

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ A BANATULUI
“REGELE MIHAI I AL ROMÂNIEI”

TIMIȘOARA

FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ

Drd. VILI – ROBERT VOICHIȚOIU

TEZĂ DE DOCTORAT

**CARACTERIZAREA UNOR TULPINI DE
STAFILOCOCI IZOLATE DE LA CÂINI DIN SUD-
VESTUL ROMÂNIEI**

Conducător științific:

Prof.Univ.Dr.VIOREL HERMAN

Timișoara

2017

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ A BANATULUI
“REGELE MIHAI I AL ROMÂNIEI”**

TIMIȘOARA

FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ



Drd. VILI – ROBERT VOICHIȚOIU

TEZĂ DE DOCTORAT

**CARACTERIZAREA UNOR TULPINI DE
STAFILOCOCI IZOLATE DE LA CÂINI DIN SUD-
VESTUL ROMÂNIEI**

**Conducător științific:
Prof.Univ.Dr.VIOREL HERMAN**

**Timișoara
2017**

**BANAT'S UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY
MEDICINE "KING MICHAEL I OF ROMANIA" FROM TIMISOARA**

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



PhD. VILI – ROBERT VOICHIȚOIU

DOCTORAL THESIS

**CHARACTERIZATION OF SEVERAL
STAPHYLOCOCCUS STRAINS ISOLATED FROM
DOGS IN SOUTH-WESTERN ROMANIA**

Scientific coordinator:

Prof.Univ.Dr.VIOREL HERMAN

**Timișoara
2017**

Rezumat

Teza de doctorat cu titlul ”**Caracterizarea unor tulpini de stafilococi izolate de la câini din sud-vestul României**” a avut ca scop major caracterizarea tulpinilor de stafilococi izolate din afecțiuni cutaneo mucoase și de a analiza profilul de sensibilitate antimicrobiană la tulpinile de stafilococi izolate de la câini.

Teza de doctorat are în total 130 de pagini, 14 tabele și 52 de figuri, și conform normativelor în vigoare, ea este structurată în 2 părți principale, prima parte fiind studiul bibliografic care cuprinde 43 de pagini și partea a doua constituită din cercetări proprii, care se întinde pe 88 pagini.

Studiul bibliografic este alcătuit din 3 capitole în care au fost expuse succint informații ce se regăsesc în literatura de specialitate cu referire la subiectul ales pentru teza de doctorat.

Bacteriile genului *Staphylococcus* sunt germeni ce au o formă rotundă, sunt gram-pozitivi dispuși în grămezi neregulate cu aspect de ciorchine (*staphylos*), cu dimensiuni cuprinse între 0,5 și 1,5 μm, care au tropism marcat pentru țesutul dermic și anexele pielii. Acești germeni microbieni cu o largă răspândire în mediul extern, sunt imobili și nesporulați. Majoritatea speciilor sunt catalazo-pozitive și facultativ anaerobe, dar cresc mai bine aerob, excepții fiind *S.sacharolyticus* și *S.aureus subsp.anaerobius*, care preferă anaerobioza.

În urma studiilor moleculare s-a putut introduce sintagma -Grupul *S. intermedius*- ce cuprinde cel puțin 3 specii strâns înrudite: *S. intermedius*, *S. delphini* și *S. pseudintermedius*.

Identificarea fenotipică, respectiv pe baza caracterelor biochimice, nu permite discriminarea lui *S. intermedius* de *S. pseudintermedius*, specii bacteriene distincte, recunoscute în prezent de sistematica bacteriană, motiv pentru care a fost preferată denumirea *S. intermedius/S. pseudintermedius*.

Luate împreună, aceste observații indică faptul că tulpinile stafilococice cu caracteristici fenotipice tradiționale pentru *S. intermedius* ar trebui identificate ca și *S. pseudintermedius* atunci când sunt obținute de la câini. Tulpinile bacteriene izolate de la alte specii cu aceleși caracteristici fenotipice ar trebui catalogate drept bacterii din Grupul *S. intermedius*, în cazul în care nu se realizează teste moleculare.

Tema propusă are o importanță deosebită, dovadă fiind nivelul însemnat de informații din literatura de specialitate. Interesul pentru studierea infecțiilor stafilococice și pentru studierea tulpinilor de

stafilococi a crescut în ultima vreme, fapt ce a condus la descrierea de tehnici moderne de diagnostic și de izolare a agentului infecțios.

Partea a doua a tezei intitulată ”**Cercetări personale**” cuprinde ”**Scopul lucrării**” (capitolul 4), urmat de 4 capitole de cercetări proprii, la care se adaugă concluziile generale.

În capitolul 5 al tezei, intitulat ”**Cercetări epidemiologice în afecțiunile produse de stafilococi la câini**” sunt prezentate rezultatele cercetărilor epidemiologice în afecțiunile produse de stafilococi la câini.

Studiul privind incidența afecțiunilor produse de stafilococi la câine s-a realizat în perioada octombrie 2012 - martie 2016. În această perioadă au fost examinați, 1264 câini, din mai multe localități situate în două județe (Mehedinți și Timiș) din sud-vestul României. Au fost prelevate probe de la câini din gospodăriile populației, din cele două județe, de la animalele existente într-un adăpost de câini comunitari de lângă orașul Timișoara, dar și de la câinii prezentați la consultație în Clinica de Boli infecțioase, din cadrul FMV Timișoara.

Pacienții canini au fost examinați clinic în vederea diagnosticării leziunilor caracteristice infecțiilor cu stafilococi, datele obținute fiind centralizate și redată în teză sub formă de tabele și grafice.

Probele necesare examenelor de laborator, au fost prelevate de la câinii ce au prezentat afecțiuni cutaneo mucoase regrupate în patru entități, obținându-se un număr de 578 de probe pozitive pentru infecția cu stafilococi.

Diagnosticul de **otită externă** a fost stabilit pe baza anamnezei și prin utilizarea următoarelor mijloace:

- modificarea conductului auditiv extern, evidențiată cu ajutorul otoscopului;
- examinarea directă a secreției otice;
- realizarea de frotiuri din exsudatul otic, frotiurile au fost colorate prin metoda Gram și examinate la microscopul optic.

Diagnosticul de **piodermită superficială** s-a bazat pe semnele clinice cum ar fi pierderile de păr, descuamarea, eritemul, prezența de papule, pustule și coleretele epidermice. Identificarea leziunilor dermatologice, au permis suspiciunea de diagnostic de piodermită superficială. Frotiurile directe din pustulele intacte, zone care stau la baza crustelor sau coleretele epidermice, sau din diverse zone eritematoase umede au dezvăluit prezența de coci sau infiltrate de celule inflamatorii. Pentru a putea fi excluse unele infestații parazitare, în special cea cu *Demodex* a fost realizată și o raclare mai profundă a pielii pentru a obține frotiuri din straturile mai profunde ale pielii.

În urma investigațiilor efectuate la 1264 de câini din județul Timiș și din județul Mehedinți au fost identificați 578 de câini, care au prezentat afecțiuni cutaneo mucoase produse de stafilococi, ceea ce denotă o prevalență a infecțiilor stafilococice de 45,72% la câinii luați în studiu.

Distribuția infecțiilor stafilococice după localizare a fost după cum urmează:

- 271 de câini cu piodermită, reprezentând 46,89%;
- 189 de câini cu otită externă, respectiv 32,70%;
- 107 infecții ale tractului reproducător, ceea ce reprezintă 18,51%;
- 11 câini cu adenită perianală, însumând 1,90%.

După ce am reușit să cuantificăm leziunile produse de stafilococi, am putut observa că mediul de viață al câinilor a influențat frecvența acestor infecții stafilococice, în sensul că la câinii cu acces în afara spațiului gospodăriei, prevalența celor 4 tipuri de afecțiuni detaliate în prezentul studiu, a avut constant valori mai mari de 50%, indiferent de localizarea afecțiunilor sau de județul de proveniență al animalului.

Prevalența cea mai mare între entitățile stafilococice întâlnite la câini a fost înregistrată în cazul piodermitei și anume 46,88% (271 de cazuri din totalul de 578 câini cu infecție stafilococică). Distribuția pe județe a cazurilor de piodermită a fost de 181 de cazuri (52,46%) pentru județul Mehedinți, și de 90 cazuri (38,62%) în județul Timiș

În capitolul 6 intitulat ”**Cercetări privind caracterele fenotipice ale stafilococilor izolați de la câini**”, au fost utilizate mai multe examene de laborator, pentru a putea pune în evidență caracterele fenotipice ale stafilococilor izolați de la animale.

Probele pentru analize au fost prelevate cu ajutorul tampoanelor de vată sterile fixate pe o tijă din plastic termorezistent sau din lemn, tampoanele fiind umectate în prealabil recoltării cu soluție de ser fiziologic sterilă.

După recoltare, probele au fost introduse în eprubete sterile în cazul în care a existat posibilitatea prelucrării imediate. Dacă acest lucru nu a fost posibil, exsudatul prelevat din diversele locuri cu afecțiuni a fost introdus într-un mediu de transport. Pentru a satisface aceste cerințe au fost utilizate tuburi speciale de transport microorganisme, care conțin medii speciale de transport (Stuart și Amies), puse la dispoziție de laboratorul de analize medicale Bioclinica din Timișoara.

Efectuarea examenelor bacteriologice și prelucrarea probelor a fost realizată într-un interval de trei ore de la momentul prelevării sau în unele cazuri după ce probele au fost conservate la frigider timp de 24-48 de ore în mediile speciale de transport. Examenele microbiologice au fost efectuate în laboratorul Disciplinei de Boli infecțioase și Medicină Preventivă, din cadrul FMV Timisoara.

Însămânțările primare au fost efectuate pe agar cu sânge defibrinat de berbec 5% și de vițel 5%, aceste medii fiind propice pentru izolarea mai multor specii de bacterii, chiar și a celor mai pretențioase la cultivare. Cu ajutorul acestor medii de cultură, stafilococii se pot izola ușor, creșterea lor nefiind inhibată de alte bacterii și, spre deosebire de mediile lichide (bulion nutritiv), pe acest mediu pot fi apreciate unele caractere culturale (pigmentogeneza), dar și unele caractere de patogenitate (hemoliza).

Culturile primare au fost examinate cu lupa stereoscopică pentru identificarea morfologiei coloniilor și pentru aprecierea zonei de hemoliză.

Din coloniile considerate caracteristice au fost efectuate frotiuri care au fost colorate Gram și, prin examenul microscopic cu obiectivul de imersie, au fost puși în evidență coci Gram pozitivi, sferici, egali ca mărime și grupați în grămezi neregulate.

Următorul pas a fost reprezentat de realizarea unor subculturi tot pe agarul cu sânge defibrinat de berbec. După izolarea în cultură pură, au fost apreciate caracterele culturale. Tulpinile de *S.pseudintermedius* au format colonii de 1-3 mm, de tip S, cremoase, bombate, lucioase și nepigmentate, cu tentă albicioasă. Coloniile de *S.aureus* au fost asemănătoare ca formă și mărime, dar au fost de culoare galben-aurie.

Producerea hemolizei a fost observată la 37°C și la 4°C (condiții de frigider). Am recurs la acest mijloc de observare având în vedere că hemolizinele beta produc hemoliză completă la temperaturi joase.

Activitatea hemolitică manifestată de tulpinile stafilococice izolate de noi pe agar nutritiv cu 5% sânge defibrinat de berbec, a condus la obținerea următoarelor rezultate: din totalul celor de 57 tulpini, 36 au produs hemoliză de tip β, cunoscută ca și hemoliză de tip „cald-rece” ce prezenta zone de hemoliză incompletă la temperatura de 37°C, zone care după ce au fost expuse timp de câteva ore la 4°C au devenit complete, asemănătoare cu cele produse de hemoliza α. Hemoliza de tip α a fost întâlnită la 19 tulpini. Au fost obținute și 2 tulpini ce nu au prezentat proprietăți hemolitice.

Au fost testate 57 de probe bacteriene izolate din secreții patologice, recoltate de la câini cu afecțiuni cutaneo mucoase și, supuse investigațiilor cu ajutorul mediilor cromogene, au fost identificate 11 probe ce au prezentat colonii de *S. aureus* în combinații alte bacterii.

Pentru a observa proprietățile biochimice ale tulpinilor de stafilococi, 20 de tulpini ce au fost testate cu ajutorul testului API STAPH și s-a putut observa că 18 au fermentat: glucoza, D-fructoza, D-manoza, D-maloza, D-lactoza, D-manitolul, D-xyloza, D-sacharoza, metil-αD-glucopiranoza prin acidifiere, și nu au fermentat: xylitolul, D-melibioza, D-rafinoza, N-acetil-glucozamina, având ca tulpină de referință *S. aureus* ATCC 25932. Au redus nitrații în nitriți. Profilele biochimice rezultate au fost validate cu ajutorul software-ului de identificare API WEB. Am luat în considerare doar profilele cu ponderea cea mai mare.

Testarea rezistenței la mediul hiperclorurat a fost realizată prin însămânțări pe mediul Chapman, unde au fost selectate 60 de tulpini de stafilococi la care s-a urmărit comportamentul față de manită, obținând o diferențiere rapidă a tulpinilor manită-pozitive, față de cele manită-negative. Astfel, prin multiplicarea germenilor s-au dezvoltat colonii manitol pozitive ce au determinat colorația galbenă, a mediului de cultură. Rezultatele obținute arată că 19 tulpini au fermentat manita, virând culoarea în galben, atât în condiții de anaerobioză cât și de aerobioză, ceea ce este caracteristic lui *S. aureus*. Restul

de 41 de tulpini, au fermentat tardiv manita, aproximativ după 48-72 de ore, ceea ce ne-a condus să le încadrăm ca și *S.pseudintermedius*.

Coagulaza legată a fost evidențiată cu ajutorul testului de latex-aglutinare, reușind să diferențiem stafilococii patogeni (coagulază pozitivi) de stafilococii nepatogeni (coagulază negativi). Cu ajutorul acestui kit au fost testate 50 de tulpini. Pentru kitul utilizat, aglutinările au apărut în primele 20 de secunde de la realizarea amestecului, iar un număr de 37 de tulpini au dat reacție pozitivă, ceea ce semnifică faptul că 74% din stafilococii izolați au fost coagulază pozitivi.

În capitolul 7, intitulat ”**Antibiorezistența tulpinilor de stafilococi izolate de la câini**”, am studiat sensibilitatea tulpinilor selectate la un număr de 18 substanțe antimicrobiene uzuale.

Comportamentul față de antimicrobiene a fost testat după metoda disc-difuzimetrică (metoda Kirby-Bauer), folosind în acest scop mediul Muller-Hinton și biodiscuri cu antibiotice furnizate de firmele producătoare. Au fost efectuate antibiograme pentru 236 de tulpini izolate de la câinii luați în studiu, fiind folosite 18 substanțe antimicrobiene aparținând mai multor clase.

Tulpinile bacteriene, au fost în prealabil efectuării testului sensibilității la antimicrobiene, însămânțate în bulion, pentru obținerea unor culturi tinere (18-20 ore) necesare efectuării acestui test.

Din rezultatele obținute, se observă că față de antibioticele mai rar folosite (cefactor, gentamicină), sau introduse recent, în terapia animalelor de companie, majoritatea tulpinilor izolate s-au dovedit a fi foarte sensibile.

În cazul antibioticelor: novobiocină, rifampicină, pristinamicină și lincomicină, considerate de mulți practicieni antibiotice de elecție pentru stafilococi, numărul tulpinilor sensibile a fost cuprins între 225 (novobiocină) și 137 (lincomicină), iar numărul tulpinilor rezistente a fost între 3 (pristinamicină) și 58 (lincomicină).

Față de β -lactaminele testate (metilicină, ceftioxonă, cefoxitin, cefactor, ampicilină cu sulbactan și amoxicilină cu acid clavulanic), antibiosensibilitatea a fost maximă la cefactor, urmată de o descreștere a numărului de tulpini sensibile față de celelate componente ale clasei mai sus amintite: cefoxitin, metilicină, amoxicilină cu acid clavulanic.

Cea mai mare rezistență a fost întâlnită în cazul amoxicilinei cu acid clavulanic. Față de celelalte β -lactamine, tulpinile testate au prezentat rezistență variabilă, și anume 99 tulpini au fost rezistente la metilicină, 27 tulpini la ceftioxonă, la cefoxitin 16 tulpini și 37 de tulpini la ampicilină.

Nici o tulpină nu a fost rezistentă la cefactor.

Fenomenul de antibiorezistență, în cazul β -lactaminelor, are la bază determinanți genetici de tip plasmidic și cromozomal care guvernează sinteza β -lactamazelor, cu spectru larg, care asigură astfel rezistența stafilococilor. Rezistența față de metilicină este transmisă prin plasmide (factor R), având și un patern comun față de alte β -lactamine. Din acest motiv tulpinile de stafilococi metilicin-rezistente sunt

considerate tulpini de stafilococi cu risc zoonotic ridicat, având un circuit complex, respectiv om-animal-om.

Față de aminoglicozide (gentamicină, kanamicină) și de macrolide (eritromicina și vancomicina), sensibilitatea înregistrată de noi a fost diferită, fiind maximă față de gentamicină, obținând în acest sens 231 de tulpini, urmată îndeaproape de vancomicină cu 201 tulpini, kanamicină cu 191 tulpini și eritromicină cu 103 tulpini. Cea mai mică rezistență a fost înregistrată în cazul gentamicinei unde au fost 3 tulpini stafilococice rezistente iar cea mai mare rezistență a fost înregistrată în cazul kanamicinei unde au fost notate 45 de tulpini rezistente.

Față de polimixina B au fost înregistrate 231 de tulpini rezistente, din cele 236 de tulpini testate. Pentru nici un alt antibiotic luat în studiu nu au fost înregistrate așa multe tulpini rezistente. Considerăm că acest rezultat este datorat utilizării frecvente a preparatelor aplicate local care conțin acest antibiotic.

Sensibilitatea față de tetraciclone (tetraciclina, doxicilină) a fost redusă, 51 tulpini (21,6%), iar 71 tulpini au fost rezistente față de acest grup de antibiotice, grup la care, pentru stafilococi, fenomenul de rezistență este de tip plasmidic și cromozomal .

Față de ciprofloxacina am înregistrat cea mai mare sensibilitate, astfel că 232 de tulpini au fost sensibile din totalul celor investigate, fapt explicabil prin aceea că această quinolonă testată de noi nu a fost des utilizată la câini, deoarece ciprofloxacina este destinată pentru uzul uman.

Dezvoltarea rezistenței stafilococilor, față de diferite antibiotice, este consecința utilizării uneori abuzive sau a subdozării acestora în terapia unor afecțiuni la câini. Utilizate nerațional antibioticele creează o presiune de selecție, fiind selectați și transmiși determinanții genetici de tip plasmidic și cromozomal. În consecință, apare fenomenul de rezistență care se transmite intra și interspecific. Prezintă importanță deosebită rezistența la meticilină deoarece poate fi asociată cu rezistența față de β -lactamine și alte grupe de antibiotice .

În capitolul 8, intitulat ”**Caracterizarea unor tulpini de stafilococi cu ajutorul metodelor de biologie moleculară**” au fost analizate 19 tulpini de stafilococi, selectate aleator, izolate de la câini, identificate în prealabil ca fiind stafilococi prin intermediul caracterelor culturale (producerea de hemoliză, fermentarea manitei, forma coloniilor, examenul microscopic). Tulpinile luate în studiu au fost prelevate de pe diferite zone corporale ale câinilor.

Rezultatele obținute prin PCR clasic cu ajutorul kitului PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, au demonstrat că toate cele 19 tulpini luate în studiu au fost tulpini de stafilococi, fapt dovedit cu ajutorul primerilor folosiți.

Utilizarea primerului 16S-1: 5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3', pentru gena SA-F, primer care evidențiază puritatea și apartenența la gen a ADN-ului a avut rezultate pozitive pentru toate tulpinile de stafilococ investigate, amplificarea realizându-se la 886 pb.

Tot pentru a demonstra apartenența la gen, pentru gena SA-R a fost utilizat primerul 16S-2: 5'-AGACCCGGGAACGTATTCAC-3', primer cu ajutorul căruia au fost obținute rezultate pozitive atât pentru cele trei tulpini de stafilococ de origine umană cât și pentru toate cele 16 tulpini de stafilococ izolate de la câini, toate benzile amplificând la 920 pb.

Cu ajutorul tehnicii de biologie moleculară, în urma utilizării a doi primerii: nuc-1: 5'-TCAGCAAATGCATCACAAACAG-3' și nuc-2: 5'-CGTAAATGCACTTGCTTCAGG-3', dintre cele 19 tulpini de stafilococ luate în studiu, doar trei tulpini de *S. aureus*, au fost pozitive. Ambii primeri utilizați pun în evidență prezența genei *nucA* responsabilă de apartenența la *S.aureus*. Nici una din restul de 16 tulpini de stafilococ, izolate de la câinii luați în studiu, nu a fost încadrată ca și *S.aureus*, fapt care ne-a permis, prin metoda excluderii, identificarea certă a acestor tulpini de origine canină ca fiind *S. intermedius/S.pseudintermedius*.

Pentru demonstrarea, cu ajutorul tehnicii de biologie moleculară, a prezenței la cele 19 tulpine de stafilococ luate în studiu a genei *mecA* (genă responsabilă de rezistența la meticilină), au fost utilizați alți doi primerii: pentru *mecA-1* 5'-GGGATCATAGCGTCATTATTC-3' și pentru *mecA-2* 5'-AACGATTGTGACACGATAGCC-3'. Dintre cele 19 tulpini de stafilococ luate în studiu, au fost identificate 4 tulpini MRSA pozitive: două tulpini *S.aureus* și două tulpini *S. intermedius/S.pseudintermedius*.

Prevalență genotipică a meticilin rezistenței (21,05%) a fost la un nivel mai ridicat, comparativ cu date recente obținute în Europa (până în 10%), menționate în literatura de specialitate, fapt de care iubitorii de câini ar trebui să țină cont atunci când decid să devină proprietarul unui câine.

Teza se încheie cu capitolul 9 intitulat ”**Concluzii generale**”, în număr de 29, dintre care am vrea să subliniem că infecțiile stafilococice întâlnite la câinii luați în studiu, din parte de sud-vest a României, au fost produse cu o largă majoritate (90%) de *Staphylococcus intermedius/Staphylococcus pseudintermedius* inclus în flora rezidentă a câinilor. Alte specii de stafilococi pot fi implicate în producerea de infecții localizate la câini. Atât *S. intermedius* cât și alți stafilococi pot să aibă importanță sanitară, datorită coabitării strânse între om și câinii de companie.

Bibliografia cuprinde un număr de 220 titluri bibliografice cu lucrări științifice reprezentative și de actualitate.

Summary

The PhD thesis entitled „**Characterization of several Staphylococcus strains isolated from dogs in South-Western Romania**” had the main aim of identifying the species of *Staphylococcus* pathogenic to dogs and of discovering their sensibility towards common antibiotics used in veterinary medicine.

The present doctoral thesis has a total of 130 pages, 14 tables and 52 figures and according to the present directives, it consists of 2 main parts. The first part represents the bibliographical study and it comprises 43 pages. The second part represents the personal research and it extends on 88 pages.

The present status of knowledge consists of 3 chapters in which information referring to the chosen subject, found in specialty literature, is briefly presented.

The bacteria of the *Staphylococcus* genus are round-shaped, Gram-positive germs, arranged in irregularly shaped piles, resembling grapes. Their size is from 0.5 to 1.5 µm. The germs have a marked tropism for the dermal tissue and for the skin annexes. These microbial germs are widely spread in the external environment, immobile and non-spore forming. Most of the species are catalase-positive and facultative anaerobic but they have a better growth in aerobic conditions. The exceptions from this are *S.sacharolyticus* and *S.aureussubsp.anaerobius*, which prefer anaerobiosis.

Following several molecular studies, the notion of *S. intermedius* group was introduced which contains at least three tightly related species: *S. intermedius*, *S. delphini* and *S. pseudointermedius*.

The phenotypical identification, respectively the one based on biochemical properties, does not allow the discrimination between *S.intermedius* and *S.pseudointermedius* that are distinct species, presently admitted by the bacterial systematic. This is the reason why the name of *S.intermedius*/*S.pseudointermedius* was preferred.

All these facts indicate that the *Staphylococcus* strains with phenotypical characteristics commonly seen in *S.intermedius* should be considered identical to those of *S. pseudointermedius* when they are isolated from dogs. The bacterial strains isolated from other species with the same phenotypical characteristics should be considered bacteria belonging to the *S.intermedius* group if no molecular test are run.

The theme we propose has an utmost importance and as proof stand the high level of information in specialty literature. The interest for studying staphylococcus infections and for studying the staphylococcus strains rose lately. This fact has led to the description of modern diagnosis and isolation techniques of the infectious agent.

The second part of the thesis entitled “**Personal Research**” contains the „**Purpose of the study**” (chapter 4) followed by four chapters of personal research to whom are added the general conclusions.

In chapter 5 entitled „**Epidemiological research in the staphylococcal diseases in dogs**” of the thesis, we present the results of epidemiologic research in infections produced by staphylococcus in dogs.

The study regarding the incidence of the afflictions produced by staphylococcus in dogs has been conducted during the period October 2012-March 2016. During this period, we examined 1264 dogs from several locations situated in two counties in South Western Romania. Samples were collected from dogs belonging to households as well as dogs from shelters near the city of Timisoara and from dogs that were presented at the Clinic for Infectious Diseases at FVM, Timisoara.

The canine patients were clinically examined in order to establish the diagnosis of characteristic lesions found in infections produced by staphylococcus. The data thus obtained were centralized and presented in the thesis as tables and graphics.

The necessary samples for laboratory exams were collected from dogs that displayed mucocutaneous afflictions, regrouped into four entities. Thus, we obtained a figure of 578 positive samples for staphylococcus infection.

The diagnosis of external otitis has been established based on the case history and using the following techniques:

- modification of the external auditory canal, observed using an otoscope.
- direct exam of ear secretion
- smears made from ear exudate, coloured through the Gram method and examined at the optic microscope;

The superficial pyoderma diagnosis was based on clinical signs such as hair loss, desquamation, erythema, the presence of papules, pustules and epidermal collarettes. The identification of dermatological lesions has led to the suspicion of superficial pyoderma. Direct smears from the intact pustules, areas that are the base of crusts or epidermal collarettes, or from other moist and erythematous areas have revealed the presence of cocci or inflammatory cells infiltrates. In order to exclude some parasitic infestations, especially the one with Demodex, we proceeded with deep skin scrapes in order to obtain smears from the more profound skin layers.

Following the investigations done on 1264 dogs from Timis and Mehedinti Counties we have identified 578 dogs with mucocutaneous afflictions produced by staphylococcus-fact which denotes a high rate of staphylococcus infections- 45.72%, for the dogs taken into study.

The distribution of staphylococcus infections, according to their location, is as follows:

- 271 dogs with pyodermatitis, representing 46.89%
- 189 dogs with otitis externa, respectively 32.70%
- 107 infections of the reproductive tract, representing 18.51%
- 11 dogs with perianal adenitis, totalizing 1.90%

After we managed to quantify the lesions produced by staphylococcus, we noticed that the dogs' habitat had an influence on the frequency of the staphylococcus. Specifically this meant that in dogs with access outside the household, the prevalence of the 4 types of afflictions presented in detail in this study constantly had a rate higher than 50%. Regardless of the location of afflictions or of the county of origin.

The highest prevalence among the staphylococcus entities seen in dogs was registered in the case of pyoderma, respectively 46.88% (271 of the total 578 cases with staphylococcus infections).

The distribution on counties of the pyoderma cases was 181 cases (52.46%) in Mehedinti County and 90 cases (38.62%) in Timis County.

In Chapter 6, entitled „**Research regarding the phenotypical characters of staphylococcus isolated from dogs**” we used various laboratory exams to enhance the phenotypical characters of staphylococci isolated from animals.

The samples that were analysed were collected using sterile cotton swabs, fixed on plastic, thermo-resistant or wooden rods. The swabs were moistened prior to collection with sterile physiological serum.

After collection, the samples were introduced in sterile tubes if the possibility of immediate examination was in hand. If this was not possible, the exudate collected from spots with afflictions was introduced in transport media. To meet all these conditions we used special tubes for microorganism transport which contain special transport media (Stuart and Amies), offered by the medical analysis laboratory Bioclinica in Timisoara.

The bacteriological exams and the processing of the samples was conducted in a three-hours' time from the moment of collection or, in other cases, after the samples were preserved in a refrigerator for 24-48 hours in special transport media. The microbiological exams were conducted in the laboratory for Infectious Diseases and Preventive Medicine at FVM in Timisoara.

The primary inoculations were made on agar with defibrinated sheep blood 5% and calf blood 5%. These media are considered suitable for the isolation of several bacterial species even the most pretentious ones. With the help of these culture media, the staphylococci can be easily isolated and other bacteria do not inhibit their growth. In comparison to liquid media (nutritive broth), this one enhances their cultural characteristics (pigment genesis) and some pathogeny characters (haemolysis).

The primary cultures were examined using a stereoscopic magnifier for the identification of colonies and for the appreciation of the haemolysis area.

From the colonies considered characteristic, we proceeded to make smears that we coloured using the Gram method. Following the microscopic exam with the immersion objective, we managed to highlight the Gram positive, spherical cocci, equal in size and grouped in irregular piles.

The next step was to obtain subcultures, also on agar with defibrinated sheep blood. After the isolation in pure culture we evaluated the cultural characters. The *S.pseudintermedius* strains formed 1-3 mm S-type, creamy, curved, shiny and non-pigmented colonies, with a touch of white colour. The *S.aureus* colonies resembled them in shape and size but their colour was golden-yellow.

The production of haemolysis was noticed at 37°C and 4°C (refrigerator conditions). We resorted to this means of observation having in view that the beta haemolysins produce complete haemolysis at low temperatures.

The haemolytic activity manifested by the staphylococcus strains that we managed to isolate on nutritive agar with 5% defibrinated sheep blood has led to obtaining the following data: from a total of 57 strains, 36 produced β type haemolysis, also known as warm-cold haemolysis. It presented only areas of haemolysis at 37°C, areas that after a few hours' exposure at 4°C became complete and similar to α type haemolysis. A type haemolysis was noticed in 19 strains. We also obtained 2 strains which did not present haemolytic properties.

57 bacterial samples isolated from pathological secretions were tested. These were collected from dogs with muco-cutaneous afflictions and were subjected to investigation using chromogenic media. We identified 11 samples that presented *S.aureus* colonies in combination with other bacteria.

In order to notice the biochemical properties of the staphylococci strains, 20 strains were tested using the API STAPH test and we observed that 18 fermented glucose, D-fructose, D-mannose, D-mallose, D-lactose, D-mannitol, D-xylose, D-sacharose, methyl-D-glucopiranos through acidifying and didn't ferment xylitol, D-melibiose, D-rafinose, N-acetyl-glucosamine having the *S.aureus* ATCC 25932 as reference strain. They also reduced nitrates to nitrites. The biochemical profiles thus resulted were validated with the help of the API WEB identification software. We took into account only the profiles with the highest rate. The resistance testing to the high-salt media was done by inoculation on Chapman media. For this, we selected 60 staphylococcus strains and we watched their behaviour towards manite, obtaining a quick differentiation of manite-positive strains and manite-negative ones. Thus, through germ multiplication. The mannitol-positive colonies developed producing a yellow coloration of the growth media. The obtained results show that 19 strains fermented manite changing the colour into yellow both in anaerobic and aerobic conditions-a characteristic of *S.aureus*. The other 41 strains fermented manite later, after approximately 48-72 hours fact that determined us to classify them as *S.pseudintermedius* colonies.

The linked coagulase was highlighted with the help of the latex-agglutination test that helped us differentiate the pathogenic cocci (coagulase-positive) from the non-pathogenic cocci (coagulase-negative). With the help of this kit, we tested 50 strains. For the used kit, the agglutination appeared in the first 20 seconds after mixing and a number of 37 strains gave a positive reaction-fact that signifies that 74% of the isolated staphylococci were coagulase-positive.

In chapter 7, entitled „**Antibioresistance of staphylococcus strain isolated from dogs**” we studied the sensibility of selected strain to a number of 18 usual antimicrobial substances.

The behaviour towards antimicrobials was tested according to the diffuse metric-disc method (Kirby-Bauer method), using the Muller-Hinton media for this purpose and bio-discs with antibiotics supplied by producers. Antibiograms for 236 strains isolated from dogs taken into study were made using 18 antimicrobial substances belonging to various classes.

The bacterial strains were inoculated in broth prior to the antimicrobial sensitivity testing in order to obtain young cultures (18-20 hours), necessary for this test. From the obtained results, it is noticed that compared to lesser-used antibiotics (cefactor, gentamycin) or to the ones recently introduced in animal therapy, most of the isolated strains proved extremely sensitive.

In the case of novobiocin, ryfampicin, pristinamycin and lincomycin considered drugs of choice for staphylococci by most practitioners, the number of sensitive strains was comprised between 225 (novobiocin) and 137 (lincomycin) while the number of resistant strains was from 3 (pristinamycin) to 58 (lincomycin).

Compared to the tested β -lactam antibiotics (methicillin, ceftriaxone, ceftioxin, cefaclor, ampicillin and sulbactam and amoxicillin with clavulanic acid), the antibiosensitivity was maximum for cefaclor followed by a decrease in the number of sensitive strains towards the other components of the above-mentioned class: ceftioxin, methicillin, amoxicillin and clavulanic acid.

The highest resistance was encountered in the case of amoxicillin and clavulanic acid. Towards the other β -lactamines, the tested strains presented a variable resistance specifically 99 strains were resistant to methicillin, 27 strains were resistant to ceftioxin, 16 strains were resistant to ceftioxin and 37 strains were resistant to ampicillin.

No strain was resistant to cefaclor.

The bioresistance phenomenon in the case of β -lactamins has genetic determinants of plasmid and chromosome type at its origin. They governate the synthesis of β -lactamases, of a large spectrum, ensuring thus the resistance of staphylococci. The resistance towards methicillin is transmitted through plasmids (R factor), having a common pattern towards other β -lactamins. Due to this reason, the methicillin-resistant staphylococcus strains are considered strains with a high zoonotic risk having a complex circuit respectively-man-animal-man.

Compared to aminoglycosides (gentamycin, kanamycin) and to macrolides (erythromycin and vancomycin), the sensitivity registered by us was different. It proved maximal towards gentamycin-231 strains, closely followed by vancomycin 201 strains, kanamycin 191 strains and erythromycin 103 strains. The lowest resistance was recorded in the case of gentamycin where we found three resistant strains and the highest resistance was in the case of kanamycin-45 resistant strains.

Towards polymyxinB we recorded a number of 231 resistant strains out of 236 tested. For no other antibiotic taken into study did we record such a high number of resistant strains. We consider this result to be owed to the frequent use of locally applied products that contain this antibiotic.

The sensitivity towards tetracyclines (tetracycline, doxycycline) was lower: 51 strains (21.6%) were resistant towards this group of antibiotics, group towards which staphylococci present a plasmid and chromosome type of resistance.

Towards ciprofloxacin we recorded, the highest sensitivity- 232 strains were sensitive from the total of strains, a fact that might be explained through the fact that the quinolone that we tested has not been massively used in dogs because it is of human use.

The development of resistance in staphylococci towards different antibiotics is the consequence of a sometimes-abusive use or overdosing in the therapy of these afflictions. An irrational use of antibiotics creates a selection pressure. They are selected and transmitted as genetic determiners of plasmid or chromosome type. Consequently, the phenomenon of resistance appears and it is transmitted intra-and interspecies. The resistance towards methicillin is of great importance because it can be associated to the resistance towards β -lactamins and other groups of antibiotics.

Chapter 8, entitled “**Characterisation of staphylococcus strains using molecular biology methods**” comprises the analysis of 19 staphylococcus strains, randomly selected, isolated from dogs and previously identified as staphylococci based on their cultural aspect (haemolysis, manite fermentation, colony formation, microscopic exam). The strains taken into study were collected from various body areas of dogs.

The results obtained using classic PCR with the help of the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit have demonstrated that all 19 strains taken into study were staphylococcus strains-fact proved by the primers we used.

By using the 16S-1: 5'-GTGCCAGCAGCCGCGTAA-3' primer for the SA-F gene-a primer which highlights the purity and belonging to the genus of the DNA-we obtained positive results for all three strains of human staphylococcus and for all the 16 strains of staphylococcus isolated from dogs. All the lines amplified at 920 pb.

With the help of molecular biology techniques, following the use of two primers: nuc-1: 5'-TCAGCAAATGCATCACAAACAG-3' and nuc-2: 5'-CGTAAATGCACTTGCTTCAGG-3', of all 19 strains of staphylococci taken into study, only three strains of *S.aureus* were positive. Both primers enhance the presence of the *nuc* gene that proves the belonging to *S.aureus*. None of the other 16 strains of staphylococcus isolated from dogs taken into study was not considered *S.aureus*. This fact allowed us, to identify these canine strains through exclusion as *S.intermedius/pseudintermedius*.

To demonstrate the presence of the *mecA* gene (gene responsible for methicillin resistance) in the 19 strains of staphylococci taken into study using molecular biology techniques we used two other primers: 5'-GGGATCATAGCGTCATTATTC-3' for *mecA*-1 and 5'-AACGATTGTGACACGATAGCC-3' for *mecA*-2. Four strains out of 19 were identified as MRSA positive: two *S.aureus* strains and two *S.intermedius/pseudintermedius* strains.

The genotypical prevalence of methicillin resistance (21.05%) was at a higher level compared to recent data obtained in Europe (up to 10%) and mentioned in specialty literature. This is a fact which dog owners should take into consideration when they decide to have a dog.

The thesis ends with chapter 9- "**General conclusions**"- counting 29 out of which we would like to mention that the staphylococcus infections seen in the dogs from South-Western Romania were mostly due to *S.intermedius/S.pseudintermedius* included in the resident flora of dogs. Other species of staphylococci may be implicated in the production of localised infections in dogs. Both *S. intermedius* and other staphylococci may have a sanitary importance due to the tight cohabitation between men and pet dogs.

The bibliography contains over 220 titles of representative and up-to-date scientific papers.