Rezumat

Teza de abilitare intitulată ”**Contribuții la diversificarea metodelor microbiologice utilizate în medicina veterinară**” cuprinde cele mai importante realizări personale ale activității științifice, în domeniul microbiologiei veterinare, din anul 2007, anul susținerii tezei de doctorat și până în prezent. Activitatea științifică abordează teme de cercetare actuale și de importanță deosebită în microbiologia veterinară, atât ca studii originale, dar și studii experimentale.

Teza este structurată în trei părți, cu o primă parte în care sunt incluse date legate de educație și formarea profesională. În partea a doua sunt prezentate cele mai importante direcții de cercetare care au reprezentat elementele de bază pentru elaborarea acestei teze.

În capitolul întâi din cea de-a doua parte, denumit ”*Studii privind identificarea, patogenitatea și sensibilitatea la antimicotice a levurilor din genul Candida*”, cuprinde trei subcapitole, care prezintă diverse tehnici de identificare a levurilor, interacțiunea dintre *Candida* și AINS în tubul digestiv și sensibilitatea tulpinilor izolate la antimcotice.

În subcapitolul 1.1., sunt prezentate rezultatele originale ale metodelor de identificare a levurilor genului *Candida* prin metoda fenotipică a galeriilor API, un sistem de referință în identificare. Cele 38 de tulpini izolate și cele șase tulpini standardizate incluse în studiu au fost corect identificate, iar *Candida albicans* a fost cea mai frecvent izolată. Tehnica nu reprezintă o opțiune rapidă, însă este sigură, sensibilitatea metodei fiind de 100%.

Tehnica de identificare fenotipică automată Vitek 2 pe bază de carduri a fost de asemenea utilizată în cadrul cercetărilor. S-au luat în studiu 49 de tulpini, iar identificarea acestora pe baza evaluării a 64 de caractere biochimice a fost precisă, rapidă și sensibilă. Pe lângă speciile de *Candida* identificate, au fost diferențiate și două tulpini de *Cryptococcus*.

Ultimul studiu din acest subcapitol prezintă metoda genotipică PCR-RFLP utilizată pentru identificare. După extracția ADN, s-au folosit primerii universali ITS1 și ITS4 pentru amplificare, rezulând un produs unic de 450-900 bp pentru fiecare specie. Ulterior, pentru identificare, s-a folosit enzima de restricție *BsiS* I, cu apariția a două benzi pentru *C. albicans* și *C. krusei*, respectiv una singură în cazul *C. famata* și *C. kefyr*. Metoda PCR-RFLP a demonstrat o specificitate înaltă, profilul celor 58 de specii identificate fiind similar cu cel al tulpinilor standardizate.

În subcapitolul 1.2., sunt prezentate rezultatele studiului experimental al interacțiunii dintre *Candida albicans* și AINS la nivelul tubului digestiv la cobai. S-au inclus în studiu trei

loturi experimentale și un lot martor negativ, iar leziunile gastrice și intestinale au fost evaluate anatomo și histopatologic. S-a demonstrat că AINS nu au scăzut semnificativ potențialul *Candida albicans* de a coloniza tractul gastro-intestinal al cobailor, iar asocierile dintre AINS și levură au indus leziuni necroinflamatorii mai severe decât cele produse de *Candida albicans* individual, fără a intensifica leziunile mucoasei sau inflamația cauzată de AINS.

În subcapitolul 1.3., sunt comparate patru metode de evaluare a sensibilității la antimicotice a tulpinilor de *Candida*, reprezentate de metoda difuzimetrică, stripurile de determinare a CMI, sistemul difuzimetric multodisc și sistemul automat Vitek 2 compact 15. Sensibilitatea tulpinilor de *Candida spp*. testate a fost bună, pentru fiecare tulpină fiind identificat câte un antimicotic pentru terapie. Metoda stripurilor CMI reprezintă o alternativă modernă la metoda clasică de testare în plăci cu microgodeuri, dar are dezavantajul că oferă rezultate pentru un singur antimicotic. Sistemul automat Vitek 2 reprezintă cea mai bună alternativă la medoda difuzimetrică, deoarece evaluează antifungice moderne și testează concentrația minimă inhibitorie.

Capitolul doi din cea de-a doua parte, denumit ”*Studii privind evaluarea potențialului antimicrobian și al caracterului zoonotic al unor tulpini bacteriene izolate de la animale*”, cuprinde două subcapitole, care prezintă rezultatele testării potențialului antimicrobian a unor derivați de norfloxacin și potențialul zoonotic al bacteriilor rezistante la antibiotice izolate din flora conjunctivală de la câini.

În subcapitolul 2.1., este evaluat calitativ și cantitativ potențialul antimicrobian al unor derivați de fluorochinolone pe un set de tulpini bacteriene și levurice standardizate. Evaluarea calitativă inițială a arătat că noii compuși sunt similari cu norfloxacina prin faptul că sunt mai activi împotriva bacteriilor Gram-negative, iar testarea cantitativă a activității antibacteriene a arătat că, în general, compușii au o activitate antibacteriană directă mai redusă, comparativ cu norfloxacina.

În subcapitolul 2.2., sunt prezentate rezultatele unui studiu original efectuat pe 50 de câini din rasa Saint Bernard. S-a evaluat flora microbiană de la nivelul sacului conjunctival, rezistența acesteia la 15 antibiotice, precum și potențialul zoonotic. Au fost identificate predominant bacterii Gram-pozitive, asocierile cu bacteriile Gram-negative fiind întâlnite doar la câinii cu istoric de tratament. Tulpinile izolate au fost sensibile la florochinolone și rezistente la kanamicin, cloramfenicol și bacitracin.

Capitolul trei din cea de-a doua parte, denumit ”*Studii experimentale privind eficiența unor extracte naturale în prevenirea enteritei necrotice produse de Clostidium perfringens la*

puii broiler", prezintă studiul experimental al eficienței unor extracte vegetale în limitarea severității leziunilor de enterită necrotică indusă de infecția cu *Clostridium perfringens*. S-a lucrat pe un număr de 12 loturi a câte 20 de pui fiecare, nouă loturi infectate și tratate cu extractul administrat în furaj, un lot tratat cu antibiotic, un lot martor negativ și unul martor pozitiv. Produsele evaluate în studiu au reușit să protejeze mucoasa intestinală împotriva expunerii la *Clostridium perfringens*, reducând nivelul leziunilor intestinale brute și colonizarea bacteriană, la niveluri similare comparativ cu tratamentul cu antibiotice.

În cea de-a treia parte a tezei sunt prezentate planurile de dezvoltare ştiinţifică, profesională şi academică. Planul de dezvoltare a carierei ştiinţifice vizează creşterea calităţii ştiinţifice, a publicațiilor în reviste de prestigiu, a recunoașterii și vizibilității naționale și internaționale. Activitatea de cercetare din următorii ani se va axa pe evaluarea potențialul antibacterian al unor compuși inovativi, implicarea unor tulpini bacteriene de la câine și pisică în îmbolnăvirile produse la om (caracterul zoonotic și antropozoonotic) și diagnosticul mastitelor produse de genul *Mycoplasma* la vacă, oaie și capră prin metoda multiplex PCR, precum și identificarea speciilor implicate în etiologia bolii.

Pentru îndeplinirea acestor obiective este esențială munca în echipă, un element ce a stat la baza formării și dezvoltării mele. Cele mai importante realizări se datorează colectivului, echipei frumoase de la disciplină, facultate și universitate, iar viitorul meu de cadru didactic matur, cercetător și conducător de doctorat, nu poate fi imaginat fără susținerea și colegilor și colaborările interuniversitare.

Summary

The habilitation thesis entitled "*Contributions to the diversification of microbiological methods used in veterinary medicine*" includes the most important personal achievements of scientific activity in the field of veterinary microbiology since 2007, the year of doctoral thesis defense. The scientific activity addresses current research topics of great importance in veterinary microbiology, both as original and experimental studies.

The thesis is structured in three parts, with a first part which includes data related to education and training. The second part presents the most important research directions that were the basic elements for the elaboration of this thesis.

The first chapter of the second part, entitled "*Studies on the identification, pathogenicity and susceptibility to antifungals of yeasts of the genus Candida*", includes three subchapters, which present various techniques for yeasts identification, the interaction between *Candida* and NSAIDs in the digestive tract and the sensitivity of isolated strains to antifungals.

Subchapter 1.1. presents the original results of the methods for identifying yeasts of the genus *Candida* by the phenotypic method of API galleries, a reference system in identification. The 38 isolated strains and six standardized strains included in the study were correctly identified, and *Candida albicans* was the most frequently isolated. The technique is not a quick option, but it is safe, the sensitivity of the method being 100%.

The Vitek 2 card-based automatic phenotypic identification technique was also used in the research. 49 strains were included in the study, and their identification based on the evaluation of 64 biochemical characters was accurate, fast and sensitive. In addition to the identified *Candida* species, two strains of *Cryptococcus* were also differentiated.

The last study in this subchapter presents the PCR-RFLP genotypic method used for identification. After DNA extraction, the universal primers ITS1 and ITS4 were used for amplification, resulting in a unique product of 450-900 bp for each species. Subsequently, for identification, the restriction enzyme *BsiS* I was used, with the appearance of two bands for *C. albicans* and *C. krusei*, respectively one in the case of *C. famata* and *C. kefyr*. The PCR-RFLP method demonstrated a high specificity, the profile of the 58 identified species being similar to that of the standardized strains.

In subchapter 1.2. the results of the experimental study of the interaction between *Candida albicans* and NSAIDs in the digestive tract in guinea pigs are presented. Three

experimental groups and one negative control group were included in the study, and gastric and intestinal lesions were evaluated anatomically and histopathologically. NSAIDs have been shown not to significantly decrease the potential of *Candida albicans* to colonize the gastrointestinal tract of guinea pigs, and the associations between NSAIDs and yeast induced more severe necroinflammatory lesions than those produced by *Candida albicans* individually, without intensifying mucosal lesions or inflammation caused by AINS.

In subchapter 1.3. four methods, represented by the diffusimetric method, the CMI determination strips, the multodisc diffusimetric system and the Vitek 2 compact automatic system 15, for assessing the antifungal susceptibility of *Candida* strains are compared. The sensitivity of the *Candida* spp. strains tested was good, with an antifungal for therapy being identified for each strain. The MIC strip method is a modern alternative to the classic method of microtiter plates, but has the disadvantage of only evaluating a single antifungal. The Vitek 2 automatic system is the best alternative to the disk diffusion test, as it evaluates modern antifungals and tests the minimum inhibitory concentration.

Chapter two of the second part, entitled "*Studies on the evaluation of the antimicrobial potential and zoonotic character of bacterial strains isolated from animals*", contains two subchapters, which present the results of testing the antimicrobial potential of some norfloxacin derivatives and the zoonotic potential antibiotic-resistant bacteria isolated from the conjunctival flora of dogs.

In subchapter 2.1., the antimicrobial potential of some fluoroquinolone derivatives on a set of standardized bacterial and yeast strains is evaluated qualitatively and quantitatively. Initial qualitative evaluation showed that the new compounds are similar to norfloxacin in that they are more active against Gram-negative bacteria, and quantitative testing of antibacterial activity showed that, in general, the compounds have reduced direct antibacterial activity compared to norfloxacin.

In subchapter 2.2., the results of an original study performed on 50 Saint Bernard dogs are presented. The microbial flora from the conjunctival sac, its resistance to 15 antibiotics, as well as the zoonotic potential were evaluated. Gram-positive bacteria were predominantly identified, with associations with Gram-negative bacteria being found only in dogs with a treatment history. The isolated strains were sensitive to fluoroquinolones and resistant to kanamycin, chloramphenicol and bacitracin.

Chapter three of the second part, entitled "*Experimental studies on the effectiveness of natural extracts in preventing necrotic enteritis caused by Clostidium perfringens in broiler chickens*", presents the experimental study of the effectiveness of plant extracts in limiting the

severity of infection-induced necrotic enteritis lesions with *Clostridium perfringens*. The study was performed on 12 groups of 20 chickens each, nine groups infected and treated with the extract administered in feed, one batch treated with antibiotics, one negative control group and one positive control. The products evaluated in the study were able to protect the intestinal mucosa against exposure to *Clostridium perfringens*, reducing the level of raw intestinal lesions and bacterial colonization, at similar levels compared to antibiotic treatment.

The third part of the thesis presents the plans for scientific, professional and academic development. The scientific career development plan aims to increase the scientific quality, publications in prestigious journals, national and international recognition and visibility. Research in the coming years will focus on evaluating the antibacterial potential of innovative compounds, the involvement of bacterial strains in dogs and cats in human diseases (zooanthroponotic) and the diagnosis of mastitis caused by *Mycoplasma* spp. in cows, sheep and goat by the multiplex PCR method, as well as the identification of the species involved in the etiology of the disease.

In order to achieve these objectives, teamwork is essential, an element that was the basis of my training and development. The most important achievements are due to the team, the beautiful team from the discipline, faculty and university, and my future as a mature teacher, researcher and doctoral supervisor, cannot be imagined without the support of colleagues and interuniversity collaborations.