



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ**

**CLUJ-NAPOCA**

**ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ**

**UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI” , FACULTATEA DE FIZICĂ**

**MIRCEA TĂUȚAN**

**STUDIUL BIODISPONIBILITĂȚII ȘI AL IMPACTULUI UNOR  
SISTEME NANOSTRUCTURATE ÎN TERAPIA  
DERMATITELOR LA CÂINE**

**REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT**

**COORDONATORI ȘTIINȚIFICI:**

**Prof. Dr. SPÎNU MARINA**

**Prof. Dr. SIMON VIORICA**

**CLUJ-NAPOCA**

**2014**

**I**

## REZUMAT

La nivel global, incidența dermatitelor canine, în care este implicată o floră bacteriană polimorfă, dar în special stafilococi, este în continuă creștere.

Utilizarea substanțelor antibiotice face parte din protocolul terapeutic uzual cu care se intervine în tratamentul afecțiunilor induse de germenii din genul *Staphylococcus*, agentul principal determinant al dermatitelor la câine fiind *Staphylococcus intermedius*. În ceea ce privește germenii din genul *Staphylococcus*, fenomenul de antibioticorezistență a apărut pe fondul permisiv al elasticității genetice a acestor germeni, și a avut ca rezultat o serie de insuccese terapeutice.

Provocați de apariția fenomenului de antibioticorezistență și bazându-se pe efectul antibacterian al argintului, cercetătorii au încercat să găsească alternative pentru înlocuirea antibioticelor, investigând astfel posibilitățile de aplicarea în tratarea dermatitelor la câine a unei terapii alternative, bazate pe utilizarea unor compuși de sinteză nanostructurați (sisteme poroase bioactive). În paralel, s-a studiat biodisponibilitatea acestor sisteme nanostructurate și impactul lor *in vivo* la animalele bolnave de dermatită.

Pentru atingerea acestui scop, s-au stabilit următoarele obiective și activități:

1. Investigarea eficacității unor sisteme nanostructurate *in vitro* asupra efectorilor imuni pe probe provenite de la câini sănătoși diferiți prin rasă, vârstă și mediul de viață
2. Diagnosticarea complexă a cazurilor de dermatită canină prezentate spre consultație
3. Investigarea eficacității unor sisteme nanostructurate *in vitro* asupra tulpinilor bacteriene izolate de la câini cu dermatite de diferite etiologii și gravități
4. Investigarea eficacității unor sisteme nanostructurate *in vivo* asupra efectorilor imuni pe probe provenite de la câini cu dermatite de diferite tipuri, diferiți prin rasă, vârstă și mediul de viață

Rezultatele așteptate ale acestui studiu pot fi sintetizate astfel:

- Elaborarea unor produși farmaceutici care au la bază compuși nanostructurați și evaluarea *in vivo* a eficacității lor prin utilizarea în tratamentul unor episoade dermatologice la câini

- Caracterizarea biodisponibilității *in vitro* a unor compuși nanostructurați și a efectelor antibacteriene ale acestora la câini cu dermatite.
- Caracterizarea biodisponibilității *in vitro* a unor compuși nanostructurați față de celulele cu capacitate de blastizare provenite de la câini cu dermatite, pentru evaluarea efectului imunomodulator.

Rezultatele cercetării vor permite elaborarea unui/unor produse utile pentru terapie și pentru evitarea agravării antibioticorezistenței, cu potențial de biodisponibilitate și efecte imunostimulatoare crescute.

Lucrarea de față este structurată în două părți, prima parte fiind intitulată „Studiu bibliografic” și conținând 4 capitole, în timp ce partea a doua include cercetările proprii extinse pe parcursul a 7 capitole.

Studiul de față însumează o serie de 114 figuri foto și 43 tabele.

Prima parte, „Studiu bibliografic”, cuprinde 4 capitole și redă stadiul actual al cunoașterii în domeniu.

În primul capitol sunt descriși compușii nanostructurați, metodele de obținere și domeniile lor de utilizare.

Cel de-al doilea capitol include aspecte legate de anatomia pielii, de etiologia dermatitelor bacteriene precum și de germenii implicați în etiologia dermatitelor bacteriene la câine.

Noțiunile bibliografice referitoare la dermatitele bacteriene canine, inclusiv clasificare, diagnostic și conduita terapeutică sunt descrise în capitolul 3.

În cel de-al patrulea capitol sunt descrise aspecte legate de răspunsul imun la câine, mai exact despre organe imunocompetente, efectorii imuni și despre imunodeficiențele întâlnite la această specie.

Partea a doua este destinată „Cercetărilor proprii” și cuprinde șapte capitole. În această parte sunt prezentate obiectivele tezei, materialele și metodele de lucru folosite în vederea caracterizării microflorei bacteriene la animale cu diferite tipuri de dermatite, comparativ cu cele sănătoase, evaluarea profilului imunologic nespecific și specific la aceste animale, evaluarea influenței antibacteriene a unor compuși nanostructurați conținând argint, cupru și zinc precum și a efectului imunostimulator/ modulator al

acestora, urmând ca pe baza modificărilor observate să se elaboreze produse care să poată fi utilizate cu succes în terapia dermatitelor la câine. Prezentarea părții experimentale este urmată de enunțarea unor concluzii generale (capitolul 10), recomandări (capitolul 11) și a literaturii citate. În studiul de față au fost citate 324 titluri bibliografice.

În capitolul cinci este prezentată caracterizarea compuşilor nanostructurați folosiți în acest studiu. Compușii au fost grupați în 3 loturi.

Unul dintre loturi (lotul 1) este constituit din 9 compuși care conțin argint în diferite concentrații. Compușii au fost notați astfel: PA (0,01% Ag), PB (0,05% Ag), PC (0,10% Ag) și PE (0,20% Ag), și PAA (0,01% Ag), PAB (0,05% Ag), PAC (0,10% Ag), PAD (0,15% Ag) și PAE (0,20% Ag). Compușii au fost obținuți prin două metode: Sol-Gel (PAA-PAE) și Sol-Gel FreezeDry (PA-PE).

Lotul 2 de compuși este format din 10 compuși care conțin cupru, zinc și argint în diferite concentrații. Compușii au fost notați astfel: C1 (2% Cu), C2 (2% Cu), C3 (5% Zn), C4 (20% Zn), C5 (5% Zn), C6 (2% Ag), C7 (2% Ag), C8 (10% Ag), C9 (10% Ag) și C10 (10% Ag). Compușii au fost obținuți prin două metode: Sol-Gel (C2, C6, C8 și C10) și Sol-Gel FreezeDry (C1, C3, C4 și C5), iar compușii C7 și C9 au fost obținuți prin metoda Sol-Gel, dar în plus față de compușii de proveniență (C6 și respectiv C8) au fost funcționalizați cu glutaraldehidă. Două perechi de compuși C3-C5 și C8-C10 au același mod de preparare și aceeași compoziție, dar condițiile lor de păstrare au fost diferite, astfel compușii C3 și C8 a fost păstrați în suspensie cu apă distilată pe tot parcursul studiului, iar suspensia care conține compușii C5 și respectiv C10 a fost preparată de fiecare dată.

Al treilea lot este format din compuși încărcăți cu antibiotice: BG (BioGlass – compusul simplu cu compoziția 60%SiO<sub>2</sub> 30%CaO 10%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), BG-AMP (BioGlass + ampicilină), BG-CIP (BioGlass + ciprofloxacina), BG-STR (BioGlass + streptomycină) și BG-TCL (BioGlass + tetracilină).

Compușii din loturile 2 (C1-C10) și 3 (BG, BG-AMP, BG-CIP, BG-STR și BG-TCL) au fost caracterizați prin următoarele metode: spectroscopia fotoelectronică de raze

X (XPS), microscopia electronică de baleiaj (SEM) și determinarea suprafeței specifice prin tehnica BET.

În capitolul șase sunt descrise investigațiile efectuate în scopul evaluării *in vitro* a eficacității compușilor nanostructurați asupra efectorilor imuni proveniți de la câini sănătoși. Astfel au fost prelevate probe biologice (sânge și tampon cutanat) de la un lot de câini sănătoși, lotul martor (n=11). Lotul a fost heterogen din punctul de vedere al rasei, greutatei, sexului și vârstei.

Pentru lotul martor s-a stabilit profilul imunologic prin determinarea numărului total de leucocite (metoda Bürker-Türk), a leucogramei, a activității fagocitare în prezența sistemelor nanostructurate *in vitro* (testul de incluzie a particulelor de carbon), precum și a activității limfo-monocitare în prezența de compuși nanostructurați (testul de blastizare).

Media numărului total de leucocite a fost 11.218 leucocite/ $\mu$ l sânge, cu o deviație standard de 1.959, valorile normale situându-se între 5.000 - 14.100 (Latimer și colab., 2003), iar leucograma a avut valorile neutrofile 66,2%, monocite 3,7%, bazofile 0,3%, limfocite 29,0% și eozinofile 0,8%, valorile normale fiind situate între valorile normale sunt: neutrofile 65-70 %, eozinofile 2-5 %, bazofile <1 %, limfocite 20-25%, monocite 5% (Ognean și Cernea, 2006). În urma rezultatelor obținute s-a stabilit că numărul total de leucocite și leucograma se încadrează în limitele normale indicate de literatură.

Valorile normale ale numărului total de leucocite și ale leucogramei obținute pentru lotul martor, demonstrează că lotul ales se încadrează ca sănătos și sub aspectul protecției celulare înnăscute și adaptative.

În urma rezultatelor obținute la testul de fagocitoză, în cazul compusului ce conține Ag în proporție de 0,01% obținut prin metoda Sol-Gel și liofilizare (PA) s-a observat că acesta este superior ca eficacitate în susținerea fagocitozei, comparativ cu compusul cu concentrație egală de argint dar preparat prin metoda Sol-Gel, fără liofilizare (PAA) ( $p > 0,05$ ). Se pare că metoda de obținere a compușilor și nu doar compoziția acestora influențează biodisponibilitatea și efectele asupra fagocitozei.

Activitatea fagocitară este în creștere, deci este favorizată de prezența compusului C6 (2% Ag) și este inhibată de prezența compusului C8 (10% Ag) ( $p > 0,05$ ). Acest fapt

este particular, dat fiind că în produsul C8 (10% Ag) concentrația argintului este mai mare, cu toate că metoda de obținere este similară. Efectul constatat este unul similar celui homeopat, în care efectele mai intense sunt obținute prin aplicarea unor cantități mai mici de substanță activă.

Astfel se poate concluziona că activitatea fagocitară a leucocitelor în prezența compușilor nanostructurați este influențată și de metoda de obținere a compușilor care conțin argint și nu doar de compoziția acestora. Concentrația argintului din compus induce un efect similar celui homeopat, rezultate mai pronunțate fiind obținute prin utilizarea *in vitro* a unor cantități mai mici de substanță activă.

În urma testării activității limfo-monocitară prin testul de blastizare *in vitro* (în prezența de sisteme nanostructurate) s-a demonstrat că indicele de blastizare nu este influențat de metoda de obținere a compușilor PA-PE, respectiv PAA-PAE (Sol-Gel cu liofilizare sau Sol-Gel). Blastizarea este inhibată în prezența compușilor cu o concentrație mai mare de argint obținuți prin metoda Sol-Gel cu liofilizare PAD (0,15% Ag) și PAE (0,2% Ag) ( $p < 0,001$ , respectiv  $p < 0,01$ ), acest fapt datorându-se, probabil, conținutului scăzut al apei din compus și a concentrației mai mari a argintului.

În cazul compușilor cu argint (C1-C9) indicele de blastizare este mai mic decât al mitogenilor clasici, concentrația de argint a compusului nu-l influențează, dar acesta este mai mare la compușii funcționalizați cu glutaraldehidă, probabil din cauza acoperirii suprafeței active cu glutaraldehidă.

În urma testelor efectuate pentru evaluarea influenței compușilor ce conțin argint se poate afirma că inducerea efectelor biologice este influențată de concentrația ionului metalic de argint din structură și de funcționalizarea cu glutaraldehidă, și într-o măsură mai mică de metoda de preparare.

În cazul compușilor conținând cupru, care diferă prin metoda de preparare, respectiv Sol-Gel cu liofilizare (C1) și Sol-Gel (C2), rezultatele sugerează că este importantă metoda de obținere, deoarece indicii de blastizare în cazul preparatului Sol-Gel, sunt mai mari, probabil datorită procentului crescut de umiditate.

Rezultatele obținute pentru compușii cu Zn (C3-C5) arată că în cazul lor metoda de preparare sau păstrare și concentrația zincului nu influențează indicele de blastizare, acesta fiind asemănător cu cel al mitogenilor clasici.

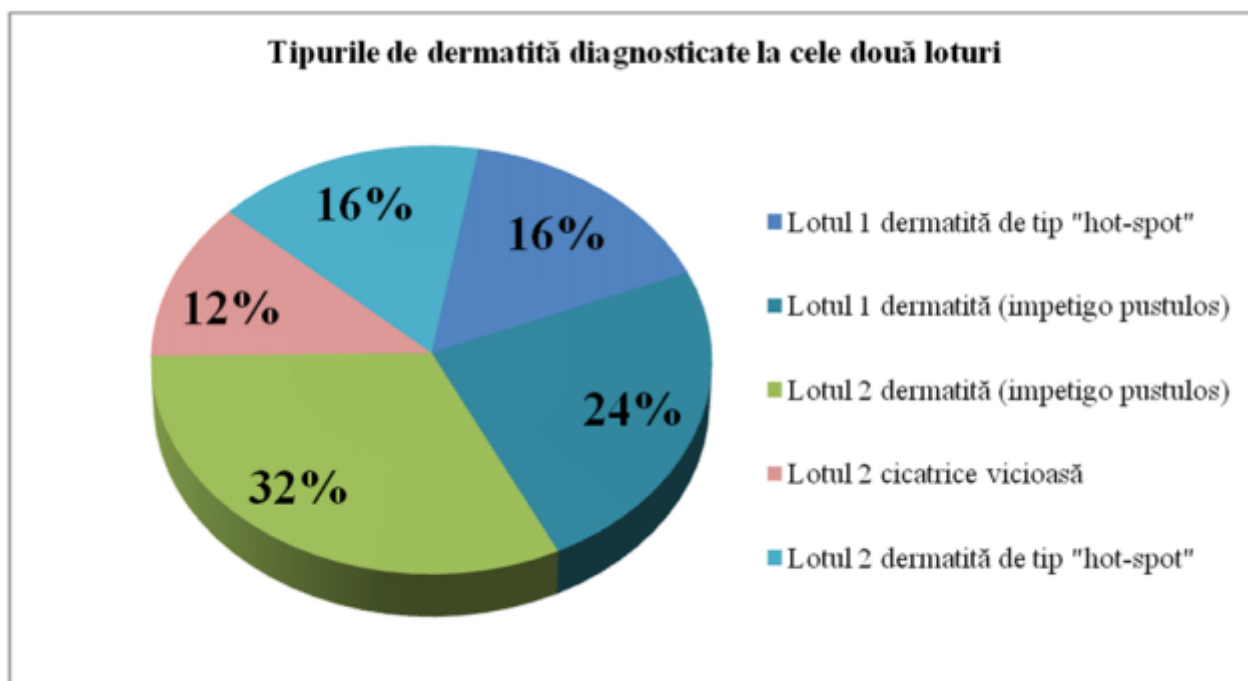
Testele efectuate pentru evaluarea influenței compușilor ce conțin cupru, care au fost obținuți prin metode diferite respectiv Sol-Gel cu liofilizare (C1) și Sol-Gel (C2), susțin importanța metodei de preparare în inducerea unor efecte biologice în culturi de sânge integral. În cazul compușilor care conțin ioni de zinc nici metoda de păstrare nici concentrația zincului nu influențează efectele biologice în culturi de sânge integral.

În al șaptelea capitol sunt descrise cele două loturi de câini cu dermatită, precum și metodele folosite pentru stabilirea diagnosticelor clinice și de laborator. Metodele folosite pentru caracterizarea imunologică sunt similare celor folosite la lotul de câini sănătoși, și anume: determinarea numărului total de leucocite (metoda Bürker-Türk), a leucogramei, a activității fagocitare în prezența sistemelor nanostructurate (testul de incluzie a particulelor de carbon), precum și a activității limfo-monocitare în prezența de compuși nanostructurați (testul de blastizare *in vitro*).

Deoarece au fost testate două seturi de compuși nanostructurați, au fost constituite două loturi de câini: lotul 1 (n=10) și lotul 2 (n=15). Astfel pentru lotul 1 s-au folosit o seria de compuși PA-PE (compuși cu argint în diferite proporții obținuți prin metoda Sol-Gel și liofilizare) și PAA-PAE (compuși cu argint în diferite proporții obținuți prin metoda Sol-Gel); iar pentru lotul 2 o seria de compuși C1-C10 (compuși cu cupru, zinc și argint în diferite proporții, condiții de păstrare și obținuți prin procedee diferite) (compușii au fost descriși în capitolul 5).

În urma examenului clinic efectuat s-a realizat o evaluare a leziunilor fiind întocmit un scor lezional pentru fiecare pacient, astfel s-au acordat 3 puncte pentru o leziune gravă care alterează și starea generală, 2 puncte pentru o leziune care nu alterează starea generală și 1 punct pentru o leziune minoră sau vindecată.

Din punct de vedere clinico-patologic pacienții din cele două loturi au fost încadrați în două categorii: dermatită de tip „hot spot” și impetigo pustulos, trei pacienți din lotul 2 au fost diagnosticați cu cicatrici vicioase.



**Figura 1. Diagrama tipurilor de dermatită ale loturilor 1 și 2**

**Figure 1. Types of diagnosed dermatitis in groups 1 and 2**

Pentru câinii diagnosticați cu dermatită profilul imunologic a fost caracterizat prin investigarea activității celulare înăscute, evaluarea reactivității umorale specifice și testarea activității blastogenetice.

Media numărului total de leucocite (metoda Bürker-Türk) a fost 16.230 leucocite/ $\mu$ l sânge pentru lotul 1 și respectiv 15.713 pentru lotul 2. Putem astfel afirma că media numărului de leucocite a câinilor din cele două loturi cu dermatite este mai mare decât media lotului martor, alcătuit din câini fără leziuni cutanate ( $p < 0,001$ ) dar media numărului de leucocite al câinilor din lotul 1 este mai mare decât media lotului 2 ( $p > 0,05$ ). S-a demonstrat astfel relativa omogenitate a parametrului studiat la animale cu dermatită, în consecință cele două loturi pot servi pentru evaluarea comparativă a efectelor unor compuși nanostructurați din categorii diferite.

Media procentuală a neutrofilelor lotului 1 este mai mare față de media procentuală a lotului martor ( $p < 0,05$ ), iar media procentuală a limfocitelor lotului 1 este mai mică față de media procentuală a lotului martor ( $p < 0,001$ ). Această creștere a neutrofilelor și scădere a limfocitelor ar putea fi corelată cu existența unui proces inflamator aflat în stadiul de debut.



Prezența leziunilor cutanate la câinii cu dermatită este reflectată la nivel hematologic prin creșterea numărului total de leucocite și modificarea leucogramei (creșterea neutrofilelor și scăderea limfocitelor) față de lotul martor fără leziuni.

În ceea ce privește activitatea fagocitară în cazul compusului PA (0,01% Ag - Sol-Gel și liofilizare) este superioară ca eficacitate în susținerea fagocitozei, comparativ cu cea a compusului PAA (0,01% Ag - Sol-Gel) cu concentrație egală de argint dar preparat prin altă metodă ( $p > 0,05$ ), astfel se poate afirma că biodisponibilitatea și efectele asupra fagocitozei sunt influențate de metoda de obținere a compușilor și nu doar compoziția acestora.

Activitatea fagocitară este în creștere, deci este favorizată de prezența compusului C6 (2% Ag), în schimb în prezența compusului C8 (10% Ag) activitatea fagocitară este inhibată ( $p > 0,05$ ). Acest fapt este particular, dat fiind că în compusul C8 (10% Ag) concentrația Ag este mai mare, cu toate că metoda de obținere este similară. Efectul constatat este unul similar celui homeopat, în care efectele mai intense sunt obținute prin aplicarea unor cantități mai mici de substanță activă.

Creșterea activității fagocitare, invers proporțional față de concentrația de argint inclusă în compusul nanostructurat, pledează fie pentru exercitarea efectelor printr-un mecanism homeopat fie pentru caracterul toxic al argintului în concentrație crescută prin stimularea probabilă a sintezei de specii active de oxigen.

Monitorizarea capacității blastogenetice la animalele cu dermatite din lotul 1 a arătat că indicele de blastizare nu este influențat de metoda de obținere a compușilor (Sol-Gel sau Sol-Gel cu liofilizare) ( $p > 0,05$ ), blastizarea fiind inhibată nu numai în prezența compușilor cu o concentrație mai mare de argint obținuți prin metoda Sol-Gel cu liofilizare PAC (0,1% Ag), PAD (0,15% Ag) și PAE (0,2% Ag), cât și în prezența compușilor PB (0,05% Ag), PE (0,2% Ag) acest fapt datorându-se concentrației mai mari a argintului ( $p < 0,01$ ).

Rezultatele obținute pentru compușii cu cupru (C1-C2), zinc (C3-C5) și argint (C6-C10) arată că metoda de preparare sau păstrare, concentrația ionului metalic sau funcționalizarea cu glutaraldehidă, în cazul compușilor cu argint, nu influențează indicele de blastizare, acesta fiind asemănător cu cel al mitogenilor clasici.

În urma testelor efectuate pentru evaluarea influenței compușilor ce conțin cupru, zinc și argint se poate afirma că inducerea efectelor biologice nu este influențată de metoda de preparare sau păstrare, de concentrația ionului metalic din structură, sau de funcționalizarea cu glutaraldehidă.

În capitolul 8 a fost investigată activitatea compușilor nanostructurați studiați asupra tulpinilor bacteriene izolate de la câinii sănătoși și de la câinii cu dermatite. În paralel a fost studiat și comportamentul tulpinilor izolate față de antibioticele clasice.

De pe pielea câinilor sănătoși au fost izolate 4 tulpini bacteriene, cu rol nesemnificativ patologic, de la lotul 1 (n=10) s-au izolat 11 tulpini, de la lotul 2 (n=15) s-au izolat 27 tulpini.

Flora bacteriană izolată de la câinii din lotul martor este constituită în majoritate de tulpini de tip *Staphylococcus spp.* (75%), fiind cel mai probabil reprezentanți ai speciei *Staphylococcus intermedius*. Cox și colab.(1988) izolează *S. intermedius* la 8 din 9 câini sănătoși (88,9%), recoltările făcându-se de mai multe ori pe parcursul unui an. La câinii din lotul 1 flora bacteriană de tip *Staphylococcus spp.* reprezintă 90,9% din totalul tulpinilor izolate. Tulpinile de tip *Staphylococcus spp.* au reprezentat 29,63% din totalul tulpinilor izolate de la câinii care au constituit lotul 2. Krogh și colab. (1981) afirmă că *Staphylococcus aureus* există în 98% din zonele corporale afectate, la 40 de câini cu piodermite, streptococii beta-hemolitici în 30% și organismele Gram-negative (în special *Proteus spp.* la 30%). Infecțiile pure cu *Staphylococcus aureus* a reprezentat 55% din cazuri.

Pentru determinarea sensibilității/rezistenței bacteriene s-a efectuat testul difuziei radiare pentru tulpinile izolate de la lotul martor (n=4), de la lotul 1(n=11) și tulpinile izolate de la lotul 2 (n=27).

Pentru tulpinile de *Staphylococcus spp.* izolate de la câinii din lotul sănătos cele mai eficiente antibiotice au fost enrofloxacina și cefadroxilul, iar cel mai puțin eficient antibiotic a fost neomicina. Pentru tulpinile de *Staphylococcus spp.* izolate de la câinii din lotul 1 cele mai eficiente antibiotice au fost enrofloxacina și gentamicina, iar cel mai puțin eficient antibiotic a fost cefadroxilul. Cel mai eficient antibiotic pentru tulpinile de

*Staphylococcus spp.* izolate de la câinii din lotul 2 a fost enrofloxacina, iar cel mai puțin eficient antibiotic a fost oxitetraciclina.

Shumaker și colab. (2009) izolează tulpini bacteriene la 30 din 31 de cazuri cu dermatită de tip „hot-spot”, iar *Staphylococcus intermedius* a fost izolat în 58% din aceste culturi. 20% din tulpini au fost specii de *Staphylococcus* rezistente la meticilină. 48% din tulpini au fost rezistente mai multe antibiotice. Numai 57% și 55% din tulpinile bacteriene izolate au fost sensibile la acid clavulanic amoxicilină și, respectiv cefazolin.

Pentru tulpinile de *E. coli* izolate de la câinii din lotul 2 cel mai eficient antibiotic au fost cefalexina, iar cele mai puțin eficiente antibiotice au fost neomicina și amoxicilina cu acid clavulanic. Cel mai puțin eficient antibiotic pentru tulpinile de *Enterococcus spp.* a fost oxitetraciclina, iar cel mai eficient antibiotic a fost enrofloxacina. Boothe și colab. (2012) realizează un studiu pe tulpini patogene *Escherichia coli* (*E. coli*) izolate de câini (n = 301). Antibioticele testate au fost amoxicilina (AX), amoxicilina cu acid clavulanic (AMC), cefpodoxime (PCP), doxiciclina (DXY), enrofloxacina (ENR), gentamicina (GM) și trimetoprim-sulfametoxazol (TMS). Rezistența exprimată procentual a fost: AX ( $46 \pm 2,6\%$ ) > AMC ( $37 \pm 2,5\%$ ) > PCP ( $21,8 \pm 2\%$ ) = DXY ( $22 \pm 2,1\%$ ) = ENR ( $20 \pm 2,1\%$ ) = TMS ( $19 \pm 2\%$ ) > GM ( $12 \pm 1,7\%$ ).

Diametrul mediu global de inhibiție pentru tulpinile izolate de la lotul martor este de 18,13mm, mai mic decât diametrul mediu global al tulpinilor izolate de la lotul 1 este de 21,05mm( $p < 0,05$ ), dar și decât cel de la lotul 2 este de 19,5( $p > 0,05$ ).

Se poate observa că tulpinile izolate de la animale sănătoase, care sunt nepatogene, lipsind exprimarea clinică a oricăror leziuni cutanate, sunt mai sensibile la acțiunea antibioticelor decât tulpinile izolate de la lotul de animale cu dermatite. Un asemenea comportament al tulpinilor patogene sugerează rezistența crescută la antibiotice, citată în literatură.

În cazul apariției dermatitelor în care se dovedește a fi implicat genul *Staphylococcus spp.* antibioticul recomandat este enrofloxacina, iar în cazul izolării tulpinilor Gram negative (*E. coli* sau *Enterococcus spp.*) amoxicilina și/sau amoxicilina cu acid clavulanic, aceste antibiotice dovedindu-se a fi cele mai eficiente.

Datorită numeroaselor tulpini izolate care au prezentat rezistență totală, coloniile rezistente sau o zonă de inhibiție redusă la acțiunea antibioticelor oxitetraciclină, neomicină și a eritromicină, recomandăm precauție în administrarea acestora în tratamentul dermatitelor.

Utilizarea frecventă a unor antibiotice în terapia dermatitelor la câine a condus la apariția rezistenței la unele antibiotice cum ar fi oxitetraciclina, neomicina și a eritromicinei spre deosebire de câinii sănătoși la care acest fenomen a fost foarte rar evidențiat.

În vederea utilizării compușilor nanostructurați în testul difuziei radiare în agar, fiecare compus (C1-C10) a fost pus într-o suspensie de concentrație 1% cu apă distilată. Din aceste suspensii s-au creat suspensiile: 0,1%, 0,05%, 0,025% și 0,0125%, folosind apă distilată. Compușii au fost păstrați în tuburi în suspensie pe toată durata studiului, cu excepția compușilor C5 (5% Zn) și C10 (10% Ag) care au fost preparați de fiecare dată. Compușii încărcăți cu antibiotice (B-AM, B-CIP, B-Te, B-STR), au fost puși în contact cu apă distilată creându-se suspensii de concentrație 25%; compușii BG (bioglass) și C10 (10% AG) au fost și ei incluși în această categorie, ca și martori, suspensia lor având aceeași concentrație. În paralel s-au utilizat discuri cu antibioticele clasice: ampicilină (AM), ciprofloxacina (CIP), tetraciclină (Te-30) și streptomycină (S-10).

Compușii cu cupru (C1 și C2) produc o inhibiție a creșterii bacteriene ne semnificativă. Compușii cu zinc (C3, C4 și C5) produc o inhibiție bacteriană la majoritatea concentrațiilor testate, tendința fiind de creștere a inhibiției pe măsura creșterii concentrației compușilor în suspensie. Compușii cu argint (C6, C7, C8, C9 și C10) prezintă un comportament asemănător cu cel al compușilor cu zinc, pentru ambele loturi de tulpini bacteriene, astfel odată cu creșterea concentrației suspensiei crește și media zonei de inhibiție bacteriană. S-a observat astfel că tulpinile izolate de la animale sănătoase, care sunt nepatogene, lipsind exprimarea clinică a oricăror leziuni cutanate, sunt mai sensibile la acțiunea compușilor nanostructurați decât cele izolate de la lotul de animale cu dermatite. Un asemenea comportament al tulpinilor patogene sugerează rezistența crescută la ioni metalici, citată în literatură și care evoluează în paralel cu rezistența la antibiotice în cazul acestor tulpini.

Testul difuziei radiare efectuat pentru compușii încărcăți cu antibiotice au arătat că dintre antibioticele clasice utilizate cele mai eficiente antibiotice au fost ampicilina și ciprofloxacina; biosticla BG a avut un efect antibacterian nesemnificativ, o singură tulpină din lotul 2 (L2-R1-C12-T21 – *S. aureus*) a avut o zonă de inhibiție de 7mm. Compusul C10 (10% AG) nu a avut efect inhibitor asupra tulpinilor standard, iar media diametrelor de inhibiție asupra tulpinilor de *E. coli* și *Staphylococcus spp.* din lotul 2 a fost de 8,8mm și respectiv 9,2mm ( $p < 0,05$ ). Compusul B-AM a avut o zonă de inhibiție 0 pentru toate tulpinile, în schimb amoxicilina a avut cea mai mare zonă de inhibiție. Ar putea exista două explicații: fie prin procesul de adsorbție antibioticul a fost modificat la nivel structural, fie compusul (BG) învește moleculele de ampicilină în totalitate, prevenind astfel contactul antibioticului cu bacteriile și/sau eliberarea lui.

Din testele efectuate se observă că acțiunea inhibitorie a antibioticelor, a compușilor nanostructurați simpli, precum și a compușilor nanostructurați încărcăți cu antibiotice, este mai intensă asupra tulpinilor standard (Gram negative sau Gram pozitive) decât asupra majorității tulpinilor izolate de la câinii cu dermatite. De asemenea se poate afirma că antibioticele și compușii nanostructurați simpli exercită o acțiune inhibitorie asupra creșterii bacteriene mai intensă asupra tulpinilor izolate de la câinii sănătoși comparativ cu tulpinile izolate de la câinii diagnosticați cu dermatite.

Compușii nanostructurați care au în structură ioni de argint, cupru sau zinc exercită un efect antibacterian mai pronunțat asupra tulpinilor izolate de la câinii sănătoși decât asupra tulpinilor izolate de la câinii cu dermatite, respectând tendința care o au antibioticele clasice.

Compușii nanostructurați încărcăți cu antibiotice au demonstrat un efect antibacterian mai pronunțat asupra tulpinilor standard (*Staphylococcus aureus* și *E. coli*) decât asupra tulpinilor izolate de la câinii cu dermatite, demonstrând astfel rezistența crescută a tulpinilor sălbatice față de cele standardizate.

Majoritatea antibioticelor incluse în matricea nanostructurată își păstrează efectul antibacterian, mai mult acesta este potențat, păstrându-se raporturile dintre antibioticele clasice; excepția face ampicilina care, inclusă în compusul nanostructurat își pierde efectul antibacterian.

În capitolul 9 sunt descrise investigațiile efectuate pentru determinarea eficacității compuşilor nanostructurați asupra leziunilor la câinii cu dermatite, alături de repetarea în paralel a testelor bacteriologice și imunologice efectuate anterior.

În urma studiilor preliminare efectuate s-au ales doi compuși din cele două serii: compusul PAC (0,1% Ag) și compusul C8 (10% Ag). Din acești compuși s-au preparat două creme, folosite în studiul de față. Concentrația finală de argint (Ag) în cremă a fost de 0,01% pentru ambele preparate.

Protocolul terapeutic a fost asemănător pentru cele două loturi de câini: lotul 1 (n=10) și lotul 2 (n=15) și a constat în identificarea și diagnosticarea câinilor cu dermatite, recoltarea inițială de probe biologice (sânge și tampon cutanat), apoi aplicarea la nivelul leziunilor cutanate a cremei conținând compusul nanostructurat pe bază de argint zilnic, timp de 7 zile; în zilele 15 și 29 de la începutul tratamentului, pacientul a fost reevaluat, recoltându-se probe pentru examenul microbiologic și imunologic.

S-a efectuat o evaluare a leziunilor fiind întocmit un scor lezional pentru fiecare pacient, evaluările fiind făcute în zilele 1, 15 și 29.

Crema aplicată lotului 1 conținând compusul PAC (0,1% Ag) a produs o vindecare totală la 80% și o îmbunătățire a scorului lezional la 90% din cazurile tratate. Procentul de recidivă a fost de 60%. Crema conținând compusul C8 (10% Ag), aplicată câinilor din lotul 2, a produs o vindecare totală la 66,66% și o îmbunătățire a scorului lezional la 86,66% din cazurile tratate. Procentul de recidivă a fost de 60%.

Pentru cele două loturi de câini (în zilele 15 și 29) a fost cercetat nivelul funcțional al activității celulare înnăscute, folosind trei parametri ai acestuia: numărul total de leucocite, leucograma și indicele activității fagocitare.

Pentru ambele loturi valorile medii ale numărului de leucocite sunt mai mari la cele 3 recoltări față de lotul martor ( $p < 0,001$ ). Valoarea medie ale lotului 1 crește la recoltarea 1 față de recoltarea 2, apoi scade ( $p > 0,05$ ), același comportament îl are și valoarea medie a lotului 2, există o creștere a valorii medii de la prima la a doua recoltare ( $p < 0,05$ ), iar apoi o scădere a valorii medii de la a doua la a treia recoltare ( $p < 0,001$ ).

Se poate observa că sub influența tratamentului cu cremele conținând compușii nanostructurați, numărul total de leucocite la ambele loturi cu dermatite prezintă o

tendință de revenire la normal. În acest context, concentrația individuală a argintului în fiecare compus este probabil mai puțin importantă decât concentrația totală pe gram de cremă, care în final a fost aceeași pentru cele două creme.

Valoarea medie procentuală a neutrofilelor este mai mare la lotul 1 la prima recoltare față de valoarea medie procentuală a neutrofilelor lotului martor ( $p < 0,05$ ). Valoarea medie procentuală a monocitelor este mai mică la lotul 1 la prima recoltare față de valoarea medie procentuală a monocitelor lotului 1 la a doua recoltare ( $p < 0,01$ ), dar aceasta din urmă este mai mare decât valoarea medie procentuală a monocitelor la a treia recoltare ( $p < 0,01$ ). Valoarea medie procentuală a limfocitelor lotului martor este mai mare decât valorile medii procentuale ale limfocitelor lotului 1 la prima ( $p < 0,001$ ) și la a doua recoltare ( $p < 0,01$ ). Valoarea medie procentuală a limfocitelor este mai mică la lotul 1 la a doua recoltare față de valoarea medie procentuală a limfocitelor lotului 1 la a treia recoltare ( $p < 0,05$ ). Deși există diferențe între formula leucocitară a lotului martor și cele ale lotului 2 (la toate cele 3 recoltări) ele nu sunt semnificative din punct de vedere statistic.

Astfel, modificările înregistrate în cazul numărului total de leucocite și al leucogramei la câinii diagnosticați cu dermatită demonstrează existența unor procese inflamatorii care tind să dispară în timp, fiind corelate clinic cu vindecarea leziunilor cutanate.

S-a investigat evoluția microflorei cutanate la câinii cu dermatite. Așa cum s-a menționat anterior, de la câinii din lotul martor ( $n=11$ ) au fost izolate un număr de 4 tulpini bacteriene. Din lotul 1 ( $n=10$ ) la recoltarea întâi s-au izolat 11 tulpini, la recoltarea a doua 7 tulpini, iar la recoltarea a treia 6 tulpini. Din lotul 2 ( $n=15$ ) la recoltarea întâi s-au izolat 27 tulpini, la recoltarea a doua 28 tulpini, iar la recoltarea a treia 17 tulpini.

Pentru speciile de *Staphylococcus* izolate de la lotul 2 s-a efectuat tipizarea cu ajutorul testului APISTAPH, rezultatele obținute fiind: *Staphylococcus intermedius* reprezintă 66%, *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus xylosus* câte 13%, iar *Staphylococcus haemorrhagicus* și *Staphylococcus lentus* câte 4%. Din totalul tulpinilor izolate de la lotul 2, la toate cele 3 recoltări *Staphylococcus spp.* reprezintă 31,9%, iar *Staphylococcus intermedius* reprezintă 20,8%.

În cadrul cercetării descrise în subcapitolul 9.4.3 s-a stabilit rezistența/sensibilitatea bacteriene prin metoda difuzimetrică Kirby-Bauer pe agar Mueller-Hinton.

Pentru amoxicilină (AX) și enrofloxacină (ENF), media diametrelor de inhibiție scade pe parcursul celor trei recoltări, fapt ce s-ar putea datora unui fenomen de antibioretistență. Pentru amoxicilină și acid clavulanic (AMC), media diametrelor de inhibiție crește pe parcursul celor trei recoltări, fapt ce s-ar putea datora unui fenomen de sensibilizare, accentuat sub influența efectului cremelor conținând argint sub forma unor compuși nanostructurați. Pentru oxitetracilină (T30), cefadroxil (CFR), fluorfenicol (FFC), cloramfenicol (C), neomicină (N) și cefalexină (CN120) media diametrelor de inhibiție rămâne relativ constantă pe parcursul celor trei recoltări.

Deși, rezultatele obținute confirmă sensibilitatea la antibioticele utilizate în prezent în tratamentul dermatitelor, modelele de antibioretistență observate pentru tulpinile izolate subliniază importanța testării susceptibilității antimicrobiene pentru a putea alege tratamentul adecvat și pentru a permite utilizarea cu prudență a antibioticelor la animalele de companie.

Investigarea activității fagocitare a fost descrisă în subcapitolul 9.5.1. Atât la a 2-a cât și la a 3-a recoltare compusul PA (0,01% Ag - Sol-Gel și liofilizare) favorizează fagocitoza într-o măsură mai mare comparativ cu compusul PAA (0,01% Ag - Sol-Gel) cu concentrație egală de argint, dar preparat prin altă metodă, deci metoda de obținere a compuşilor și nu doar compoziția acestora influențează biodisponibilitatea și efectele asupra fagocitozei ( $p > 0,05$ ).

La a doua recoltare, pentru compușii utilizați la lotul 2, dat fiind faptul că în compusul C8 (10% Ag) concentrația de argint este mai mare decât în compusul C6(2%), iar metoda de obținere este aceeași pentru ambii compuși, este demonstrat faptul că efectele celor doi compuși sunt similare, de stimulare a activității fagocitare. Efectul constatat este unul similar celui homeopat, în care efectele mai intense sunt obținute prin aplicarea unor cantități mai mici de substanță activă ( $p > 0,05$ ). Iar la a treia recoltare s-a observat că deși în compusul C8 (10% Ag) concentrația de argint este mai mare decât în



compusul C6(2%), iar metoda de obținere este aceeași pentru ambii compuși, efectele celor doi compuși sunt similare, de inhibare a activității fagocitare( $p>0,05$ ).

Activitatea celulelor sanguine responsabile de fagocitoză este potențată de prezența compușilor care conțin argint în cantitate mai mică, și nu este influențată de metoda de preparare a compușilor.

Compușii cu argint determină efectele biologice asupra celulelor sanguine ce depind de metoda de preparare a compușilor doar la mijlocul perioadei luate în studiu, atunci când metoda de preparare Sol-Gel cu liofilizare produce un efect mai intens decât metoda Sol-Gel.

Monitorizarea capacității blastogenetice la animalele cu dermatite este descrisă în subcapitolul 9.5.2.

Astfel în urma rezultatelor obținute pentru lotul 1 recoltarea 2 putem afirma că indicele de blastizare este influențat de metoda de obținere a compușilor PA-PE și PAA-PAE, astfel compușii obținuți prin metoda Sol-Gel cu liofilizare au un indice de blastizare mai mare decât al compușilor obținuți prin metoda Sol-Gel. Blastizarea este inhibată în prezența compușilor cu o concentrație mai mare de argint obținuți prin metoda Sol-Gel cu liofilizare PAD (0,15% Ag) și PE (0,2% Ag), acest fapt datorându-se concentrației mai mari a argintului.

În urma rezultatelor obținute pentru lotul 1 recoltarea 3 putem afirma că indicele de blastizare este influențat de metoda de obținere a compușilor PA-PE și PAA-PAE, indicele de blastizare nu este influențat de metoda de obținere a compușilor (Sol-Gel sau Sol-Gel cu liofilizare). Blastizarea este inhibată în prezența compușilor cu o concentrație mai mare de argint obținuți prin metoda Sol-Gel cu liofilizare PC (0,1% Ag) și PE (0,2% Ag), acest fapt datorându-se, probabil, concentrației mai mari a argintului.

În urma rezultatelor obținute pentru lotul 2 recoltarea 2 putem afirma că în cazul compușilor conținând cupru, dar și în cazul compușii cu Zn (C3-C5) arată că metoda de preparare sau păstrare și concentrația ionilor metalici nu influențează indicele de blastizare, acesta fiind asemănător cu cel al mitogenilor clasici. În cazul compușilor cu argint indicele de blastizare este asemănător cu cel al mitogenilor clasici, concentrația de

argint a compusului nu-l influențează, excepție făcând compusul C8 (Ag 10%) care produce inhibiția cea mai mare.

Rezultatele obținute pentru lotul 2 recoltarea 3 ne permit să afirmăm că în cazul compușilor conținând cupru, cât și în cazul compușilor cu Zn (C3-C5) metoda de preparare sau păstrare și concentrația ionilor metalici nu influențează indicele de blastizare, acesta fiind asemănător cu cel al mitogenilor clasici. În cazul compușilor cu argint indicele de blastizare este mai mic decât al mitogenilor clasici, concentrația de argint a compusului nu-l influențează, dar acesta este mai mare la compușii funcționalizați cu glutaraldehidă, probabil din cauza acoperirii suprafeței active cu glutaraldehidă.

Efectele biologice determinate de ionii metalici care sunt înglobați în compușii nanostructurați diferă. Astfel, compușii care conțin argint induc efecte direct proporționale cu concentrația ionului metalic din structură, deci concentrația mai mare de argint produce un efect mai intens. Compușii care conțin zinc sau cupru produc efecte biologice care nu sunt influențate de concentrația ionului metalic din structură sau de metoda de preparare sau păstrare.

În subcapitolul 9.6 s-a urmărit evaluarea tulpinilor bacteriene reizolate în relație cu compușii nanostructurați.

Astfel, compușii nanostructurați simpli cu cupru (C1 și C2) și zinc (C3, C4 și C5) produc o inhibiție a creșterii bacteriene nesemnificativă din punct de vedere statistic ( $p > 0,05$ ). În schimb compușii cu argint (C6, C7, C8, C9 și C10) produc o inhibiție bacteriană la majoritatea concentrațiilor testate, tendința fiind de creștere a inhibiției pe măsura creșterii concentrație compușilor în suspensie.

Tulpinile izolate de la animale diagnosticate cu dermatite, sunt mai rezistente la acțiunea compușilor nanostructurați decât cele izolate de la lotul de animale sănătoase. Un asemenea comportament al tulpinilor patogene sugerează rezistența crescută la ionii metalici, citată în literatură și care evoluează în paralel cu rezistența la antibiotice în cazul acestor tulpini.

Testele efectuate pentru compușii nanostructurați încărcăți cu antibiotice au arătat că pentru toate tulpinile cele mai eficiente antibiotice au fost ampicilina și ciprofloxacina,

biosticla BG compusul C10 și compusul B-AM nu au avut un efect antibacterian, iar compușii încărcăți cu antibiotice cu cea mai mare medie a zonelor de inhibiție au fost biosticla cu ciprofloxacina (B-CIP) și biosticla cu streptomycină (B-STR).

Tulpinile standard testate, fie ele Gram negative (*E. coli*) sau Gram pozitive (*S. aureus*), sunt mai sensibile la acțiunea antibioticelor decât majoritatea tulpinilor izolate. Același comportament îl au tulpinile și în cazul compușilor nanostructurați simpli. Compușii nanostructurați încărcăți cu antibiotice au un efect antibacterian mai pronunțat la tulpinile izolate față de tulpinile standard, astfel putem afirma că au același comportament ca și antibioticele clasice sau compușii nanostructurați în raport cu tulpinile izolate de la câinii cu dermatite și câinii sănătoși.

Efectul antibacterian al compușilor cu argint, a antibioticelor clasice și a compușilor încărcăți cu antibiotice este mai pronunțat la tulpinile standard față de tulpinile sălbatice de *Staphylococcus spp.* sau *E. coli*. Compușii încărcăți cu antibiotice inhibă creșterea bacteriană într-o măsură mai mare decât antibioticele clasice.

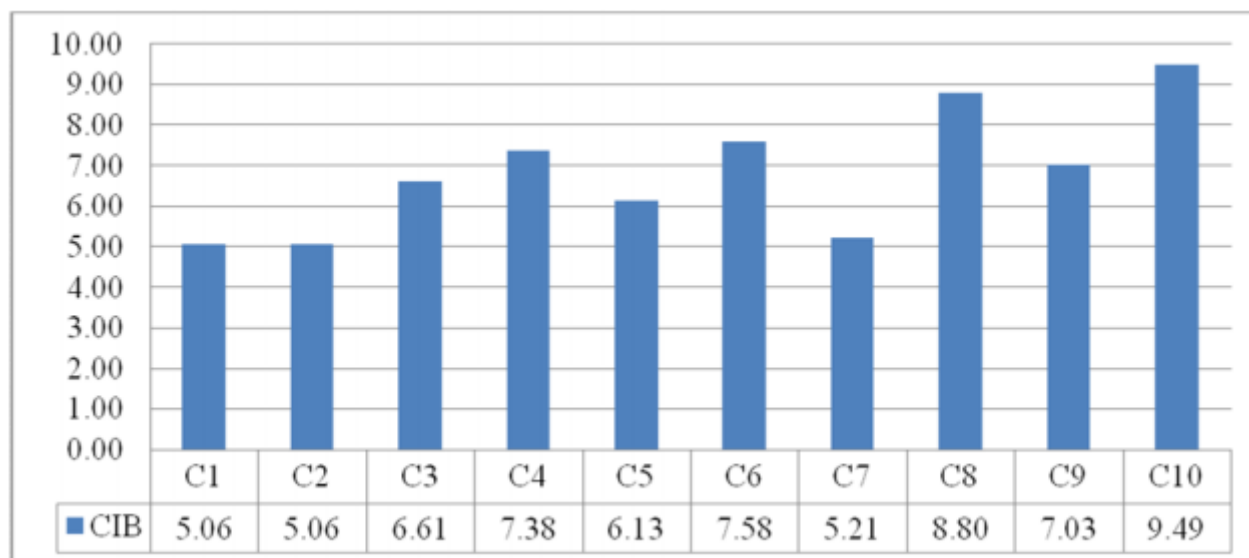
Efectul antibacterian al compușilor care conțin zinc și argint este dependent de concentrația compușilor în suspensie, astfel cu cât concentrația este mai mare cu atât inhibiția este mai mare, efectul fiind mai pronunțat în cazul compușilor cu argint.

În sub capitolul 9.7 este descrisă ierarhizarea compușilor utilizați. Astfel:

- **Din punct de vedere clinic** produsul PAC (0,1% Ag) a produs o vindecare mai bună decât produsul C8 (10% Ag) ( $p > 0,05$ ).
- **Din punct de vedere imunologic, al indicelui fagocitar:** compușii C6 (2% Ag) și C8 (10% Ag) au un indice fagocitar mai mare decât compușii PA (0,01% Ag) și PAA (0,01% Ag) ( $0,05 > p > 0,001$ ). Indicele fagocitar al compusului C8 (10% Ag) este mai mare decât al compusului C6 (2% Ag) ( $p > 0,05$ ). Indicele fagocitar al compusului PA (0,01% Ag) este mai mare decât al compusului PAA (0,01% Ag) ( $p > 0,05$ ).
- **Din punct de vedere imunologic, al indicelui de blastizare:** cele două subgrupe de compuși (PA-PE și PAA-PAE), obținuți prin metode diferite au un indice de blastizare diferit, astfel IS% al subgrupului PA-PE este mai mare decât IS % al subgrupului PAA-PAE ( $p < 0,01$ ). În cazul celui de al doilea lot de compuși IS% al

compușilor cu zinc care a fost mai mare decât IS% al compușilor cu argint. ( $p < 0,001$ ). Comparând statistic indicii de blastizare ai celor două loturi de compuși cu argint: IS% al compușilor din primul lot (PA-PE, PAA-PAE) este mai mic decât IS% al compușilor din al doilea lot (C6-C10) ( $p < 0,001$ ).

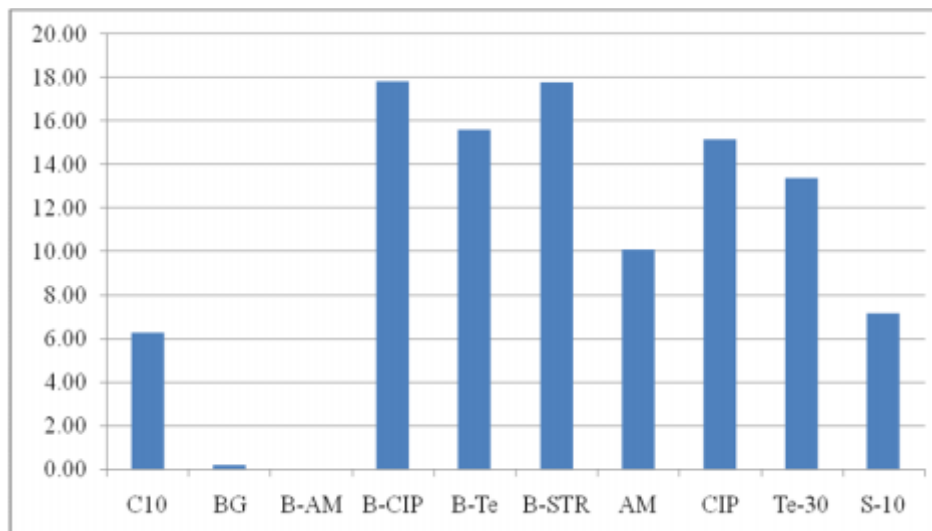
- **Din punct de vedere microbiologic** - compușii simpli care au cel mai mare coeficient de inhibiție bacteriană (CIB) sunt C8 și C10 (10% Ag), iar cei mai puțin eficienți au fost produșii ce conțin cupru 2% (C1 și C2) și compusul C7 care conține 2% argint și este funcționalizat cu glutaraldehidă.



**Figura 2. Coeficientul de inhibiție bacteriană (CIB) pentru compușii C1-C10( $x \pm s$ )**

**Figure 2. Bacterial inhibition coefficient (CIB) for compounds C1-C10( $x \pm s$ )**

- **Din punct de vedere microbiologic** - compușii încărcăți cu cel mai mare coeficient îl au compușii încărcăți cu ciprofloxacina și streptomycină (B-CIP și B-STR). Compusul B-AM are un coeficient 0. Compușii încărcăți cu antibiotice au o valoare a coeficientului mai mare decât a antibioticelor clasice ( $p < 0,01$ ).



**Figura 3. Coeficientul de inhibiție bacteriană (CIB) pentru compușii B-AM, B-Te, B-CIP și B-STR**

**Figure 3. Bacterial inhibition coefficient (CIB) for compounds B-AM, B-Te, B-CIP and B-STR**

În capitolul 10 sunt dezbătute rezultatele obținute în comparație cu cele existente în literatura de specialitate.

Capitolul 11 este destinat concluziilor și recomandărilor.

Concluziile acestui studiu ne permit să susținem că:

1. Existența unor procese inflamatorii care tind să dispară în timp, sunt reflectate de modificările înregistrate în cazul numărului total de leucocite și al leucogramei la câinii diagnosticați cu dermatită, aspecte care sunt corelate clinic cu vindecarea leziunilor cutanate.

2. Activitatea fagocitară a celulelor sanguine de câine este influențată mai mult de concentrația ionului metalic decât de metoda de obținere a compușilor cu argint.

3. Efectele biologice asupra tulpinilor bacteriene izolate și asupra liniilor celulare sanguine de câine sunt influențate de concentrația ionului metalic din structura compușilor cu argint, și în mai mică măsură a celor cu cupru sau zinc.

4. Datorită eficacității crescute a enrofloxacinii, în cazul tulpinilor Gram pozitive de *Staphylococcus spp.*, și a amoxicilină și/sau amoxicilină cu acid clavulanic, în cazul

tulpinilor Gram negative izolate (*E. coli* și *Enterobacteriaceae spp.*) aceste antibiotice ar putea fi utilizate în tratamentul topic al dermatitelor la câine.

5. Flora microbiană izolată de la câinii diagnosticați cu dermatite, investigată sub raportul antibioticorezistenței, se dovedește refractară la acțiunea a numeroase antibiotice explicându-se astfel lipsa de eficacitate a terapiilor clasice.

6. Acest tip de rezistență este observat și în prezența compușilor nanostructurați simpli, obținuți prin metoda Sol-Gel sau Sol-gel cu liofilizare, sau cei dopați cu antibiotice clasice, dovedindu-se astfel că nu metoda de preparare sau păstrare ci mai degrabă cantitatea și calitatea ionilor incluși în structura compușilor nanostructurați sunt activi antibacterian.

Recomandările au fost sintetizate astfel:

1. Folosirea compușilor nanostructurați care conțin argint în tratamentul dermatitelor la câine poate fi considerată o alternativă viabilă și mai puțin costisitoare decât folosirea antibioticelor clasice.

2. Ca și în cazul antibioticelor, pentru a determina tipul și concentrația ionului metalic pentru care efectele biologice sunt maxime, se impune testarea preliminară *in vitro*.

3. Compușii nanostructurați încărcăți cu antibiotice au demonstrat o eficacitate mai mare *in vitro* decât antibioticele clasice, fapt ce le recomandă pentru a fi folosite și *in vivo*.

4. Efectele inhibitorii asupra sistemului imun al câinilor diagnosticați cu dermatite al produselor nanostructurate este nesemnificativ în comparație cu efectele antibacteriene, aspect care recomandă folosirea cremelor care conțin compuși nanostructurați în tratamentul dermatitelor la câine.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. **Boothe D., Smaha T., Carpenter D.M., Shaheen B., Hatchcock T.,** 2012, Antimicrobial resistance and pharmacodynamics of canine and feline pathogenic *E. coli* in the United States. *J Am Anim Hosp Assoc.*, 48(6), 379-389.
2. **Cox H.U., Hoskins J.D., Newman S.S., Foil C.S., Turnwald G.H., Roy A.F.,** 1988, Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. Department of Veterinary Microbiology, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge 70803. 747-751.
3. **Krogh HV, Kristensen S.,** 1981, A study of skin diseases in dogs and cats. VI. Microflora of the major canine pyodermas. *Nord Vet Med.* 33(1). 17-22.
4. **Latimer K.S., Mahaffey E.A., and Prasse K.W.,** 2003, Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology, 4th ed., Wiley-Blackwell
5. **Ognean L., Cernea C.,** 2006, Aplicații practice de fiziologie medical-veterinară, ed. AcademicPres, Cluj-Napoca, 95-102
6. **Shumaker A.K., Angus J.C., Coyner K.S., Loeffler D.G., Rankin S.C., Lewis T.P.,** 2008, Microbiological and histopathological features of canine acral lick dermatitis. *Vet Dermatol.*,19(5), 288-298.