuistica luată în studiu în perioada martie 2014 – iunie 2017	63
.....		
Tabelul 4.2.	Diagnosticul dermatitelor bacteriene, micotice și parazitare	66
.....		
Tabelul 4.3.	Agenții etiologici identificați în piodermite și otite	75
.....		
Tabelul 4.4.	Incidența MRSA la nivelul țesutului cutanat în diferite țări	76
.....		
Tabelul 5.1.	Caracteristicile primerilor utilizați pentru PCR-multiplex	79
.....		
Tabelul 5.2.	Proveniența și distribuția tulpinilor de stafilococi testate prin PCR	80
.....		
Tabelul 5.3.	Primeri utilizați pentru identificarea genelor studiate	81
.....		

Tabelul 5.4. Prevalenta tulpinilor de Stafilococi pe specii de animale și afecțiuni.....	83
Tabelul 5.5. Ponderea speciilor de Staphylococcus spp. pe specii de animale de companie.....	83
...	
Tabelul 5.6. Repartiția procentuală a genelor de rezistență la beta lactamice, mupirocin și acid fusidic la total gene rezistente la antibiotic.....	85
Tabelul 5.7. Repartiția procentuală a genelor de virulență pe 76 tulpini Staphylococcus spp.testate.....	87
..	
Tabelul 5.8. Repartiția tulpinilor de stafilococi analizate genotipic pe specii de animale și afecțiuni.....	88
Tabelul 5.9. Repartiția genelor identificate în piodermite cu localizare cutanată și otite.....	89
..	
Tabelul 5.10. Rezistența la oxacilină și acid fusidic, identificate prin metode fenotipice și PCR.....	89
Tabelul 6.1. Antibioticele utilizate pentru încadrarea tulpinilor de Staphylococcus spp. în MDR, XDR, PDR.....	95
Tabelul 6.2. Repartiția MRSA și rezistența la betalactamice.....	98
Tabelul 6.3. Profil de sensibilitate la OX, AMC, AMX, AML în lotul de 34 tulpini de S. aureus izolate din piodermite și otite.....	100
Tabelul.6.4. Patologia corespunzătoare fiecărei tulpini de S. aureus identificate.....	100
Tabelul.6.5. Profilul de rezistență a tulpinilor de Staphylococcus spp. la antibioticele testate.....	10
Tabelul 6.6. Antibiotice utilizate în terapia piodermitelor și otitelor la câini și pisici.....	103
Tabelul 6.7. Antibio rezistența la Staphylococcus spp.izolat din piodermite la carnivore de companie.....	103
Tabelul 6.8. Profilul de sensibilitate a tulpinilor de Staphylococcus spp., la 11 clase de antibiotice și încadrarea MDR, XDR, PDR.....	105

ANNEX 2. LIST OF TABLES

Table 1.1	Bacterial microbiota skin in dogs and cats.....	33
Table 2.1.	Classifications of pyodermatites.....	44
Table 2.2.	Proposal for the epidermis classification, supplemented with cutaneous lesions.....	45
Table 2.3.	Piodermytis framing criteria.....	46
Table 2.4.	The cytological examination and suggested dermatopathies.....	47
Table 2.5.	Physicochemical characteristics and action of different antibiotics classes.....	51
Table 2.6.	Systemic antibiotherapy recommendations (după Miller ș.a., 2013).....	52
Table 2.7.	Systemic antibiotherapy recommendations.....	53
Table 2.8.	Empiric choice of antibiotic.....	53
Table 2.9.	The main antibiotic associations and their actions.....	54
Table 2.10.	S.pseudintermedius and S.aureus distribution in different sites in atopic and healthy dogs.....	54
Table 4.1.	Case study, during March 2014 - June 2017.....	63
Table 4.2.	Diagnosis of bacterial, fungal and parasitic dermatitis.....	66
Table 4.3.	Etiological agents identified in pyoderma and otitis.....	75
Table 4.4.	The incidence of MRSA in the skin tissues in different countries.....	76
Table 5.1.	Characteristics of primers used for PCR-multiplex.....	79
Table 5.2.	The origin and distribution of staphylococcus tested strains.....	80

Table 5.3. Primers used to identify the genes sought.....	81
Table 5.4. The prevalence of Staphylococcus strains by animal species and affections..	83
Table 5.5. Prevalence of Staphylococcus spp. by pets species.....	83
Table 5.6. Percentage distribution of beta lactam resistance, mupirocin and fusidic acid genes to total antibiotic resistant genes.....	85
Table 5.7. The percentage distribution of virulence genes in the 76 strains of Staphylococcus spp.tested.....	87
Table 5.8. Distribution of strains of staphylococci analyzed genotypically by animal species and affection.....	88
Table 5.9. Distribution of genes identified in piodermatitis and otitis.....	89
Table 5.10. Fusidic acid and oxacillin resistance, identified by phenotypic methods and PCR.....	89
Table 6.1. Antibiotics for assigning Staphylococcus spp.in MDR, XDR, PDR.....	95
Table 6.2. MRSA and betalactam resistance distribution.....	98
Table 6.3. Sensitivity profile for OX, AMC, AMX, AML in the group of 34 strains of S. aureus isolated from pyoderma and otitis.....	100
Table 6.4. The pathology corresponding to each strain of S. aureus identified.....	100
Table 6.5. The resistance profile of Staphylococcus spp. to the antibiotics tested.....	101
Table 6.6. Antibiotics used in pyoderma and otitis therapy, in dogs and cats.....	103
Table 6.7. Antibiotic resistance of Staphylococcus spp.isolated from pyoderma to pets carnivores.....	103
Table 6.8. Strains sensitivity profile of Staphylococcus spp. in 11 classes of antibiotics and framing MDR, XDR, PDR.....	105

ANEXA 3. LISTA FIGURILOR

Fig.1.1. Structura pielii (Cotea, 2003)	31
Fig.1.2. Componentele sistemului imun (după Carp M., 2002)	38
Fig.2.1. Emergența rezistenței la antibiotice (Clatworthy ș.a., 2007)	49
Fig.2.2. Tratament etiologic în Piodermite la Carnivore de Companie (original)	50
Fig.4.1. Pisică, zona perianală, eritem, plăci de grataj (original)	63
Fig.4.2. Câine, pustule, alopecie generală cruste (original)	63
Fig.4.3. Pisică, cruste zona cervicală (original)	64
Fig.4.4. Pisică, ulceratii cutanate (original)	64
Fig.4.5. Câine, vezicule-diferite stadii (original)	64
Fig.4.6. Câine, fistule interdigitale (original)	64
Fig.4.7. Câine, piogranulom (original)	64
Fig.4.8. Câine, scuame psoriaziforme (original)	64
Fig. 4.9. Câine, ulceratie pavilionulauricular (original)	65
Fig. 4.10. Pisică, supurație, abces, zonapelveină (original)	65
Fig. 4.11. Câine, cruste, fisuri, dermatită de jonctiune cutaneo-mucoasă (original)	65
Fig. 4.12. Câine, ulceratie cu exudatie seropurulentă (original)	65
Fig.4.13. Pisică, cruste, eritem, exudatpurulent (original)	65
Fig.4.14. Câine, abces zona toracală (original)	65
Fig. 4.15. Câine, abces hemoragic, pavilion auricular (original)	66
Fig. 4.15. Dog, hemorhagic abscess, auricular pavilion (original)	66
Fig.4.16. Câine, hiperkeratoză, seboree uleioasă (original)	66
Fig. 4.17 FD, col Gramx100, neutrofile degenerate, coci gram pozitivi (original)	67
Fig. 4.18. FD, col Gramx100, neutrofile nedegenerate, coci gram pozitivi (original)	67
Fig. 4.19. FD, col Gramx100, Malassezia (original)	67
Fig. 4.20. col Gram x 100, bacterii gram pozitiv și gram negative (original)	67
Fig. 4.21. FD, col.Gram x 100, filamente <i>Nocardia spp</i> (original)	68
Fig. 4.22. FD, col.Ziehl-Neelsen x 100 bacilli acido-rezistenți (original)	68
Fig. 4.23. Staphylococcus.spp mediu agarsânge (original)	68
Fig. 4.24. Fermentarea manitolului (original)	68
Fig. 4.25. Test de aglutinare latex. Stanga, tulpina martor pozitiv S.aureus ATCC 25923 (original)	69
Fig. 4.26. Galerie RapiD Staph Plus Panel (original)	69
Fig. 4.27. Testul de coagulare a plasmei citratate de iepure (original)	69
Fig. 4.28. Antibiorame (original)	69
Fig. 4.29. Ponderea dermatitelor și otitelor funcție de natura lor	70

Fig. 4.30. Pisică, ulceratii (original)	72
Fig. 4.31. Material purulent, nocardioză (original).....	72
Fig. 4.32. Căine, formațiune nodulară articulația humero-radio-ulnară (original)	73
Fig. 4.33. Căine, formațiune nodulară reg.buccinatorie stângă (original)	73
Fig. 4.34. Cocker spaniel, 9 ani, piodermita recidivantă (original)	74
Fig. 4.35. Păr uscat și fragil, hiperpigmentare și hiperkeratoză (original).....	74
Fig. 4.36. Regenerarea părului și dispariția leziunilor după 8 săptămâni de tratament (original)	74
Fig. 4.37. Rezoluția otitei externe cu refacerea aspectului normal al pavilionului urechii (original).....	74
Fig.4.38. Diagrama prevalenței agenților etiologici în piodermatite la câini și pisici (original)	75
Fig.4.39. Principalele specii de <i>Staphylococcus</i> identificate.....	76
Fig.5.1. Specii de <i>Staphylococcus</i> spp. identificate prin PCR Multiplex	82
Fig.5.2. Electroforeza după PCR multiplex. Benzile: 1, 2, 4-12 = <i>S. aureus</i> ; 2 = <i>S. aureus</i> (M+); 3 = M – 13; 18-20 = <i>S. pseudintermedius</i> ; 18 – <i>S. pseudintermedius</i> (M+). M+ = martor pozitiv M - = martor negativ	82
Fig.5.3. Repartizarea procentuală a speciilor de <i>Staphylococcus</i> pe categorii de de piodermite și otite	84
Fig.5.4. Distribuția genelor de virulență în lotul de <i>Staphylococcus</i> spp.	90
Fig.5.5. Distribuția producției de biofilm în otite	91
Fig.5.6. Distribuția rezistenței la antibiotice/patologii	92
Fig.6.1. Apariția și evoluția MRSA (după Chambers ș.a., 2009)	97
Fig.6.2. “forma D” între microcomprimatele de eritromicină	102
și clindamicină.....	102
Fig.6.3. Dinamica antibioretistenței izolatelor de <i>Staphylococcus</i> spp. din piodermite în perioada 1998-2017	104
Fig. 6.4. Încadrarea MDR, XDR, PDR a tulpinilor de <i>Staphylococcus</i> spp. izolate din piodermite și otite externe	104
Fig.6.5. Reducția <i>Staphylococcus</i> spp. după 3 și 10 min. de tratare cu PAW	108

ANNEX 3. LIST OF FIGURES

Fig.1.1. Skin structure (Cotea, 2003).....	31
Fig.1.2. The components of the immune system (after Carp M., 2002).....	38
Fig.2.1. Timeline of antibiotic resistance(Clathworthy ş.a., 2007)	49
Fig.2.2. Etiological treatment in pets pyoderma (original).....	50
Fig.4.1. Cat, perianal area, erythema, gratingplates (original)	63
Fig.4.2. Dog, pustule, general alopecia,crusts (original)	63
Fig.4.3. Cat, crusts, cervical area (original).....	64
Fig.4.4. Cat, cutaneous ulceration (original)	64
Fig.4.5. Dog, vesicles different stages (original).....	64
Fig.4.6. Dog, interdigital fistulas (original).....	64
Fig.4.7. Dog, piogranuloma (original).....	64
Fig.4.8. Dog, psoriasiform flakiness (original)	64
Fig. 4.9. Dog, ulceration auricularpavilion (original).....	65
Fig. 4.10. Cat, suppuration abscess, pelvisarea (original)	65
Fig. 4.11. Dog, crusts, cracks, dermal cutaneous mucosal junction (original)	65
Fig. 4.12. Dog, ulceration with seropurulent exudation (original)	65
Fig.4.13. Cat, crusts, erythema, purulentexudate (original)	65
Fig.4.14. Dog, abscess thorax area (original)	65
Fig. 4.15. Dog, hemorrhagic abscess, auricular pavilion (original)	66
Fig.4.16. Dog, hyperkeratosis, oilyseborrheic (original).....	66
Fig. 4.17 FD, Gram x100, degenerated neutrophils, gram positive cocci (original)	67
Fig. 4.18. FD, Gram x100, non-degenerated neutrophils, gram positive cocci (original)	67
Fig. 4.19. FD, col Gramx100, Malassezia (original).....	67
Fig. 4.20. Gram x 100 gram, gram positive and negative bacteria (original).....	67
Fig. 4.21. FD, col.Gram x 100, <i>Nocardis spp.</i> filaments (original).....	68
Fig. 4.22. FD, col.Ziehl-Neelsen x 100 acid-resistant bacilli (original)	68
Fig. 4.23 Staphylococcus spp., blood agarmedium (original).....	68
Fig. 4.24. Fermentation of mannitol (original).....	68
Fig. 4.25. Latex agglutination test. Left, positive control strain S.aureus ATCC 25923 (original).....	69
Fig. 4.26 RapiD Staph Plus Galleries Panel (original)	69
Fig. 4.27. The Clotting of Rabbit Plasma (original).....	69
Fig. 4.28. Antibigrams (original).....	69
Fig.4.29 The proportion of dermatitis and otitis depending on their nature	70

Fig. 4.30. Cat, ulcerations (original).....	72
Fig. 4.31. Purulent material, nocardiosis (original)	72
Fig. 4.32. Dog, nodular formation the humerus-radio-ulna joint (original)	73
Fig. 4.33. Dog, nodular left buccinatorie region (original).....	73
Fig. 4.34. Cocker spaniel, 9 years, recurrent pyodermitis (original)	74
Fig. 4.35. Dry and brittle hair, hyperpigmentation and hyperkeratosis (original)	74
Fig. 4.36. hair regeneration, lesions wellreduced (original)	74
Fig. 4.37. external otitis resolution, restoration of normal appearance of ear pavilion (original)	74
Fig.4.38. Diagram of prevalence of etiologic agents in dogs and cats piodermas and otitis (original)	75
Fig.4.39. The main species of <i>Staphylococcus</i> identified.....	76
Fig.5.1. <i>Staphylococcus</i> spp. PCR Multiplex identified	82
Fig.5.2. Electrophoresis after multiplex PCR. Bands: 1, 2, 4-12 = <i>S. aureus</i> ; 2 = <i>S.</i> <i>aureus</i> (M+); 3 = M - 13; 18-20 = <i>S. pseudintermedius</i> ; 18 - <i>S. pseudintermedius</i> (M+) M + = positive control M = negative control	82
Fig.5.3. Percentage distribution of <i>Staphylococcus</i> spp. on categories of pyodermitis and otitis	84
Fig.5.4. Distribution of virulence genes at <i>Staphylococcus</i> spp	90
Fig.5.5.Distribution of biofilm production in otitis	91
Fig.5.6.Distribution of resistance to antibiotics/pathologies	92
Fig. 6.1. The emergence and evolution of MRSA (after Chambers ș.a., 2009).....	97
Fig.6.2. „D form” between erythromycin and clindamycin discs	102
Fig.6.3. Dynamics of antibioresistance in a bacterial isolates of <i>Staphylococcus</i> spp. pyoderma during 1998-2017	104
Fig.6.4. MDR, XDR, PDR framing of <i>Staphylococcus</i> spp. isolates from pyodermas and external otitis.....	104
Fig. 6.5. The reduction of <i>Staphylococcus</i> spp. after the PAW treatment at 3 and 10 minutes	108

ANEXA 4. LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

ANNEX 4 . SCIENTIFIC PAPERS PUBLISHED

PRIM AUTOR:

1. Irina ABALAȘEI (LIPOVAN), Mihai MAREȘ, Ozana DULMAN, Eleonora GUGUIANU, Vasile VULPE, 2014, *Prospective study concerning the incidence of meticillin-resistant staphylococci isolated from different dermatological disorders in pets*, Lucrări Științifice USAMV Iași – seria Medicină Veterinară, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași volumul 57/2014 (nr.1-2) , pg.195-199

2. LIPOVAN (ABALAȘEI) Irina, BOGHEAN Dragos, ROȘCA BURLACU Mădălina, VULPE Vasile, 2015, *Severe pyodermain a case of advanced canine hypothyroidism*, Lucrări Științifice USAMV Iași – seria Medicină Veterinară, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași volumul 58/2015 (nr.2), pg.260-265

3. LIPOVAN (ABALAȘEI) Irina, BURLACU Mădălina, MAREȘ Mihai, VULPE Vasile, 2015 *Dermal fistulous ulcers in a case of feline nocardial mycetoma*, Published in Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine, Vol. LXI, Bucuresti., Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine, Vol. LXI, ISSN 2065-1295, 139-142.

4. LIPOVAN (ABALAȘEI) Irina, BOSTĂNARU Andra Cristina, NĂSTASĂ Valentin, HNATIUC E., VULPE Vasile, MAREȘ Mihai, 2015, *Assessment of the antimicrobial effect of non-thermal plasma activated water against coagulase-positive staphylococci*, Bulletin Of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine, Vol 72, No 2, 357- 362.

5. ABALAȘEI (LIPOVAN) Irina, MAREȘ Mihai, BEȘCHEA Sorin, VULPE Vasile, 2017, *Preemptive therapy of skin infections in dogs and cats – evidence for Staphylococcus aureus beta-lactams resistance*, Lucrări științifice veterinare vol.L.(2), Timișoara, pg.5-11

COAUTOR:

6. DULMAN Ozana, TIMOFTE Dorina, LIPOVAN (ABALAȘEI) Irina, MORARU Ramona, MAREȘ Mihai, SOLCAN, Gheorghe, SCHMIDT Vanessa, 2016, *Geographical variations in virulence factors and antimicrobial resistance amongst staphylococci isolated from atopic dogs: the United Kingdom compared to Romania*, Veterinary Dermatology, in evaluation

7. CIOCAN Oana – Alexandra, COZMA Andreea–Paula, LIPOVAN (ABALAȘEI) Irina, GUGUIANU Eleonora, PÂNZARU Carmen-Valentina, MAREȘ Mihai, CARP – CĂRARE Mihai, CARP – CĂRARE Cătălin, 2015, *Antibiotics resistance dynamics of isolated Pseudomonas aeruginosa strains in a hospital from northeastern Romania in the period 2012 – 2014*, Lucr.șt. Med. Vet., 58(17) partea aIIIa, ISSN: 1454-7406, 469-473

Abalașei (Lipovan) Irina Elena

8. BARBAZAN C.M, GAVRILAȘ E., BAISAN A., TIPIȘCĂ V., DARABAN C., ANCUȚA A., **LIPOVAN (ABALAȘEI) Irina**, VULPE V. , 2013, *Sisthematic approach of pleural effusions in domestic carnivores 51 cases - clinical, imagistic, microbiological and cytological findings*, Bulletin of University of agricultural Sciences and Vererinary Medicine, Veterinary Medicine, Cluj.