

REZUMAT

Râia sarcoptică este o boală parazitară a pielii, cauzată de acarianul *Sarcoptes scabiei*. Această boală afectează multe specii de animale, inclusiv omul. Deși este cunoscută încă din Antichitate, râia sarcoptică ridică încă o serie de semne de întrebare legate de unele aspecte precum fiziopatologia, diagnosticul, tratamentul bolii. În plus, apariția cazurilor rezistente la unele molecule utilizate în mod tradițional pentru tratarea acestei parazitoze, a dus la necesitatea găsirii unor alte substanțe pentru tratament. Un alt aspect care necesită studierea mai detaliată, este modul în care acarienii *S. scabiei* afectează și modifică rolul de barieră al pielii.

Scopul tezei de doctorat intitulată “**Caracterizarea microbiomului cutanat și evaluarea unor noi opțiuni terapeutice în râia sarcoptică la câine**” este de a aduce noi informații privind evaluare semnelor clinice în râia sarcoptică la câine, precum și de a cerceta un tratament mai nou pentru tratarea acestei boli, dar și de a prezenta unele modificări ce apar la nivelul microbiomului cutanat la câinii infectați cu *S. scabiei*.

Obiectivele tezei sunt :

- de a descrie semnele clinice, precum și unele noțiuni de epidemiologie pentru câinii infectați cu *S. scabiei*
- de a evalua eficacitatea unei noi molecule din clasa isoxazolinelor, afoxolaner, în tratamentul râiei sarcoptice la câine
- de a descrie modificările apărute la nivelul microbiomului cutanat bacterian și fungic, la câinii afectați de această boală.

Originalitatea acestei teze de doctorat constă în:

- adaptarea unui nou scor clinic (inspirat din evaluarea porcilor infectați cu *S. scabiei*, dar modificat conform semnelor clinice care apar la câine) pentru a evalua gradul de afectare al animalului
- utilizarea unei molecule noi (afoxolaner), puțin studiate pentru tratamentul râiei sarcoptice la câine.
- studierea atât a microbiomului bacterian, cât și a celui fungic la câinii afectați de râie sarcoptică. În plus, am realizat și o comparație a microbiomului cutanat înainte de tratament și după primul tratament cu afoxolaner, fapt ce reprezintă, după cunoștințele noastre actuale, o premieră în acest domeniu.

Teza de doctorat este structurată în conformitate cu normele în vigoare, clasic, în două părți- prima parte descrie stadiul actual al cunoașterii asupra râiei sarcoptice și este structurată în 4 capitole; cea de-a doua parte prezintă contribuțiile proprii în acest domeniu și conține 5 capitole. În afară de aceste două părți, teza mai cuprinde și introducere, mulțumiri, rezumat, listă de abrevieri, listă de figuri, cuprins, bibliografie și anexe. Lucrarea prezintă conține 52 de figuri și 6 tabele, fiind consultate și 182 de surse bibliografice

Prima parte, care descrie stadiul actual al cunoașterii în literatura de specialitate, conține 4 capitole cu subcapitolele corespondente. Primul capitol prezintă cunoștințe generale asupra acarianului *S. scabiei*, inclusiv prima menționare istorică, clasificarea sa în regnul animal, morfologia stadiilor prin care

trece, ciclul de viață de la ou la adult, capacitatea de supraviețuire și modul în care este transmis. În continuare, sunt tratate subiecte care stârnesc unele controverse, precum variabilitatea morfologică, specificitatea de specie, dar și variabilitatea genetică a acestor acarieni.

Cel de-al doilea capitol se concentrează pe descrierea râiei sarcoptice la câini și menționează: semnele clinice și leziunile care apar, fiziopatologia acestei boli de piele, care încă ridică semne de întrebare, precum și transmiterea la alte animale și la om.

Cel de-al treilea capitol este specific controlului infecțiilor cu *S. scabiei* incluzând o descriere generală a acaricidelor utilizate în medicina umană și veterinară, precum și caracteristicile lor principale, urmată de subcapitole mai specifice, care prezintă moleculele utilizate pentru tratamentul râiei la câini, alte animale și la oameni. Ultima parte a capitolului, dezvoltă problema rezistenței la unele molecule.

Cel de-al patrulea capitol prezintă o nouă direcție în studiul râiei sarcoptice la câine, prin introducerea noțiunii de microbiom al pielii. Subcapitolele aferente includ o prezentare generală a microbiomului cutanat, urmate de o descriere a microbiomului cutanat canin, un domeniu în pionierat.

Cea de-a doua parte a tezei de doctorat, partea de contribuții proprii, este structurată în 5 capitole (Capitolele 5-9): **Capitolul 5** prezintă descrierea scopului și a obiectivelor lucrării, următoarele 3 capitole (Capitolele 6-8) descriu studiile realizate, incluzând descrierea materialelor și a metodelor utilizate, rezultatele obținute și discuțiile, iar ultimul capitol reprezintă concluziile generale ale tezei, unde toate remarcile și observațiile din capitolele anterioare sunt sintetizate și analizate într-o formă finală.

Capitolul 6, intitulat “Semne clinice și epidemiologia râiei sarcoptice la câine în regiunea Moldovei” debutează cu o descriere a materialelor și metodelor utilizate pentru realizarea studiului și menționează: criteriile de incluziune ale câinilor (semne clinice evocative pentru râie și raclate dermice pozitive), chestionarul adresat proprietarului, metoda de diagnostic prin raclat dermic profund, urmată de identificarea microscopică a formelor de evoluție a *S. scabiei*. O metodă interesantă a fost utilizarea unui sistem de scor clinic original, adaptat pentru câini, dar care a fost inițial gândit pentru porcii cu râie sarcoptică (Bernigaud *et al.*, 2016). Scorul este bazat pe evaluarea zonelor de piele afectate de leziuni, gradul de alopecie, intensitatea eritemului cutanat, precum și intensitatea crustelor și a scuamelor, rapoartate la diverse părți ale corpului (cap, trunchi, membre, coadă). Notele alocate fiecărui semn clinic au fost între 0 și 4, 4 fiind cea mai gravă, ceea ce a însumat un scor clinic total între 0 și 60, scor alocat la prima vizită. În ceea ce privește tratamentul, fiecare câine a fost tratat cu un produs acaricid specific împotriva infecției cu *S. scabiei* (doramectină, sarolaner, afoxolaner).

Rezultatele acestui studiu au arătat că au fost incluși 48 de câini, examinați în perioada 2015-2018. Dintre aceștia, 27 au fost examinați în cadrul Clinicii de Parazitologie și Boli Parazitare de la Facultatea de Medicină Veterinară Iași, iar 21 au fost examinați fie în gospodării private (14), fie în adăposturi (7). Am inclus câini din județele Iași, Vaslui și Vrancea. Majoritatea erau rasă comună sau mețiși (n=39,81.25%), dar au fost și unii indivizi aparținând următoarelor rase: Boxer (o mama cu 7 pui), Bull Terrier (1), Caniche (1). Vârsta lor a variat între 1 lună și 12 ani, dar mai mult de jumătate dintre ei (n=28, 58.33%) erau câini tineri, sub un an. Indivizii incluși au fost reprezentați în proporții aproximativ egale ai ambelor sexe, cu 23 de masculi (48% din total) și 25 de femele (52% din total). În ceea ce privește istoricul acestor câini, informațiile au fost limitate în majoritatea cazurilor, deoarece un număr mare dintre acești câini erau câini comunitari (n=21, 43.7%). Transmiterea zoonotică a bolii a fost raportată de la un singur câine, cel care avea cele mai severe semne de râie sarcoptică din studiu și care a fost internat în clinica noastră. Probele de raclat dermic examinate prin examen direct la microscop, au fost pozitive pentru ouă, larve sau adulți de *S. scabiei*. Totuși am observat un număr foarte mic de elemente parazitare în probele colectate.

Scorul clinic al câinilor a variat între un minim de 4 și a ajuns până la un maxim de 58, având în vedere că scorul maxim care se putea obține era de 60. Acest lucru reprezintă o ilustrare clară a faptului că animalele incluse în studiu aveau de la leziuni foarte discrete la leziuni grave, generalizate pe tot corpul, lucru ilustrat în figurile și graficele din text.

Capitolul 7, numit “Evaluarea eficacității afoxolanerului în tratarea câinilor cu râie sarcoptică”, începe cu prezentarea materialelor și a metodelor utilizate, acestea fiind similare celor descrise în capitolul anterior, cu modificarea că recoltarea raclatelor dermice și atribuirea scorului clinic s-a realizat la ziua 0 (Z0) și la ziua 28 (Z28), când s-au realizat și fotografiile ale câinilor. De asemenea, raclatele dermice s-au realizat din trei zone ale corpului (cap, trunchi și membre). Partea inovativă a acestui studiu este protocolul de tratament care a constat în utilizarea produsului comercial NexGard® (afoxolaner), administrat oral, ținând cont de greutatea animalului, rezultând o doză cuprinsă între 2.7 și 6.9 mg/kg la Z0 cu repetare la Z28. Toți câinii aflați în contact au fost tratați. La unii câini, am colectat și probe de sânge prin puncție venoasă, în vederea corelării rezultatelor cu unii parametri biochimici din ser.

Rezultatele acestui studiu au constat în includerea a 16 câini, pentru care evoluția tratamentului la Z28 s-a evaluat prin compararea scorului clinic din Z0 cu cel din Z28.

În ansamblu, am observat o rezolvare semnificativă a semnelor clinice, scorul clinic la Z28 ajungând la 36.6% din valoarea sa inițială, la Z0. Nu au fost observate reacții de intoleranță la acest medicament.

Evaluarea eficacității clinice a acestui tratament a fost calculată și prin următoarea formulă: $[(\text{Scor clinic la Z0} - \text{scor clinic la Z28}) / \text{scor clinic la Z0}] * 100$, după Beugnet *et al.* (2016). Eficacitatea a variat între 47% și 90%. Deși studiul nostru nu a inclus o numărare a acarienilor de *S. scabiei* prezenți în proba examinată (datorită numărului foarte mic de indivizi prezenți în probă), am refăcut raclatul la Z28 din cele 3 regiuni anatomice, și nu am mai observat niciun acarion. Aceste rezultate ale eficacității afoxolanerului, sunt în concordanță cu singurele și primele studii din literatură, realizate pe câini cu râie sarcoptică de către Beugnet *et al.* (2016) și Hampel *et al.* (2018), demonstrând o foarte bună eficacitate încă din Z28. De precizat este că, în momentul realizării acestui studiu, afoxolanerul nu era moleculă autorizată în Uniunea Europeană pentru tratamentul râiei sarcoptice, dar la sfârșitul anului 2018 această moleculă a devenit oficial autorizată.

Pentru 10 dintre câinii incluși în studiu am colectat probe de sânge și am dozat o serie de parametri biochimici (creatinina și ureea la 10 câini; fosfataza alcalină, ALT și AST pentru 5 câini), care au arătat o creștere a ureei la jumătate dintre câinii analizați. Totuși, această valoare nu a fost corelată cu o creștere a valorii creatininei, ceea ce semnifică absența unor disfuncții renale marcante. S-a mai observat și o creștere a valorii AST.

Capitolul 8, intitulat “Modificările microbiomului cutanat la câinii cu râie sarcoptică” este partea cea mai detaliată și mai originală din prezenta lucrare. Acesta debutează tipic, cu prezentarea materialelor și metodelor utilizate, dintre care amintim: criteriile de incluziune ale câinilor (aceleași care au fost prezentate în capitolele anterioare), chestionarul dermatologic specific adaptat din medicina umană, care include o parte specială privind locurile de recoltare pentru studiul microbiomului cutanat, metoda de recoltare, care include recoltarea din 2 locuri anatomice (ureche și membru), cu două probe recoltate pentru fiecare loc anatomic (o proba de piele sănătoasă și o probă de piele afectată de râie), probele fiind recoltate prin raclat și prin tamponare, aceste acțiuni fiind repetate la Z0 și la Z28. Analizele de metagenomică au fost realizate la platforma de NGS a Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), Créteil, Franța, urmând protocolul laboratorului pentru determinarea microbiomului cutanat bacterian și fungic.

Rezultatele au inclus prezentarea celor 5 câini incluși în studiu, dintre cei 48 descriși în studiul epidemiologic. Dintre aceștia, 3 erau dintre cei 16 câini tratați cu afoxolaner. Este vorba despre 2 femele și un mascul, de rasă comună, cu vârsta cuprinsă între 3 și 5 ani, aparținând aceluiași proprietar. Acești câini au respectat regula studiului și au venit din nou pentru recoltarea de probe în Z28. Ceilalți doi câini incluși, au fost o cățea Boxer de 6 ani împreună cu puilul ei în vârstă de 5 săptămâni. Acești câini nu au mai revenit la recoltarea din Z28, ceea ce semnifică faptul că rezultatele lor reflectă doar situația microbiomului cutanat înainte de tratament.

În total au fost colectate 32 de probe, de la Z0 și Z28 pentru primii 3 câini și de la Z0 pentru cei 2 Boxeri. Pentru toate probele, am studiat secvențierea genei bacteriene 16S și secvențierea genei ITS. Pentru o mai bună prezentare a rezultatelor, am împărțit prezentarea în două mari subcapitole: primul ia în considerare toți cei 5 câini înaintea oricărui tratament și compară efectul rasei asupra microbiomului cutanat, iar cel de-al doilea include doar cei 3 câini cărora li s-au recoltat probe și la Z28 și compară microbiomului cutanat înainte și după primul tratament cu afoxolaner.

Primul subcapitol, care are în vedere influența rasei asupra microbiomului cutanat, a relevat, pentru microbiomul bacterian, faptul că principala forță care influențează microbiomul în studiul nostru este rasa, mai degrabă decât individul sau locul de recoltare. Graficul PcoA, cel al „ β diversity weighted UniFrac”, precum și cel al „ β diversity unweighted UniFrac” au ilustrat două grupuri bine definite de probe, reprezentând cele două rase- Boxer și comun. Indicele Shannon, care indică abundența speciilor și uniformitatea OTUs, a arătat o diferență semnificativă între cele două grupuri de rase, cei de rasă comună având un microbiom care cuprinde o diversitate mai mare de specii bacteriene, comparativ cu cei din rasa Boxer. Totuși, principalul gen prezent în proporție majoritară la ambele rase rămâne *Staphylococcus*.

Din studiile microbiomului cutanat la câinii sănătoși, s-a observat că principala forță care influențează compoziția microbiomului cutanat este individul, urmat de locul de recoltare al probei și într-o mai mică măsură rasa și mediul de viață (Cusco *et al.*, 2017a, 2017b). Acest aspect nu a fost observat și în studiul nostru, totuși trebuie să luăm în considerare faptul că numărul de câini incluși a fost destul de redus, numărul de rase a fost doar de două, iar Boxerii erau foarte apropiați și probabil aveau un microbiom cutanat asemănător din cauza faptului că era vorba despre o mamă și un pui recent înțărcaț. În plus, am comparat rezultatele noastre cu cele ale unor câini sănătoși, ceea ce ar putea constitui un dezavantaj. Totuși, rezultatele obținute de noi arată clar o serie de diferențe nete între cele două grupuri, aspecte observate din graficele și figurile aferente.

În ceea ce privește microbiomul cutanat fungic, rezultatele sunt asemănătoare cu cele obținute la cel bacterian, în sensul că probele se grupează în funcție de cele două rase pentru graficul PcoA, cel al „ β diversity weighted UniFrac”, precum și cel al „ β diversity unweighted UniFrac” La fel, indicele Shannon a arătat o diferență importantă între câinii de rasă comună, care aveau un microbiom fungic mult mai bogat decât cei din rasa Boxer.

În cel de-al doilea subcapitol, am analizat diferențele produse în microbiomul cutanat al celor 3 câini din rasa comună, de primul tratament cu afoxolaner.

Un aspect important observat pentru microbiomul cutanat bacterian, este cum *Staphylococcus* (în principal *S. pseudintermedius*) care reprezenta genul cel mai abundent în Z0, si-a scăzut semnificativ nivelul după tratament în Z28, ceea ce poate însemna că *S. scabiei* promovează creșterea bacteriilor oportuniste prezente în mod normal la nivelul pielii. Rezultate similare au fost obținute și în studiul microbiomului cutanat la porcii cu râie sarcaptică (Swe *et al.*, 2014). Indicele Shannon a arătat o schimbare importantă la nivelul diversității bacteriene, cu o creștere semnificativă după administrarea

tratamentului, aspect care poate fi interpretat ca un semn de vindecare al pielii. Graficul PCoA a prezentat două grupuri separate de probe, cele înainte de tratament la Z0 și cele după tratament la Z28.

În ceea ce privește microbiomul cutanat fungic, ne-a atras atenția cazul particular al genului *Malassezia*, care este de obicei asociat cu boli ale pielii la câine. Am observat că nivelul acestuia a scăzut după tratamentul cu afoxolaner, acesta reprezentând un semn de vindecare al barierei cutanate. Indicele Shannon a prezentat o scădere a diversității fungice după tratament la Z28, ceea ce este neobișnuit și rămâne de investigat mai în amănunt. Graficul PcoA precum și cel al „ β diversity unweighted UniFrac”, arată gruparea probelor în două grupuri separate, înainte de tratament la Z0 și după tratament la Z28.

Ultimul capitol, capitolul 9, însumează toate concluziile cercetării noastre și creează o viziune de ansamblu asupra rezultatelor tezei de doctorat. Sintetizând cele mai relevante concluzii ale studiului, putem nota că:

- aspectele epidemiologice luate în studiu (vârsta, sex), au confirmat puținele date existente referitor la epidemiologia râiei sarcoptice la câine
- testarea eficacității afoxolanerului în tratarea râiei sarcoptice la câine, cu metode de alocare a scorului clinic mai originale, a marcat rezultate pozitive și încurajatoare, chiar după 28 zile de tratament
- a fost dezvoltată ideea observării și controlului microbiomului cutanat, atât bacterian, cât și fungic la câinii infectați natural cu *S. scabiei*. Acesta a oferit rezultate noi și interesante într-un domeniu puțin sau chiar deloc studiat, fapt constatat în ciuda numărului mic de câini luați în studiu, limitare provocată de factorul financiar.