

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului
“Regele Mihai I al României” din Timișoara



Facultatea de Medicină Veterinară

CUCERZAN I. ALEXANDRA

TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI PRIVIND BOLILE ALERGICE LA CÂINE

Conducător științific
Prof. Dr TÎRZIU EMIL

Timișoara
2020

Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "*King Michael I of Romania*" from Timișoara



Faculty of Veterinary Medicine

CUCERZAN I. ALEXANDRA

THESIS

RESEARCH ON THE ALLERGIC DISEASES IN DOGS

Doctoral supervisor
Prof. Dr TÎRZIU EMIL

Timișoara
2020

Prezenta teză de doctorat conține:
Rezumat (română, engleză);
Introducere;
Cercetări bibliografice (37 de pagini, 2 tabele, 4 figuri);
Cercetări proprii (97 de pagini, 23 de tabele, 73 de figuri);
Concluzii generale;
Bibliografie (265 de titluri bibliografice);
Lista lucrărilor științifice publicate.

REZUMATUL
Tezei de doctorat
CERCETĂRI PRIVIND BOLILE ALERGICE LA CÂINE

Teza de doctorat este structurată în două părți: „**Stadiul actual al cunoașterii**” și „**Cercetări proprii**”, la care se adaugă considerațiile introductive și cele finale, sub formă de concluzii generale.

În partea introductivă a tezei este prezentată importanța temei alese, urmată de expunerea obiectivelor specifice realizate în anii de studiu.

Cercetările bibliografice cuprind două capitole:
Capitolul I. Aspecte generale privind imunitatea în bolile alergice
Capitolul II. Principalele boli alergice la câine

Primul capitol, intitulat „Aspecte generale privind imunitatea în bolile alergice”, cuprinde șapte subcapitole în care sunt prezentate principalele componente structurale ale sistemului imunitar (celulele cu rol în stările alergice, moleculele sistemului imunitar) și modul lor de interacțiune, pentru a asigura imunostazia organismului. De asemenea, sunt prezentate date din literatura de specialitate, legate atât de capacitatea organismului de a recunoaște alergenele, cât și despre factorii care duc la apariția stărilor alergice.

Capitolul II, intitulat „Principalele boli alergice la câine”, cuprinde patru subcapitole în care sunt descrise principalele boli alergice întâlnite la câine și anume: dermatita atopică canină, dermatita alergică la înțepătura de purici, alergia alimentară și dermatita de contact.

Cercetările proprii sunt organizate în cinci capitole:
Capitolul III. Cercetări privind prevalența bolilor alergice la câine în zona de vest a României
Capitolul IV. Cercetări privind efectul unei diete hipoalergenice în dermatita atopică și alimentară la câine
Capitolul V. Cercetări privind terapia clasică în dermatita alergică la câine
Capitolul VII. Cercetări privind efectul unei terapii de desensibilizare la câinii cu dermatită atopică
Capitolul VIII. Cercetări privind efectul unor extracte biologice în tratamentul dermatitelor alergice la câine

Obiectivul principal al **capitolului III** a constat în investigarea prevalenței bolilor alergice la populația de câini din vestul României. Ca obiective secundare s-au urmărit: identificarea alergenilor implicați mai frecvent în declanșarea alergiilor la câine, precum și influența unor factori intrinseci și extrinseci (rasă, sex, habitat, hrană) în declanșarea bolilor alergice.

Cercetările au fost efectuate pe 430 de câini, examinați în cadrul Serviciului de Gardă al Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara, precum și în alte cabinete particulare din Timișoara, dar și din alte orașe din vestul României (Arad, Oradea și Deva), în perioada 2015 – 2019. Au fost luate în studiu animalele care au prezentat o simptomatologie asociată cu dermatitele alergice, cum ar fi: diverse dermatite pruriginoase, prezența unor simptome gastro-intestinale, inclusiv șoc anafilactic la contactul cu diferite substanțe.

Diagnosticul diferențial a fost realizat pentru fiecare animal în parte, protocolul incluzând, în primele etape, excluderea principalelor cauze care produc dermatite pruriginoase, prin raclate cutanate, testul cu lampa Wood și testul cu banda scoci, iar antibiograma și prelevarea de probe auriculare s-a făcut în funcție de prezența sau absența leziunilor auriculare. Menționăm că, diagnosticul diferențial a fost făcut față de unele ectoparazițe

(Cheyletielloză, Demodicoză, Scabie), anumite dermatomicoze, podermită primară, sebooree, unele boli autoimune, hipotiroidism, otite bacteriene etc.

După examenul clinic, în funcție de simptomatologia constatată, câinii au primit tratamentul corespunzător, fiind eliminate ectoparazițele, precum și infecțiile cutanate și auriculare. Medicamentele utilizate în tratamentul simptomatic au aparținut următoarelor clase: antiinflamatorii (corticosteroizi), antihistaminice, ciclosporine, antibiotice, antimicotice și vitamine.

După terminarea tratamentului simptomatic, 250 câinii, din cei 430, a căror simptomatologie a persistat, au fost supuși testului alergologic pentru depistarea și identificarea alergenilor care au declanșat dermatitele alergice. Pentru aceasta au fost folosite două teste alergologice, respectiv testele Polycheck® și Sensitest® (Synevet).

În vederea efectuării testelor alergice, în prima etapă, de la fiecare animal au fost recoltate probe de sânge pentru efectuarea testului Polycheck®, pentru ca, ulterior, câinii care au avut o reactivitate scăzută la acest test să fie supuși testului Sensitest®, pentru identificarea alergiilor alimentare. În continuare, pentru confirmarea diagnosticului de alergje alimentară, câinii care au reacționat pozitiv la testul Sensitest® au fost supuși unui test de excludere cu diverse diete monoproteice.

La testul de excludere au fost folosite conserve de carne, monoproteice, din următoarele sortimente: carne de capră, carne de vițel, carne de curcan, carne de iepure, carne de găscă și carne de somon. Dietele au fost testate pe o perioadă de cel puțin trei săptămâni, iar în momentul în care s-a observat o diminuare a intensității pruritului dieta nu a mai fost schimbată cu altă dietă monoproteică.

Animalele care au primit, în prealabil, un tratament cu preparate antiinflamatoare au fost supuse testelor alergologice, la cel puțin două săptămâni de la întreruperea tratamentului.

La finalul studiului s-a constatat o prevalență mai mare a dermatitei alergice la înțepătura de purici, respectiv de 37%, urmată de dermatita atopică 25%, alergiile alimentare 23%, pentru ca prevalența dermatitei de contact să fie de doar 4%.

În urma efectuării testelor serologice s-a constatat că reactivitatea cea mai mare a animalelor alergice a fost la acarieni, între 22-91%, iar *Dermatophagoides farinae* a fost cel mai reprezentativ acarian din această categorie.

La polen s-a înregistrat o reactivitate cuprinsă între 2-42%, reactivitatea maximă fiind înregistrată la polenul de secară, comparativ cu sporii fungilor, față de care s-a înregistrat o reactivitate cuprinsă între 8-10%.

Dintre alergenele alimentare, cea mai importantă sursă alergizantă a fost carnea de pui (70%), urmată de soia (67%), carnea de porc (62%), carnea de vită (57%), cereale (între 25-52%), ouă (44%), cartofi (35%), carnea de miel (34%), lapte (32%), carnea de pește (15%) și carnea de rață (7%).

În urma administrării dietei monoproteice s-a obținut o diminuare a pruritului, cu ajutorul dietelor pe bază de carne de capră, carne de găscă, carne de vițel și carne de iepure. Astfel, la trei săptămâni de la începerea dietei, 25% dintre câini au manifestat o reducere a intensității pruritului, la dieta pe bază de carne de capră, 37% din câini au manifestat o reducere a intensității pruritului la dieta pe bază de carne de găscă, 15% au manifestat o reducere a intensității pruritului la dieta pe bază de carne de vițel și 23% au manifestat o reducere a intensității pruritului la dieta pe bază de carne de iepure.

De asemenea, s-a constatat că apariția bolilor alergice este influențată și de alți factori. Astfel, în urma analizelor statistice, s-au obținut diferențe semnificative în ceea ce privește următorii factori de risc: mediul din care provine animalul, vârsta și tipul de hrană primit.

Studiul efectuat în cadrul acestui capitol oferă o imagine de ansamblu asupra dermatitelor alergice din zona de vest a României, consecutiv aplicării unor metode moderne de diagnostic imunologic, recent introduse pe piața din țara noastră.

Capitolul IV, „Cercetări privind efectul unei diete hipoalergenice în dermatita atopică și alimentară la câine”, a avut ca obiectiv principal efectul unei diete hipoalergenice, administrată atât la câinii diagnosticați cu dermatită atopică cât și la câinii diagnosticați cu alergje alimentară.

Diagnosticul alergiilor a fost confirmat în urma efectuării testului Polycheck®, realizat în cadrul unor cabinete veterinare private, și a testului Sensitest® - alergeni alimentari, realizat în cadrul laboratorului Synevet.

Repartiția câinilor, în funcție de alimentația de bază, înainte de începerea studiului, a fost următoarea: în primul lot experimental, 60% dintre câini primeau doar hrană uscată, din categoria „low cost”, iar restul de 40% primeau o hrană mixtă, compusă din hrană uscată comercială, hrană umedă comercială, diverse diete gătite de proprietari și recompense; în al doilea lot, 40% din câini primeau hrană uscată și 60% primeau o rație mixtă.

De asemenea, în cadrul cercetărilor, s-a urmărit și evoluția pruritului și gradul de ameliorare a leziunilor cutanate, consecutiv administrării dietei hipoalergenice. Dieta comercială testată a fost reprezentată de produsul

Royal Canin Hydrolyzed Protein, al cărei efect a fost urmărit pe o perioadă de trei luni. Semnele clinice au fost evaluate cu ajutorul indicelui CADESI.

Cercetările s-au efectuat pe un lot de douăzeci de câini, grupați în două loturi experimentale, după cum urmează: lotul 1, constituit din zece câini cu hipersensibilitate cutanată, diagnosticați cu dermatită atopică și lotul 2, constituit tot din zece câini, diagnosticați cu alergii de natură alimentară.

Odată cu începerea experimentului, proprietarii câinilor au fost responsabili cu înregistrarea severității pruritului, săptămânal, pe o scară analogică liniară, care a avut următoarele valori: 0 (prurit absent), 1 (prurit ușor, ocazional), 2 (prurit moderat, constant sau intermitent, care nu deranjează somnul), 3 (prurit sever, supărător, care deranjează somnul).

La câinii din lotul 1, diagnosticați cu dermatită atopică, după administrarea dietei, s-a constatat o reducere a punctajului CADESI cu 43,7%, după trei luni de la începerea dietei, respectiv: eritemul s-a redus cu 26,7%, eflorescențele primare s-au redus cu 30,85% iar eflorescențele secundare s-au redus cu 37,25%.

Dieta testată a avut rezultate remarcabile, mai ales la câinii din lotul 2, diagnosticați cu alergii alimentare. Astfel, în ceea ce privește reducerea leziunilor cutanate, s-a constatat o diminuare a punctajului CADESI, cu 54,9%, după trei luni, respectiv: eritemul s-a redus cu 56,89%, eflorescențele primare s-au redus cu 54,2%, eflorescențele secundare s-au redus cu 60,78%, iar lichenificarea s-a redus cu 51,28%.

Reducerea pruritului, la câinii cu dermatită atopică, a fost observată la 40% din câinii testați, pruritul fiind de intensitate moderată, iar la câinii cu alergii alimentare reducerea pruritului a fost observată la toți câinii testați, cu mențiunea că, la finalul experimentului, 90% din câini manifestau prurit ușor, iar 10% nu mai manifestau prurit.

În concluzie, dieta pe bază de proteină hidrolizată din soia are un efect pozitiv asupra diminuării pruritului și a leziunilor cutanate la câinii cu dermatită alimentară, iar la câinii cu dermatită atopică ajută la diminuarea semnelor cutanate, deși câinii continuă să manifeste prurit moderat.

Având în vedere, practica uzuală a medicilor veterinari, prin care animalele alergice primesc pe lângă tratamentul medicamentos și o schimbare de dietă, studiul confirmă efectele benefice ale folosirii unei diete hipoalergenice la câinii cu dermatită atopică, fiind primul studiu de acest fel efectuat în România.

În cadrul **capitolului V**, au fost testate comparativ două produse, respectiv un produs care are în compoziție oclacitinib (Apoquel®; Zoetis Inc.) și un produs care are în compoziție metilprednisolon (Medrol®; Zoetis Inc.), ambele utilizate pentru controlul pruritului și diminuarea semnelor clinice, caracteristice dermatitei alergice.

Cercetările s-au efectuat în perioada iunie - august 2019, pe un lot de 20 de câini, diagnosticați cu dermatită alergică. Menționăm că, diagnosticul de dermatită alergică s-a stabilit după evaluarea condiției corporale și a semnelor clinice, coroborate cu testul alergologic Polycheck®.

În continuare, câinii la care s-a stabilit diagnosticul de dermatită alergică au fost împărțiți aleatoriu, în două loturi egale, câte zece animale în fiecare lot, după cum urmează: lotul 1 la care s-a administrat metilprednisolon și lotul 2 la care a fost administrat oclacitinib.

După administrarea celor două preparate luate în studiu, câinii din ambele loturi au fost ținuți sub observație o perioadă de 28 de zile, fiind programați pentru control după 7, 14 și 28 de zile. La control a fost monitorizată evoluția pruritului și prezența unor semne clinice, caracteristice dermatitelor alergice. Pentru evaluarea eficacității tratamentului medicamentos a fost folosit indicele CADESI.

În urma experimentului s-a constatat că ambele produse testate au reușit să suprimă sau să reducă pruritul cu peste 50% din valoarea inițială. Dintre cele două produse, oclacitinibul a fost mai eficient, din acest punct de vedere, atât în prima parte a studiului, până în ziua 7, cât și după reducerea dozei în ziua 14. În schimb, câinii tratați cu metilprednisolon au manifestat o ușoară intensificare a pruritului după reducerea dozei, în ziua 14. Astfel, leziunile cutanate s-au redus, sub acțiunea celor două substanțe, cu 82,5% în cazul administrării metilprednisolonului și cu 83,1% în cazul administrării oclacitinibului, după cele 28 de zile de tratament.

Menționăm însă că, după întreruperea tratamentului, în ziua 28, ambele loturi au început să manifeste un prurit ușor, fapt care necesită extinderea protocolului terapeutic, la doze reduse, și după cele 28 de zile, sau aplicarea unui tratament de desensibilizare.

În concluzie, acest studiu prin care a fost evaluată eficacitatea unui produs, recent introdus pe piața din România, deși a demonstrat o eficiență deosebită asupra stării pruritului, fiind extrem de eficient în dermatitele alergice, datorită costului ridicat încă nu este accesibil tuturor cabinetelor veterinare.

Capitolul VI, „Cercetări privind efectul unei terapii de desensibilizare la câinii cu dermatită atopică”, a avut ca obiectiv principal evaluarea efectului terapiei de desensibilizare, la câinii cu dermatită alergică, cu ajutorul testului de desensibilizare, comercializat de Biocheck GmbH.

Pentru efectuarea cercetărilor, lotul experimental a fost constituit din 20 de câini cu dermatită alergică, diagnosticați cu ajutorul testului Polycheck®.

Soluția terapeutică, folosită pentru desensibilizare, a fost achiziționată în cadrul cabinetelor veterinare, numai pentru animalele ai căror proprietari au fost de acord cu imunoterapia impusă în urma rezultatului testului alergic.

Înainte de a fi supuși tratamentului de desensibilizare câinii nu au primit niciun fel de medicație, orice tratament medicamentos fiind întrerupt cu cel puțin trei săptămâni înainte de începerea protocolului de desensibilizare. În paralel, câinii au fost testați, timp de șase săptămâni, și cu o dietă hipoalergenică, pentru a se stabili dacă alergiile sunt de natură alimentară. O parte dintre câini luați în studiu au necesitat reînceperea tratamentului medicamentos cu antiinflamatorii, care a fost întrerupt în luna a VII-a a studiului.

Pe întreaga perioadă a derulării studiului clinic, animalele au fost supuse unui protocol de deparazitare externă, în fiecare lună, pentru combaterea puricilor și pentru excluderea unor manifestări clinice datorate înțepăturii acestora.

Animalele supuse tratamentului de desensibilizare au fost evaluate la șase săptămâni, apoi la trei, șapte și 11 luni după începerea tratamentului, prin evaluarea condiției corporale și a intensității pruritului.

Pentru evaluarea evoluției pruritului, pe parcursul celor 11 luni de studiu, proprietarii câinilor au fost responsabili cu înregistrarea severității acestuia, săptămânal, pe o scară analogică liniară cu următoarele valori: 0 (prurit absent), 1 (prurit ușor, ocazional), 2 (prurit moderat constant sau intermitent care nu deranjează somnul), 3 (prurit sever, supărător care deranjează somnul). Pentru evaluarea semnelor clinice a fost ales indicele SASSAD.

Protocolul de desensibilizare a avut o eficacitate de 75%. Astfel, 15 din cei 20 câini supuși tratamentului de desensibilizare, la finalul studiului, au ajuns în pragul de 25 de puncte evaluate, cu ajutorul indicelui SASSAD. Restul câinilor (25%) au manifestat o scădere a scorului SASSAD doar în perioada în care terapia de desensibilizare a fost realizată concomitent cu medicația antiinflamatoare. Din cei cinci câini, care nu au răspuns la terapia de desensibilizare, trei dintre ei aveau o reactivitate mare la polenul de secară.

În ceea ce privește eficacitatea terapiei de desensibilizare, în reducerea leziunilor cutanate, eficacitatea a fost de 66% în cazul metodei convenționale și de 88% în cazul metodei cluster. Diminuarea pruritului, sub influența corticoterapiei, a fost observată la 100% din câini și s-a menținut la 75% din efectiv și după oprirea acesteia, sub influența imunoterapiei. Eficacitatea terapiei convenționale în reducerea pruritului a fost de 50%, iar a terapiei prin metoda cluster de 38%.

În concluzie, menționăm că, cercetările din cadrul acestui capitol, privind folosirea desensibilizării în tratamentul câinilor alergici, reprezintă primele cercetări efectuate în țara noastră în care a fost testat produsul Alutek.

Capitolul VII, „Cercetări privind efectul unor extracte biologice în tratamentul dermatitelor alergice la câine” a avut ca obiectiv principal utilizarea unor compuși naturali, existenți în flora spontană, în tratamentul dermatitelor alergice la câine și testarea efectului antibacterian și antifungic al acestora, inclusiv posibilitatea preparării unor produse biologice, cu efecte pozitive asupra infecțiilor secundare, apărute consecutiv evoluției bolilor alergice.

Obiectivele secundare au constat din următoarele activități:

- 1) obținerea și caracterizarea extractelor din MO, CV, OS și RP, folosind HPLC / MS;
- 2) determinarea capacității antioxidante a extractelor din plantele luate în studiu;
- 3) testarea efectului antibacterian și antifungic *in vitro* al MO, CV, OS și RP;
- 4) testarea polifenolilor identificați pe nouă tulpini microbiene;
- 5) testarea efectului antibacterian al extractelor la câinii cu dermatite alergice.

Experimentele, care au inclus prepararea, analiza chimică și evaluarea antibacteriană și antifungică a extractelor au fost realizate în cadrul Platformei de Cercetare Interdisciplinară, din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului „Regele Mihai I al României” din Timișoara.

Pentru efectuarea experimentelor, părțile aeriene ale speciilor de plante luate în studiu au fost colectate în perioada de înflorire, din flora sălbatică, situată la periferia Timișoarei, pe parcursul anului 2018. Din fiecare specie s-au recoltat și folosit aproximativ 500 g material proaspăt. Etapele de lucru au vizat, pentru fiecare plantă în parte, după extracție, caracterizarea extractelor folosind HPLC/MS, determinarea conținutului total de fenoli și un profil al principalilor acizi hidroxicinamici (HCA), testarea efectului antibacterian și antifungic *in vitro* al MO, CV, OS și RP inclusiv acizii: cafeic, ferulic, coumaric și rosmarinic și determinarea capacității antioxidante.

Materialul vegetal a fost uscat la aer, la 25°C, și a fost măcinat folosind o mașină de tocat (BLIXER 3; Retsch Technology GmbH, Haan, Germania) obținându-se o pulbere fină. Din pulberea obținută s-au preluat 2 g, la care s-au adăugat 20 ml etanol 60%. Preparatul obținut s-a menținut timp de 60 minute pe agitatorul magnetic. Apoi, extractul obținut a fost filtrat, folosind hârtie de filtru și ulterior filtre cu membrană Whatmande nylon de 0,45 μm și diametrul de 30 mm. Extractul obținut a fost depozitat la 2-4°C, până în momentul efectuării testelor.

Determinarea conținutului total de fenoli și a profilului principalilor acizi hidroxicinamici (HCA) s-a efectuat cu ajutorul sistemului cromatograf Shimadzu, echipat cu detector SPD-10A UV și LC-MS 2010, coloana EC 150/2 NUCLEODUR C18 Gravity SB 150x2mm x 5 μm.

Pentru determinarea capacității antioxidante s-a folosit testul Folin – Ciocâlțeu, iar evaluarea activității antimicrobiene și antifungice a fost realizată cu ajutorul metodei microdiluțiilor în plăci (ISO 20776-1:2019).

Activitatea antibacteriană a extractelor a fost determinată cu ajutorul unor tulpini standard, aparținând următoarelor specii: *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615), *Escherichia coli* (ATCC® 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), *Shigella flexneri* (ATCC® 12022), *Salmonella typhimurium* (ATCC® B140) și *Haemophilus influenzae* (ATCC® 10211), iar pentru activitatea antifungică s-au folosit tulpini aparținând speciilor *Candida albicans* (ATCC® 10231) și *Candida parapsilopsis* (ATCC® 22019).

Tulpinile bacteriene utilizate în acest studiu au fost obținute din colecția de culturi microbiene a Laboratorului de Microbiologie din cadrul Platformei de Cercetare Interdisciplinară a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului „Regele Mihai I al României” din Timișoara. Menționează că, în laborator, tulpinile ATCC® sunt păstrate la -50°C.

În cadrul experimentelor noastre s-a utilizat o diluție de 10⁻³, din cultura proaspătă, pentru a realiza testul, un inocul echivalent cu un standard 0,5 McFarland. Tulpinile de ATCC® utilizate au fost revitalizate prin inocularea și incubarea peste noapte la 37°C în bulion Mueller-Hinton (BMH) (Oxoid, CM1135), și, ulterior, transplantate pe agar BMH și incubate timp de 24 de ore la 37°C. Tulpinile au fost apoi diluate la o densitate optică (OD) de 0,5 McFarland standard (1,5 × 10⁸ ufc/ml) folosind bulion BMH.

În cadrul experimentelor efectuate de noi, plăcile au fost acoperite și lăsate peste noapte la 37°C, apoi a fost măsurată densitatea optică, la 540 nm, folosind un cititor ELISA (BIORAD PR 1100).

Pentru testarea efectului antibacterian al extractelor *in vivo* au fost aleși un număr de 30 de câini, diagnosticați cu dermatită atopică, care au fost împărțiți în trei loturi egale, lotul 1 a fost tratat cu extract de *M. officinalis*, lotul 2 cu extract de *R. pseudoacacia*, iar lotul 3 cu un amestec din cele două plante. Eficacitatea extractului a fost urmărită prin evaluarea numărului total de germeni (NTG) și a numărului de stafilococi de la nivelul pielii.

În ceea ce privește compoziția chimică a extractelor au fost obținute următoarele rezultate:

- din extractul de *R. pseudoacacia* principalele componente identificate au fost: acidul rosmarinic, rutina, resveratrolul, quercitina și epicatechina;

- din extractul de *M. officinalis*: epicatechina, kaempferol, rutină și acid cafeic;

- din extractul de *C. varia*: rutină, epicatechina, acidul rosmarinic, kaempferol și resveratrol;

- din extractul de *O. spinosa*: kaempferol, acidul rosmarinic, quercitina și rutina.

Extractele au avut o acțiune de inhibare a dezvoltării coloniilor bacteriene, după cum urmează: extractul de *C. varia* a avut efect de inhibare asupra coloniilor de *C. albicans*; extractul de *R. pseudoacacia* a avut efect asupra coloniilor de *S. pyogenes*, *S. aureus* și *P. aeruginosa*; extractul de *M. officinalis* a inhibat dezvoltarea coloniilor de *S. aureus* și *P. aeruginosa*, iar extractul de *O. spinosa* a avut efect asupra coloniilor de *S. pyogenes*.

Conform datelor obținute, cea mai mare valoare a polifenolilor totali a fost înregistrată în proba de *R. pseudoacacia* (16,21 mg GAE/g eșantion), urmată de *C. varia* (15,06 mg GAE/g eșantion), *O. spinosa* (13,17 mg GAE/g probă), iar cea mai mică valoare a fost înregistrată pentru *M. officinalis* (11,94 mg GAE/g eșantion).

În urma testării efectului extractelor de *M. officinalis* și *R. pseudoacacia* s-a observat o diminuare a încărcăturii microbiene. În acest sens extractul de *M. officinalis* a avut efectul cel mai puternic de reducere a dezvoltării microorganismelor, urmată de extractul de *R. pseudoacacia* și de extractul obținut din amestecul celor două plante.

Astfel, în urma administrării extractului de *M. officinalis*, s-a observat o reducere a numărului total de germeni la probele prelevate de la câinii cu dermatită, de la 1160 × 10⁴ ± 135 × 10⁴ ufc/ml la 1137 × 10⁴ ± 207 × 10⁴ ufc/ml. Extractul de *R. pseudoacacia* a determinat o reducere a numărului total de germeni de la 851 × 10⁴ ±

101 x 10⁴ ufc/ml la 826 x 10⁴ ± 100 x 10⁴ ufc/ml, iar extractul de amestec a redus numărul total de germeni de la 838 x 10⁴ ± 54 x 10⁴ ufc/ml la 817 x 10⁴ ± 55 x 10⁴ ufc/ml.

În ceea ce privește reducerea numărului total de stafilococi, extractul de *M. officinalis* a avut efectul cel mai puternic, de diminuare a încărcăturii bacteriene, urmat de extractul de amestec și de extractul de *R. pseudoacacia*. Astfel, extractul de *M. officinalis* a redus numărul de stafilococi de la 667 x 10⁴ ± 840 x 10⁴ ufc/ml la 649 x 10⁴ ± 845 x 10⁴ ufc/ml, extractul de amestec a redus numărul de stafilococi de la 816 x 10⁴ ± 454 x 10⁴ ufc/ml la 802 x 10⁴ ± 451 x 10⁴ ufc/ml, iar extractul de *R. pseudoacacia* de la 710 x 10⁴ ± 790 x 10⁴ ufc/ml la 698 x 10⁴ ± 790 x 10⁴ ufc/ml.

În cadrul acestui ultim capitol al cercetărilor proprii, au fost testate mai multe plante din flora spontană, în combaterea germenilor bacterieni și fungici izolați din dermatitele alergice. Menționăm că, în actualul context în care fenomenul de antibioretistență este tot mai frecvent întâlnit și în medicina veterinară, extractele din plante pot reprezenta o soluție eficientă în tratamentul infecțiilor cutanate care însoțesc bolile alergice, fiind ușor de procurat și neimplicând costuri deosebite.

This doctoral thesis contains:
Summary (Romanian, English);
Introduction;
Bibliographic research (37 pages, 2 tables, 4 figures);
Own research (97 pages, 23 tables, 73 figures);
General conclusions;
Bibliography (265 bibliographic titles);
List of published scientific papers.

SUMMARY
Of the doctoral thesis
RESEARCH ON THE ALLERGIC DISEASES IN DOGS

The doctoral thesis is structured in two parts: "The current state of knowledge" and "Personal research", to which are added the introductory and final considerations, in the form of general conclusions.

The introductory part of the thesis presents the importance of the chosen topic, followed by the exposition of the specific objectives achieved in the study years.

The bibliographic researches comprise two chapters:
Chapter 1 General aspects of immunity in allergic diseases
Chapter 2 The main allergic diseases in dogs

The first chapter, entitled "General aspects of immunity in allergic diseases", contains seven subchapters in which the main structural components of the immune system (cells with a role in allergic conditions, immune system molecules) and their interaction to ensure the immunostasis of the organism are described. Also the chapter presents data from the literature related to the body's ability to recognize allergens and the factors that lead to allergic conditions.

Chapter II, entitled "The main allergic diseases in dogs", contains four subchapters which describe the main allergic diseases encountered in dogs, namely: canine atopic dermatitis, flea allergy dermatitis, food allergy and contact dermatitis.

Personal research is organized into five chapters:
Chapter III. Research on the prevalence of allergic diseases in dogs in the West area of Romania
Chapter IV. Research on the effect of a hypoallergenic diet in dogs with atopic dermatitis and food allergy
Chapter V. Research on classical therapy in dogs with allergic dermatitis
Chapter VII. Research on desensitization therapy in dogs with atopic dermatitis
Chapter VIII. Research on the effect of biological extracts in the treatment of allergic dermatitis in dogs.

The main objective of **chapter III** was to investigate the prevalence of allergic diseases in the dog population in western Romania. The secondary objectives were: identification of allergens more frequently involved in triggering allergies in dogs, as well as the influence of intrinsic and extrinsic factors (breed, sex, habitat, food) in triggering allergic diseases.

The research was carried out on 430 dogs, examined in the Guard Service of the Faculty of Veterinary Medicine in Timișoara, as well as in private offices in Timișoara, but also in other cities in western Romania (Arad, Oradea and Deva), during 2015 – 2019. Animals that showed symptoms associated with allergic dermatitis, such as: various pruriginous dermatitis, the presence of gastrointestinal symptoms, including anaphylactic shock on contact with various substances, were studied.

The differential diagnosis was made for each animal, the protocol including, in the early stages, the exclusion of the main causes of pruritic dermatitis, by skin scraping, the Wood lamp test and the scotch tape test, and the antibiogram and ear sampling were done depending on the presence or absence of ear lesions. We mention that the differential diagnosis was made for some ectoparasitosis (Cheyletiellosis, Demodicosis, Scabies), certain dermatomycoses, primary pyoderma, seborrhea, some autoimmune diseases, hypothyroidism, bacterial otitis, etc.

After the clinical examination, depending on the symptoms found, the dogs received the appropriate treatment, eliminating ectoparasitosis, skin and ear infections. The drugs used in the symptomatic treatment belonged to the following classes: anti-inflammatory (corticosteroids), antihistamines, cyclosporines, antibiotics, antifungals and vitamins.

After completing symptomatic treatment, 250 of the 430 dogs, whose symptoms persisted, underwent an allergological test to detect and identify allergens that triggered the allergic dermatitis. For this, two allergological tests were used, namely the Polycheck[®] and Sensitest[®] (Synevovet) tests.

In order to perform the allergic tests, in the first stage, blood samples were taken from each animal to perform the Polycheck[®] test, so that later the dogs that had a low reactivity to this test were subjected to the Sensitest[®] test, to identify food allergies. Furthermore, to confirm the diagnosis of food allergy, dogs that reacted positively to the Sensitest[®] test were subjected to an exclusion test with various monoprotein diets.

Canned monoprotein meats from the following assortments were used in the exclusion test: goat meat, veal, turkey meat, rabbit meat, goose meat and salmon meat. The diets were tested for a period of at least three weeks, and when a decrease in the intensity of pruritus was observed, the diet was not changed to another monoprotein diet.

Animals previously treated with anti-inflammatory drugs were subjected to allergological tests at least two weeks after stopping treatment.

The study found that the prevalence of allergic dermatitis in flea bites was 37%, followed by atopic dermatitis 25% and food allergies 23%, and the prevalence of contact dermatitis was 4%.

Following serological testing, it was observed that the highest reactivity of the animals was in mites, between 22-91%, and *Dermatophagoides farinae* was the most representative in this category.

A reactivity of 2-42% was recorded for pollen, the maximum reactivity being recorded for rye pollen, compared to fungal spores, which was between 8-10%.

Among food allergens the most important source of allergens were chicken (70%), followed by soy (67%), pork (62%), beef (57%), cereals (between 25-52%), eggs (44%), potatoes (35%), lamb (34%), milk (32%), fish (15%) and duck (7%).

Following the administration of the monoprotein diet, a reduction in pruritus was obtained, with the help of diets based on goat meat, goose meat, calf and rabbit meat. Thus, three weeks after the start of the diet, 25% of the dogs showed a reduction in the intensity of the pruritus with the goat-based diet, 37% of the dogs showed a reduction in the intensity of the pruritus with the goose-based diet, 15% showed a reduction in the intensity of pruritus with the calf diet and 23% showed a reduction in the intensity of pruritus with the rabbit diet.

The appearance of the allergic diseases is influenced by several factors, as a result of statistical analyzes significant differences were obtained in terms of the environment from which the animal comes, the age and type of food received.

Chapter IV, " Research on the effect of a hypoallergenic diet in dogs with atopic dermatitis and food allergy ", had as main objective the effect of a hypoallergenic diet, administered to both dogs diagnosed with atopic dermatitis and dogs diagnosed with food allergies.

The diagnosis of allergies was made with the help of the Polycheck[®] test performed in private veterinary offices, and with the help of the Sensitest[®] test - food allergens, performed in the Synevovet laboratory.

The distribution of dogs, according to the basic diet, before starting the study, was as follows: in the first experimental group, 60% of the dogs received only dry food, from the category "low cost", and the remaining 40% received a mixed food, consisting of commercial dry food, commercial wet food, various diets cooked by the owners and rewards; in the second group, 40% of the dogs received dry food and 60% received a mixed ration.

The research also followed the evolution of pruritus and the degree of improvement of skin lesions, following the administration of a hypoallergenic diet. The commercial diet tested was the Royal Canin Hydrolyzed Protein, which was followed for three months. Clinical signs were assessed using the CADESI index.

The research was performed on a group of twenty dogs, grouped in two experimental groups, as follows: group 1 (ten dogs with skin hypersensitivity, diagnosed with atopic dermatitis) and group 2 (ten dogs diagnosed with food allergy).

At the start of the experiment, dog owners were responsible for recording the severity of pruritus, weekly, on a linear analog scale that had the following values: 0 (pruritus absent), 1 (mild pruritus, occasional), 2 (moderate, constant or intermittent pruritus, which does not disturb sleep), 3 (severe pruritus, annoying, disturbing sleep).

The tested diet had remarkable results in dogs from group 2 diagnosed with food allergy, so, in terms of reducing skin lesions, a decrease in CADESI score was observed by 54.9% after three months: erythema decreased by 56.89%, primary efflorescence decreased by 54.2%, secondary efflorescence decreased by 60.78%, lichenification decreased by 51.28%.

In dogs in group 1 diagnosed with atopic dermatitis, a reduction of CADESI score was observed by 43.7% after three months from the start of the diet: erythema decreased by 26.7%, primary efflorescence decreased by 30.85%, secondary efflorescences decreased by 37.25%.

Reduction of pruritus in dogs with atopic dermatitis was observed in 40% of dogs tested, pruritus being of moderate intensity, and in dogs with food allergy reduction in pruritus was observed in all dogs tested, 90% showed mild pruritus at the end of the experiment, and 10% no longer manifested pruritus.

In conclusion, the diet based on hydrolyzed soy protein has a positive effect on reducing pruritus and skin lesions in dogs with allergic dermatitis, and in dogs with atopic dermatitis helps reduce skin signs, although dogs continue to show moderate itching.

In **chapter V**, two products were compared, namely a product containing oclacitinib (Apoquel®; Zoetis Inc.) and a product containing methylprednisolone (Medrol®; Zoetis Inc.), both used to control pruritus and decrease clinical signs characteristic for allergic dermatitis.

The research was carried out between June and August 2019, on a group of 20 dogs diagnosed with allergic dermatitis. We mention that the diagnosis of allergic dermatitis was established after the evaluation of the body condition and the clinical signs corroborated with the Polycheck® allergological test.

Next, dogs, diagnosed with allergic dermatitis, were randomly divided into two equal groups of ten animals in each group, as follows: group 1 for methylprednisolone and group 2 for oclacitinib.

After administration of the two preparations, the dogs in both groups were kept under observation for a period of 28 days, being scheduled for control after 7, 14 and 28 days. The control monitored the evolution of pruritus and the presence of clinical signs characteristic of allergic dermatitis. The CADESI index was used to evaluate the effectiveness of the drug treatment.

Following the experiment, it was found that both products tested managed to suppress or reduce the pruritus by more than 50% of the initial value. Oclacitinib was more effective in this aspect both in the first part of the study, up to day 7, and after dose reduction on day 14.

After discontinuation of treatment, on day 28, both groups began to show pruritus, indicating the need to extend the therapeutic protocol to low doses, or to attempt desensitization treatment.

Skin lesions decreased under the action of the two substances: 82.5% for methylprednisolone and 83.1% for oclacitinib after 28 days of treatment.

Chapter VI, "Research on desensitization therapy in dogs with atopic dermatitis", had as main objective the evaluation of the effect of desensitization therapy in dogs with allergic dermatitis, using a desensitization test, marketed by Biocheck Gmb.

For the research, the experimental group consisted of 20 dogs with allergic dermatitis, diagnosed using the Polycheck® test.

The therapeutic solution, used for desensitization, was purchased in veterinary offices, only for animals whose owners agreed with the immunotherapy imposed following the result of the allergic test.

Before undergoing desensitization, the dogs did not receive any medication, any drug treatment being discontinued at least three weeks before the start of desensitization protocol. Also, prior to the desensitization therapy the dogs received a hypoallergenic diet for six weeks to exclude food allergy. Some dogs required resumption of anti-inflammatory drug treatment, which was discontinued in the seventh month of the study.

Throughout the clinical trial, the animals underwent an external antiparasitic protocol each month to control fleas and to rule out clinical manifestations due to their presence.

Animals undergoing desensitization treatment were evaluated at six weeks, then at three, seven and 11 months after starting treatment, by assessing body condition and the intensity of pruritus.

To assess the evolution of pruritus, during the 11 months of the study, the dog owners were responsible for recording its severity, weekly, on a linear analog scale with the following values: 0 (absent pruritus), 1 (mild pruritus, occasional), 2 (constant or intermittent moderate pruritus that does not disturb sleep), 3 (severe, annoying pruritus that disturbs sleep). The SASSAD index was chosen to evaluate the clinical signs.

The desensitization protocol had an effectiveness of 75%, 15 dogs out of the 20 subjected to desensitization treatment, at the end of the study reached the threshold of 25 points evaluated using the SASSAD index. The rest

of the dogs (25%) showed a decrease in the SASSAD score only during the period when desensitization therapy was performed concomitantly with anti-inflammatory medication. Of the five dogs that did not respond to desensitization therapy, three had high reactivity to rye pollen.

Regarding the efficacy of desensitization therapy in reducing skin lesions the efficacy was 66% for the conventional method and 88% for the cluster method.

The decrease in pruritus under the influence of corticosteroid therapy was observed in 100% of dogs and remained at 75% after its cessation.

The effectiveness of conventional therapy in reducing pruritus was 50%, and the effectiveness of the cluster therapy was 38%.

Chapter seven, in this study, the main objective was to use natural compounds, existing in spontaneous flora, in the treatment of allergic dermatitis in dogs and verify their antibacterial and antifungal effect, including the possibility of preparing biological products with positive effects on secondary infections, occurring following the evolution of allergic diseases.

The secondary objectives consisted of the following activities:

- 1) obtaining and characterizing extracts from MO, CV, OS and RP, using HPLC / MS;
- 2) determination of the antioxidant capacity of the extracts from the studied plants;
- 3) testing the in vitro antibacterial and antifungal effect of MO, CV, OS and RP;
- 4) testing of polyphenols identified on nine microbial strains.
- 5) testing the antibacterial effect of the extracts on dogs with allergic dermatitis

The experiments, which included the preparation, chemical analysis and antibacterial and antifungal evaluation of the extracts were performed within the Interdisciplinary Research Platform, within the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Banat "King Mihai I of Romania" in Timisoara.

To perform the experiments, the aerial parts of the plant species studied were collected during the flowering period, from the wild flora located on the outskirts of Timisoara, during 2018. From each species were collected and used about 500 g of fresh material. The working steps aimed, for each plant, after extraction, the characterization of the extracts using HPLC / MS, the determination of the total phenol content and a profile of the main hydroxycinnamic acids (HCA), the in vitro antibacterial and antifungal effect testing of MO, CV, OS and RP including acids: caffeic, ferulic, coumaric and rosemary and the determination of antioxidant capacity.

The plant material was air dried at 25°C and ground using a mincer (BLIXER 3; Retsch Technology GmbH, Haan, Germany) to obtain a fine powder. 2 g of the obtained powder were taken, to which 20 ml of 60% ethanol were added. The preparation obtained was maintained for 60 minutes on a magnetic shaker. Then, the obtained extract was filtered using filter paper and after using 0.45 µm Whatman de nylon membrane filters of 30 mm diameter (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The extract obtained was stored at 2–4°C until the time of testing.

The determination of the total phenol content and the profile of the main hydroxycinnamic acids (HCA) was performed using the Shimadzu chromatograph system, equipped with SPD-10A UV and LC-MS 2010 detector, EC 150/2 NUCLEODUR C18 Gravity SB 150 x 2 mm x 5 µm column .

The Folin - Ciocâlteu test was used to determine the antioxidant capacity.

The evaluation of antimicrobial and antifungal activity was performed using the plate microdilution method (ISO 20776-1: 2019).

The antibacterial activity of the extracts was determined using standard strains belonging to the following species: *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615), *Escherichia coli* (ATCC® 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), *Shigella flexneri* (ATCC® 12022), *Salmonella typhimurium* (ATCC® B 140), *Haemophilus influenzae* (ATCC® 10211), and for the antifungal activity were used strains belonging to the species *Candida albicans* (ATCC® 10231) and *Candida parapsilopsis* (ATCC® 22019).

The bacterial strains used in this study were obtained from the microbial culture collection of the Microbiology Laboratory within the Interdisciplinary Research Platform of the Banat University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "King Mihai I of Romania" in Timișoara. Mention that in the laboratory, ATCC® strains are stored at -50°C.

In our experiments, a 10⁻³ dilution of fresh culture was used to perform the test, an inoculum equivalent to a 0.5 McFarland standard. The ATCC® strains used were revitalized by inoculation and incubation overnight at 37°C in Mueller-Hinton broth (BMH) (Oxoid, CM1135), and subsequently transplanted into BMH agar and

incubated for 24 hours at 37°C. The strains were then diluted to an optical density (OD) of 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 CFU / ml) using BMH broth.

In our experiments, the plates were incubated overnight at 37°C; then the optical density was measured at 540 nm using an ELISA reader (BIORAD PR 1100).

To test the antibacterial effect of the extracts *in vivo*, a number of 30 dogs diagnosed with atopic dermatitis were chosen and divided into three equal groups, group 1 was treated with *M. officinalis* extract, group 2 with *R. pseudoacacia* extract, and lot 3 with a mixture of the two plants. The effectiveness of the extract was monitored by evaluating the total number of germs (NTG) and the number of staphylococci on the skin.

Regarding the chemical composition of the extracts, the following results were obtained:

- the main components of *R. pseudoacacia* extract are: rosmarinic acid, rutin, resveratrol, quercetin and epicatechin.

- the main components of *M. officinalis* extract are: epicatechin, kaempferol, rutin and caffeic acid.

- the main components of *C. varia* extract are: rutin, epicatechin, rosmarinic acid, kaempferol and resveratrol.

- the main components of *O. spinosa* extract are: kaempferol, rosmarinic acid, quercetin and rutin.

The extracts had a colonic inhibitory action as follows: *C. varia* extract had an inhibitory effect on *C. albicans* colonies; *R. pseudoacacia* extract had an effect on the colonies of *S. pyogenes*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*; *M. officinalis* extract had an inhibitory effect on *S. aureus* and *P. aeruginosa* colonies, and *O. spinosa* extract had an effect on *S. pyogenes* colonies.

According to the data obtained, the highest value of total polyphenols was recorded in the sample of *R. pseudoacacia* (16.21 mg GAE/g sample), followed by *C. varia* (15.06 mg GAE/g sample), *O. spinosa* (13.17 mg GAE/g sample) and the lowest value was recorded for *M. officinalis* (11.94 mg GAE/g sample).

Thus, following the administration of *M. officinalis* extract, a reduction in the total number of germs was observed in the samples taken from dogs with dermatitis, from $1160 \times 10^4 \pm 135 \times 10^4$ cfu / ml to $1137 \times 10^4 \pm 207 \times 10^4$ cfu / ml. *R. pseudoacacia* extract reduced the total number of germs from $851 \times 10^4 \pm 101 \times 10^4$ cfu / ml to $826 \times 10^4 \pm 100 \times 10^4$ cfu / ml, and the mixture extract reduced the total number of germs from $838 \times 10^4 \pm 54 \times 10^4$ cfu / ml to $817 \times 10^4 \pm 55 \times 10^4$ cfu / ml.

Regarding the reduction of the total number of staphylococci, the extract of *M. officinalis* had the strongest effect, of decreasing the bacterial load, followed by the extract of the mixture and the extract of *R. pseudoacacia*. Thus, *M. officinalis* extract reduced the number of staphylococci from $667 \times 10^4 \pm 840 \times 10^4$ cfu / ml to $649 \times 10^4 \pm 845 \times 10^4$ cfu / ml, the mixture extract reduced the number of staphylococci from $816 \times 10^4 \pm 454 \times 10^4$ cfu / ml to $802 \times 10^4 \pm 451 \times 10^4$ cfu / ml, and *R. pseudoacacia* extract from $710 \times 10^4 \pm 790 \times 10^4$ cfu / ml to $698 \times 10^4 \pm 790 \times 10^4$ cfu / ml.