

Romvac Company Dezvoltare continuă în medicina veterinară și umană

Romvac Company Continuous development in veterinary and human medicine

Dr. Viorica Chiurciu

Director general
Președinte Consiliu de Administrație Romvac Company S.A.

Cuvinte cheie: Romvac, dezvoltare, medicină, prezentare

Key words: Romvac, development, medicine, presentation

Romvac, eficiență maximă indiferent de circumstanțe

Pandemia de coronavirus a generat efecte majore asupra mediului de afaceri. Cu toate acestea, compania Romvac a funcționat și continuă să funcționeze la capacitate maximă, așa cum a făcut mereu, în ciuda nenumăratelor provocări care au marcat domeniul medicinei de-a lungul timpului, plecând de la restricțiile și reglementările impuse de normele europene și până la piața extrem de competitivă prin prezența covârșitoare a produselor de import.

Toate acestea vin pe fondul declinului zoo-economiei din România, cu evoluția pestei porcine africane, a gripei aviare, a noilor reglementări ce privesc creșterea animalelor în regim gospodăresc, a depopulării satelor, a scăderii numărului de tineri din mediul rural care vor să dezvolte afaceri în domeniul zootehnic, a dificultății de accesare a fondurilor europene și a emigrării unui număr mare de tineri în spațiul european.

Drept urmare, în ultimii ani, compania Romvac și-a desfășurat activitatea într-un mediu destul de ostil, în care, totuși, a mers mai departe, funcționând și chiar dezvoltându-se în permanență.

Cu toate că și la ora actuală, circumstanțele sunt și mai puțin fericite, din cauza pandemiei care a lovit întreaga lume și care afectează existența tuturor într-un mod inedit, Compania Romvac a arătat tuturor, încă o dată, că este o corabie care poate face față

furtunilor și la reușita acestui fapt, a contribuit strategia noastră care a mizat pe diversitatea gamei noastre de produse, de la cele de uz veterinar și agro, până la cele de uz uman.



Dr. Viorica Chiurciu, doctor în științe medicale veterinare, C.S. I, medic terapeut

În plus, Romvac nu este restricționat doar de câteva specii, deoarece are în gamă aproape **300 de produse biologice** și medicamente care se adresează tuturor speciilor de animale crescute în România.

Mai mult, strategia vizează și diversificarea și creșterea vânzărilor pentru produsele de uz uman, din gama *Imunoinstant*, suplimente alimentare cu imunoglobuline Y specifice, adică anticorpi care ajută la sporirea imunității organismului, mai ales în fața unor situații extrem de solicitante pentru sănătatea noastră, cum sunt cele actuale.

În ciuda noilor circumstanțe s-a decis continuarea activității companiei fără întreruperi, deoarece, datorită specificului

acesteia, a fost extrem de important ca Romvac să își aducă aportul la bunul mers al lucrurilor din domeniul produselor medicinale, evitând întreruperea fluxului de produse și servicii, atât de necesare, chiar cruciale astăzi, pentru sănătatea oamenilor și a animalelor.

Astfel, deoarece de vaccinurile și de medicamentele Romvac depinde în bună măsură, sănătatea animalelor, și deoarece crescătorii de animale știu că de aproape **5 decenii**, se pot baza pe aceste produse, compania își desfășoară, în continuare, activitatea de producție și distribuție, depunând toate eforturile necesare pentru asigurarea solicitărilor din piață, care au atins cote deosebite mai ales la în lunile martie - mai, în primul rând, datorită gamei de produse pentru dezinfectie.

Încă de la debutul pandemiei, Romvac a răspuns cererii pieței, cu dezinfectanții *Pursept* și *Decontaminol*, produse de cea mai bună calitate și care sunt autorizate sanitar-veterinar de mai bine de 14 ani. Mai mult, pentru ca toate produsele să ajungă la destinație, rețeaua națională de distribuție a companiei asigură în continuare, necesarul solicitat pe piață.



Dr. Viorica Chiurciu, președintele consiliului de administrație al Romvac Company S.A.

Din aceste considerente care țin de sănătatea oamenilor și a animalelor, Romvac a ales să se implice în lupta impusă firescului vieții, de restricțiile bolii, acordând, însă, în permanență toată atenția pentru eficiența în protejarea sănătății salariaților și a clienților. În acest sens, se face în permanență termometria înainte de intrarea în unitate, se asigură dezinfectia la intrarea și ieșirea în și din unitate, s-au asigurat culoarele de dezinfectie, măștile de protecție și se respectă distanțarea fizică între angajați etc.

Managementul de calitate formează angajați profesioniști

Situația pandemică actuală este un neprevăzut cu efecte majore asupra vieții oamenilor și de aceea se impune ca toată lumea să înțeleagă că este nevoie de seriozitate și de respectarea regulilor care sunt făcute pentru binele și siguranța noastră, în sensul limitării răspândirii coronavirusului. Încă de la început, Romvac a mizat pe disciplină și seriozitate, două coordonate care au fost însușite de către angajați.

Strategia managerială a pornit de la considerentul că, indiferent de circumstanțe și de piața pe care activează o firmă, întotdeauna vor exista anumite constante, precum profesionalismul și încrederea pe verticală și orizontală, de care depinde existența și trăinicia afacerii respective



Dr. Viorica Chiurciu, director general Romvac Company S.A.

Numai așa poate funcționa un ansamblu, o firmă al cărui scop principal este utilitatea produsului și a muncii întregului colectiv,

obținută prin profesionalism, inovație, seriozitate, stabilitate în timp și siguranță.

Așa cum s-a demonstrat mai ales în plină pandemie, faptul că fiecare angajat Romvac a fost bine instruit și a știut exact ce are de făcut, a contat asigurând desfășurarea activității companie fără nicio secundă de interferențe și întreruperi nedorite.

Romvac și proiectele în medicina veterinară

În ceea ce privește medicina veterinară, Romvac este implicat în **3 programe de cercetare externe** prin care se dorește obținerea a **18 produse noi**, respectiv suplimente naturale bioactive obținute din produse secundare din lapte, ouă și din produsele apicole, destinate persoanelor cu nevoi speciale. Actualmente se fac cercetări pentru **bioconversia lactozei** din zer, subprodus regenerabil avantajos, în produse cu valoare adăugată, dar și cercetări privind **obținerea anticorpilor policlonali IgY** și utilizarea lor în prevenirea și tratarea unor boli la taurine și porci care au ca scop reducerea pierderilor și creșterea siguranței privind produsele alimentare de origine animală.

Mai mult, prin cele **2 programe de cercetare interne**, Romvac urmărește să obțină în total, **30 de produse noi**, pe unele dintre acestea lansându-le deja, pe piață. De asemenea, se fac cercetări privind obținerea de biopreparate, aditivi furajeri, alimentari și substanțe fitoterapeutice, precum și alte cercetări privind obținerea de produse medicinale veterinare destinate zootehniei.

În acest sens, portofoliul Romvac s-a îmbogățit cu produse pe bază de plante, precum:

- **Dermacicatrat** - unguent cu efect cicatrizant recomandat în escare, eczeme, dermatite de contact și arsuri;
- **Papilrom** - gel pentru papilomatoză care duce la desicarea și dispariția papiloamelor, la orice specie de animale;
- **Five Herbs** - șampon antiparazitar pentru câini;

- **Rom-Enteroprotect** - pastă orală de uz veterinar, adjuvant în enteropatiile de natură infecțioasă, la tineret, pentru cai, rumegătoare, porci, câini și pisici;
- **Ecvipur** – șampon pe bază de plante, pentru pelaj închis și deschis, la cai și
- **Herbal-MycoDerm** - gel antiinflamator și antimicotic.

De asemenea, în cadrul programului **Green Vet**, au fost lansate produsele:

- **Mastitrat Gel**,
- **Ugeroclin S** și
- **Ugeroclin G**,

un pachet de produse care au ca scop să limiteze cantitatea de antibiotice utilizate în prevenirea și tratamentul unor afecțiuni ale glandei mamare la rumegătoare, prin introducerea în uz a unor derivate vegetale (infuzii, decocturi, uleiuri volatile) cu acțiune antiinflamatoare, antimicrobiană și antivirală, demonstrate experimental de către Romvac.

Romvac a omologat vaccinul **RomvacBlue 4** contra bolii limbii albastre la rumegătoare.

Tot la noutăți, este inclus și vaccinul inactivat contra **rabiei**, dar și setul de diagnostic pentru **tuberculina aviară**.

În portofoliul de produse Romvac, au mai apărut:

- **Prodigest**, soluție acidifiantă adjuvantă;
- **Levorom**, pulbere hidrosolubilă antimicrobiană cu levamisol clorhidrat;
- **Roiactiv**, pulbere și comprimate cu ronidazol, având efect antimicrobian.

Romvac are în perspectivă și dezvoltarea de produse medicinale veterinare care să ofere o alternativă la problema principală de combatere a antibioretistenței la animale și om, prin utilizarea de substanțe active care să aibă o perioadă de așteptare scurtă și care să nu inducă fenomenul de rezistență antimicrobiană.

În acest sens, se are în vedere dezvoltarea de produse pe bază de **imunoglobuline Y**, pentru prevenirea și combaterea infecțiilor bacteriene și virale la animale.

BIO-Ofensiva Romvac prin valorificarea deșeurilor

Utilizarea excesivă a produselor chimice pe întregul lanț trofic - agricultură, zootehnie, industrie alimentară a avut, în multe cazuri, urmări din cele mai nedorite și a generat dezechilibre majore. Aceste aspecte au determinat orientarea cercetărilor către elaborarea unor produse „prietenoase” cu natura ca întregul: sol – aer – apă – plantă – animal - om.

Mergând pe ideea obținerii unor produse **BIO** prin utilizarea deșeurilor din alte domenii ale industriei alimentare (ex. zer, melasă), specialiștii Romvac au creat, în ultimii ani, mai multe produse naturale pe bază de culturi bacteriene benefice și proteine bioactive din zer, cu rol probiotic, imuno-modulator, bio-conservant sau bio-fertilizator:

Bioenterom Z este un supliment alimentar probiotic și detoxifiant care conține un amestec în părți egale de bacterii probiotice vii, *Enterococcus faecium* și *Lactobacillus plantarum*.

Biolactorom este un supliment alimentar probiotic pentru stabilizarea florei intestinale care conține germeni vii de *Lactobacillus plantarum* tulpina NCIMB 11974.

Ambele tulpini provin din colecția britanică și sunt aprobate de Uniunea Europeană.

Produsele se administrează în primele zile de viață la toate speciile de păsări, mamifere și pești de acvacultură în scopul colonizării tubului digestiv cu o microfloră benefică, care blochează receptorii celulari ai epitelului intestinal, împiedicând, astfel, fixarea germeilor patogeni (*E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Clostridium* etc.). Se recomandă administrarea probioticelor și în cazul apariției tulburărilor digestive (enterite diareice) de orice natură, singure sau în asociere cu antibioterapia.

Bioromsil este un auxiliar tehnologic pentru însilozarea plantelor furajere. Produsul este un amestec în părți egale de culturi bacteriene conținând germeni vii de *Enterococcus faecium* și *Lactobacillus plantarum*. Se utilizează pentru însilozarea plantelor furajere atât pentru cele cu conținut

mare de zaharuri (porumb, graminee), cât și pentru cele cu conținut mare de azot (leguminoase). Folosirea sa asigură obținerea unui siloz de bună calitate, cu calități organoleptice crescute, ce îi îmbunătățesc palabilitatea și digestibilitatea. Produsul duce la scăderea rapidă a pH-ului silozului prin intensificarea fermentației acidolactice, inhibând dezvoltarea florei de putrefacție și a mucegaiurilor și stopând fermentația butirică care alterează silozul. Bioromsil este un produs biologic natural, apatogen și atoxigen pentru animale, nu poluează mediul, nu are efecte adverse asupra lanțului trofic și ingestia sa asigură prezența florei probiotice în intestin pe tot timpul administrării.

Romimunoactiv S este un supliment alimentar imunomodulator. Produsul este o soluție concentrată (de minimum 4 ori mai mult decât în colostru) de proteine bioactive din zer, cu acțiune antimicrobiană și imunomodulatoare (IgG, IgM, IgA, α-lactalbumină, β-lactoglobulină, lactoferină, lizozim, limfokine etc.). Produsul se administrează cu predilecție în primele 48 de ore de la fătare, pe cale orală, diluat în lapte, cu scopul creșterii imunității pasive la nou-născuții tuturor speciilor mamifere. În cazul apariției enteritelor de orice natură, datorită acțiunii sale antimicrobiene marcante față de germeni patogeni (*E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Clostridium* etc.) poate fi utilizat ca un veritabil antibiotic natural pe toată perioada de creștere.

Agricultură ecologică cu Rom-Agrobiofertil NP, îngrășământ 100% ecologic pe bază de culturi bacteriene

Pentru reducerea impactului chimizării și pentru promovarea unei agriculturi ecologice durabile, specialiștii de la Romvac au creat un **îngrășământ 100% ecologic**, utilizând 3 bacterii benefice existente în microflora solului, respectiv: *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter chroococcum* și *Bacillus megaterium*.

Biocide eficiente, avizate conform legii de peste 14 ani

Romvac produce de mai bine de **14 ani**, dezinfectanții de suprafețe **Pursept** și

Decontaminol, produse cu efect virucid, bactericid și fungicide.

Ca urmare a re tehnologizării și prin mărirea capacității de producție, în cazul biocidului **Pursept**, efectele favorabile asupra prețului de vânzare a acestui produs au fost vizibile imediat. De câteva luni, Romvac a lansat și două soluții pentru dezinfectia mânilor, respectiv **Ecovir** și **Propol Fresh**.

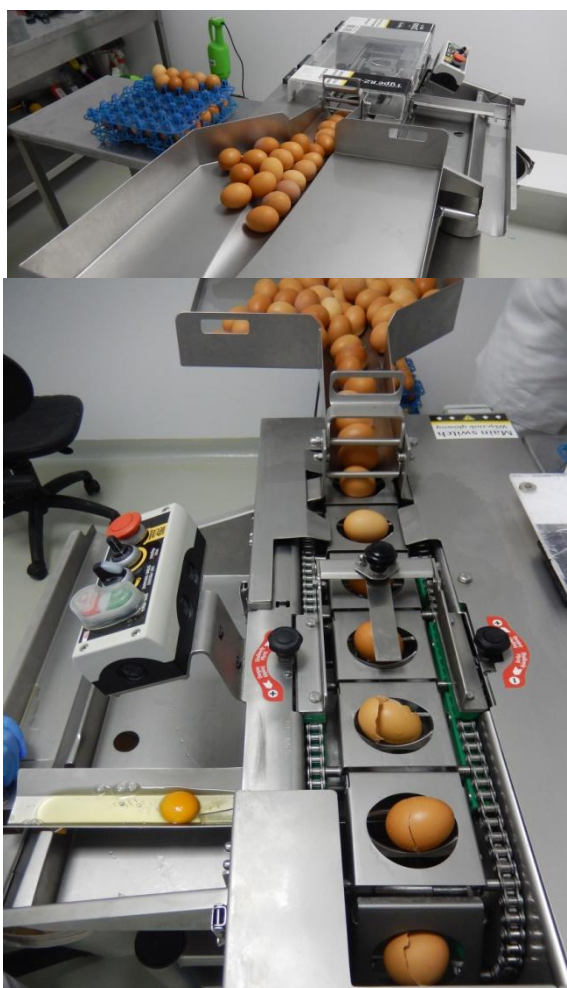


Romvac, în lupta împotriva rezistenței la antibiotice

Ținând cont de contextul global care prezintă o realitate foarte dură pentru sănătate prin rezistența bacteriilor la antibiotice, Romvac a lansat în anul 2014 și a dezvoltat considerabil, **oul hiperimun PC2** și gama de produse **Imunoinstant** pentru uz uman, producând la ora actuală, **anticorpi naturali IgY** utilizați ca adjuvant în tratarea specifică a infecțiilor date de **30 de tulpini bacteriene** rezistente la antibiotice, printre care: *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile* – corpi bacterieni și *anatoxina*, *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus grup B*, *Candida glabrata* și *Candida krusei*.

În ultimul timp, Romvac a sporit numărul anticorpilor IgY contra diferiților agenți patogeni față de care produsele din gama **Imunoinstant** prezintă acțiune directă și specifică. De exemplu, soluția buvabilă de **Imunoinstant Multiplu** conține anticorpi împotriva a 18 antigene.

Restul de până la 30, se regăsește în soluțiile monovalente, precum **Imunoinstant anti-Acinetobacter baumannii**, **Imunoinstant anti-Staphylococcus epidermidis**, **Imunoinstant anti-Borelioză**, **Imunoinstant anti-Citrobacter**, **Imunoinstant anti-Herpes**, **Imunoinstant anti-HPV**, **Imunoinstant anti-Streptococcus pneumoniae**, **Imunoinstant anti-Virusul Varicelo-Zosterian**, **Imunoinstant anti-Enterobacter aerogenes**, **Imunoinstant anti-Mycobacterium**.



Rezultatele obținute în urma terapiei cu IgY sunt uimitoare: vindecarea clinică este rapidă, iar testările bacteriologice cu rezultat negativ confirmă eliminarea agentului patogen din organism. În plus, au fost vindecați pacienți cu infecții bacteriene sau psoriazis vechi de ani de zile și a fost adusă o contribuție considerabilă, la îmbunătățirea stării de sănătate a copiilor bolnavi de epidermoliză buloasă.

Perenitatea Companiei Romvac, chiar și în noul context apărut, se datorează și datorită produselor și serviciilor pe care le oferă și care deservește direct sau adiacent, una din nevoile de bază ale omului, respectiv sănătatea.

Romvac a anticipat și a răspuns mereu acestei nevoi, prin diversificarea și adaptarea gamei de produse. Astfel, în gama Imunoinstant de produse de uz uman, au fost introduse **noi soluții monovalente de anticorpi IgY** specifici împotriva *Mycobacterium spp.* care poate afecta tractul respirator și, mai ales, aparatul pulmonar.

De asemenea, Romvac produce și **Imunoinstant anti-Enterobacter aerogenes și Imunoinstant anti-Providencia stuartii** care pot afecta orice componentă a sistemului respirator, inclusiv plămâni. Recent, în aceeași gamă a mai fost introdus și **suplimentul alimentar Instant Yolk**, pulberea liofilizată numai din gălbenuș de ou hiperimun, în care se regăsește o cantitate dublă de imunoglobuline specifice pentru susținerea sistemului imunitar, mai ales în perioadele dificile pentru sănătatea omului.

Mai mult, a apărut și **pasta de dinți cu imunoglobuline Y, OvoDent**, pentru sănătatea orală, deoarece aceasta conține ingrediente naturale care asigură curățarea dinților și eliminarea plăcii bacteriene și a petelor, prevenind apariția cariilor.

Romvac și perspectivele în medicina umană

În cel mai scurt timp, în gama Imunoinstant vor apărea și:

- colirele pentru infecțiile oftalmice; **Immuno Gyn cremă**
- **gel cu imunoglobulină Y anti-HPV-9** destinate aplicării locale la nivelul leziunilor tegumentului zonei genitale externe, atât la femei, cât și la bărbați;
- **Immuno Herpestop** cremă topică pentru tratamentul leziunilor determinate de infecția cu virusul *Herpes simplex*;
- **Immuno Multi Gel** produs bioactiv formulat special pentru a susține activ, stadiile de reconstrucție ale pielii;

- **MYCorium cremă** reconstructivă recomandată pentru unghii fragile, deshidratate, casante sau neregulate și pentru pielea din jurul acestora.



Mai mult de atât, va fi lansată cât de curând, gama de produse cosmetice de lux, **Luxury Egg Cosmetics**, pentru fiecare etapă a ritualului de îngrijire.

Colecția conține produse pe bază de imunoglobuline Y, pentru curățare și demachiere, exfoliere, tonifiere și hidratare și acționează activ în tratarea și ameliorarea diferitelor afecțiuni cutanate specifice, precum: acneea, foliculita, dermatita atopică și uscăciunea și deshidratarea pielii.

Certificări

De-a lungul anilor, Compania Romvac a investit enorm în re tehnologizare, obținând **certificarea SMI** (Sistemul de Management Integrat), care cuprinde:

- Managementul Calității ISO 9001,
- Sistemul de Management al Mediului ISO 14001 și
- Sistemul de Sănătate și Securitate Ocupațională OHSAS 18001:2004.

În anul 2004, Compania Romvac a primit din partea Autorității Naționale Sanitare Veterinare, confirmarea încadrării în normele de bună practică de fabricație (G.M.P.), certificatele obținute fiind confirmate (reexaminare) în 2007, 2009, 2011, 2013, 2016 și 2019.

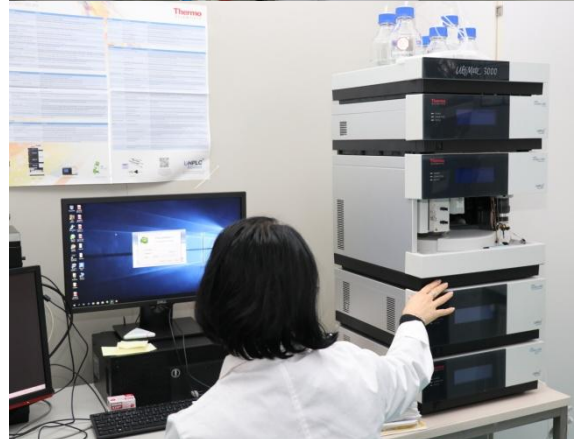
Romvac Company S.A. este unitate atestată pentru efectuarea activității de Cercetare Dezvoltare în domeniul Mediciniei Veterinare, **unitatea aflându-se în coordonarea**

științifică a **Academiei de Științe Agricole și Silvice**.

Romvac pe piața internațională

De câțiva ani, Compania Romvac exportă produsele sale în țări precum:

- Iordania,
- Grecia,
- Anglia,
- Bulgaria,
- Lituania,
- Niger,
- Albania,
- Kosovo,
- Malta,
- Spania,
- Macedonia,
- Georgia,
- Kuweit,
- Republica Moldova,
- Olanda,
- Irlanda,
- Ungaria,
- Irak,
- Iran,
- Italia și
- Qatar.



PRODUCTS FOR VETERINARY USE

Romvac Company S.A. manufactures:

60 biological products (vaccines, imaging substances and diagnosis kits)

200 medicinal products for veterinary use: general tonics and rehydration products, vitamin-mineral premixes, growth promoters and vitamins, antimicrobials and antimycotics, antiparasitic drugs, products for disinfection, disinsection and pest control, local anti-infectious, healing, desensitizing and antitoxic products

natural products based on beneficial bacterial cultures and whey bioactive proteins with probiotic, immunomodulatory, bioconservative or bio-fertilizing effect



www.romvac.ro



www.imunoinstant.ro

IgY PRODUCTS FOR HUMANS

Romvac Company S.A. produces:

natural IgY antibodies that are used in the **specific treatment of infections** caused by **30 antibiotic-resistant bacterial strains**: *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile* – bacterial bodies and anatoxin, *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus group B*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* etc.



Gama de biocide și dezinfectanți Romvac

Dezinfectanți pentru suprafețe și obiecte

Pursept - biocid, tablete efervescente cu dicloroizocianurat de sodiu

Decontaminol - biocid, soluție concentrată cu clorură de alchilbenzildimetilamoniu

Dezinfectanți pentru mâini

Ecovir - biocid, gel cu alcool etilic 96°

Propol Fresh - soluție și gel cu alcool etilic 96°

Romvac
Company

șos. Centurii, nr. 7, Voluntari, jud. Ilfov
romvac@romvac.ro, www.romvac.ro
021 350 31 09

▼ *Educație continuă / Continuous education*

Introducere în rezistența la antimicrobienele utilizate în medicina veterinară

Introduction to antimicrobial resistance used in veterinary medicine

Romeo Teodor Cristina, Răzvan Florin Moruzi, Eugenia Dumitrescu, Florin Muselin,
Alexandru Octavian Doma

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

rtcristina@yahoo.com

Cuvinte cheie: *antiinfecțioase,*
Keywords: *anti-infective,*

Rezumat

Prezenta lucrare este un mini-curs conceput ca o readucere la zi cu aplicație pentru medicii veterinari practicieni a principalelor aspecte legate de rezistența la substanțele antimicrobiene. Ca surse bibliografice selectate, la redactarea acestui articol au fost citate integral sau parțial pasaje din cursurile postate de primul autor pe resursele net-ului pe această temă. În primul articol se face o introducerea cititorului în topicul rezistenței la antiinfecțioase, cu prezentarea principiilor date legate de: definiția fenomenului, evoluția, clasificarea grupului antiinfecțios (antibiotice, sulfamide, antifungice),

Abstract

This article is conceived as a mini-course designed as an update and application for veterinarians practicing, the main aspects of antimicrobial resistance being revealed. As selected bibliographic sources, when writing this article, passages from the courses posted by the first author on the resources of the net on this topic were cited in full or in part. The first article introduces the reader in the topic of anti-infective resistance, with the presentation of the main data related to: the definition of the phenomenon, the evolution, and classification of the anti-infective group (antibiotics, sulfamides, antifungals).

Rezistența la antimicrobiene (RAM) reprezintă capacitatea microorganismelor de a deveni rezistente la efectul farmaconilor antimicrobieni, în special la antibiotice, dar și la antivirale, antifungice și antiprotozoarice, substanțe la care aceste microorganisme au fost sensibile anterior (1, 2, 3).

Utilizarea pe scară largă a substanțelor antimicrobiene atât în medicina umană, cât și în medicina veterinară s-a accentuat, ceea ce a dus în ultimii ani la o accelerare în apariția și răspândirea microorganismelor rezistente (9).

Rezistența la antimicrobiene reprezintă o problemă globală, cu impact direct asupra sănătății animalelor și oamenilor, fiind considerată un fenomen cu risc zoonotic (17, 18, 19).

Cele mai importante elemente care au stimulat RAM sunt:

1. Cererea crescută pentru produse alimentare.
2. Modificarile sistemelor de producție animală.
3. Schimbarea tendințelor în comerțul cu animale.
4. Creșterea circulației animalelor și a produselor specifice.
5. 5. "Specificitatea" creșterii animalelor = Lipsa de coerență la nivel mondial (3, 4, 5, 6, 7).

Din nefericire circulația medicamentelor a.u.v. se face haotic, aproape oricine poate cumpăra și administra medicamente fără consult în prealabil, și fără rețetă. Problema e importantă mai ales în cazul: antibioticelor, sulfamidelor, antifungicelor, substanțelor antiparazitare, cu remanență considerată mare în corpul animalelor (8).

În Uniunea Europeană se estimează că, în fiecare an, infecțiile rezistente la medicamente conduc la decesul a cel puțin 25.000 de pacienți și generează costuri de 1,5 miliarde EURO, și aproximativ 700.000 de decese în lume, și ar putea cauza mai multe decese decât cancerul până în 2050. Prin urmare, rezistența la antimicrobiene (RAM) a devenit o prioritate pentru Comisia Europeană, astfel în Noiembrie 2011 aceasta a lansat un plan de acțiune pe cinci ani, menit să abordeze riscurile tot mai mari prezentate de RAM. Planul de acțiune se bazează pe o abordare holistică, în conformitate cu inițiativa „*One health*” (10).

Planul de acțiune acoperă șapte domenii și stabilește douăsprezece măsuri specifice care trebuie luate în domeniul sănătății umane și/sau veterinare (10).

În România încă se fac eforturi pentru colectarea datelor primare ale rezistenței la animale pentru racordarea la sistemele oficiale de monitorizare a fenomenului, prezente de peste un deceniu în Europa (prezența oficială a țării noastre a fost semnalată într-un studiu EU în 2009) (6, 20, 21).

Țelul unei terapii antimicrobiene eficiente trebuie să fie în primul rând acela de a atinge niveluri eficiente ale concentrațiilor de medicament la locul infecției, în același timp evitând concentrațiile toxice din plasmă și organe.

Orice decizie terapeutică trebuie luată ținând cont de "triunghiul terapeutic": medicament, agent patogen și pacient (11).

1. Definiții, evoluție și clasificarea grupului antiinfecțios

Termenul de *antimicrobial* este definit ca fiind orice substanță sintetică sau naturală care distruge sau împiedică dezvoltarea microorganismelor, de exemplu bacteriile, virusurile sau ciupercile, precum și protozoarele (9, 12).

Medicamentele antimicrobiene sunt concepute să exploateze diferențele de structură sau funcție dintre gazdă și agentul infecțios. Părintele chimioterapiei moderne a

fost Paul Ehrlich, un elev al lui Robert Koch, care și-a dedicat întreaga sa carieră pentru a descoperi substanțe care posedă o toxicitate selectivă, astfel încât acestea ar putea acționa ca așa-numitele „*gloanțe magice*” în lupta împotriva bolilor infecțioase (13).

Termenul de *antibiotic* este definit ca o substanță cu greutate moleculară mică, produsă de un microorganism, care la concentrații scăzute are efect static sau care poate distruge alte microorganisme (13).

Altfel spus, un antibiotic este un metabolit biologic activ produs de către germeii microscopici, ca mijloc de luptă cu concurenții lor biologici (14).

În contrast, cuvântul antimicrobial are o definiție mai largă decât termenul de antibiotic și include orice substanță de origine naturală, semisintetică sau sintetică care omoară sau inhibă creșterea unui microorganism, și care provoacă o ușoară sau chiar nici o deteriorare a gazdei (13).

Un agent *antifungic* este definit ca o substanță care elimină selectiv fungii patogeni pentru gazdă, cu toxicitate minimă pentru aceasta (15).

Dezvoltarea agenților antifungici a fost devansată de cea a agenților antibacterieni, fiind o consecință previzibilă a structurii celulare a organismelor implicate.

Bacteriile sunt celule procariote, deci simple și, prin urmare, oferă numeroase ținte structurale și metabolice care diferă de cele ale gazdei umane. În schimb, celula fungică este eucariotă, astfel majoritatea agenților cu toxicitate pentru fungi sunt de asemenea toxice pentru gazdă (15).

Primul antibiotic descoperit a fost penicilina, de către Fleming în 1921, iar primele studii clinice au fost realizate după 1941, când Chain și Florey au izolat forma pură (penicilina G cristalizată), vezi Fig. 1.

În anul 1944 a apărut streptomycina, descoperită de către Waksman, cloramfenicolul în 1947, clortetraciclina în 1948, penicilinele semisintetice 1958, cefalosporinele în 1960, fluorochinolonele în 1980 (14).

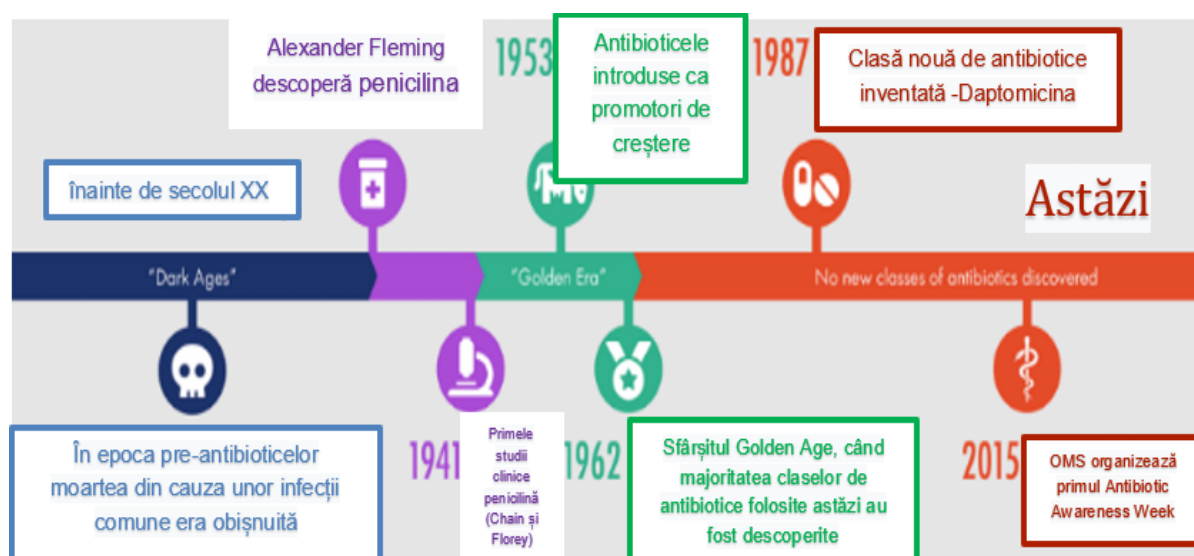
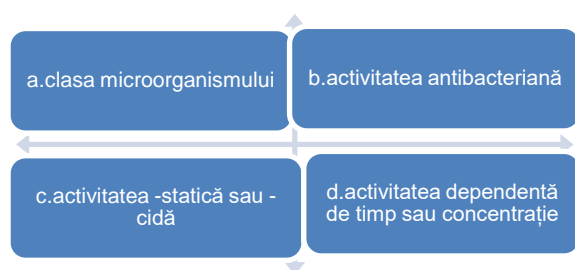


Fig. 1 Evoluția preparatelor antimicrobiene până la “Era superbug”(16)

Medicamentele antimicrobiene pot fi clasificate în funcție de patru caracteristici de bază și anume (13):



a. După clasa microorganismului

Medicamentele cu activitate antivirală și cele antifungice sunt în general active numai împotriva virusurilor și respectiv a ciupercilor.

Cu toate acestea, de exemplu unii agenți antifungici imidazolici au activitate împotriva bacteriilor, la fel ca și antibioticele antifungice (Griseofulvina, Nistatinul, Pimaricina sau Amfotericina) (13).

Agenții antibacterieni sunt considerați cu spectru îngust, dacă aceștia inhibă numai bacterii sau cu spectru larg în cazul în care inhibă și *Micoplasme*, *Rickettsii* sau *Chlamydii* (vezi Tabelul 1) (13).

Tabelul 1.

Spectrul de activitate al agenților antibacterieni cu utilizare comună (13)

Substanța	Clasa de microorganisme					
	Bacterii	Fungi	Micoplasme	Rickettsii	Chlamydii	Protozoare
Aminoglicozide	+	-	+	-	-	-
Beta-lactami	+	-	-	-	-	-
Cloramfenicoli	+	-	+	+	+	-
Fluoroquinolone	+	-	+	+	+	-
Lincosamide	+	-	+	-	-	+/-
Macrolide	+	-	+	-	+	+/-
Oxazolidinonă	+	-	+	-	-	-
Pleuromutiline	+	-	+	-	+	-
Tetraciline	+	-	+	+	+	+/-
Streptogramine	+	-	+	-	+	+/-
Sulfonamide	+	-	+	-	+	+
Trimetoprim	+	-	-	-	-	+

b. După activitatea antibacteriană

Unele medicamente antibacteriene sunt considerate ca având spectru îngust deoarece

ele inhibă doar bacteriile Gram-pozitive sau doar cele Gram-negative, în timp ce medicamentele cu spectru larg inhibă atât

bacterii Gram-pozitive cât și cele Gram-negative (13).

Cu toate acestea, unii agenți pot avea activitate primară împotriva bacteriilor Gram-pozitive, dar totodată vor inhiba unele bacterii Gram-negative.

De exemplu spectrul antimicrobienei din clasele carbapeneme, cloramfenicolul sau floroquinolonele din generația a treia au un spectru de activitate larg, acționând asupra bacteriilor gram-pozitive și gram negative, atât aerobe cât și anaerobe (13).

c. După activitatea –statică /-cidă

Concentrația minimă inhibitorie (MIC) reprezintă concentrația cea mai mică a unui agent antimicrobian necesară pentru a împiedica creșterea agentului patogen (13).

În contrast, concentrația minimă bactericidă (MBC) este cea mai mică concentrație a unui agent antimicrobian necesară pentru a produce distrugerea agentului patogen (13).

Un antimicrobian este de obicei considerat ca având efect bactericid în cazul în care MBC este de cel puțin patru ori mai mare decât MIC (13).

În anumite condiții clinice această diferență este importantă, astfel unele antimicrobiene sunt bactericide (de exemplu, beta-lactamice, aminoglicozide), iar altele sunt bacteriostatice (de exemplu, cloramfenicol, tetraciline, macrolide, lincosamide), dar această diferență depinde de concentrația medicamentului de la locul infecției dar și de microorganismul implicat.

De exemplu, benzil-penicilina are efect bactericid la concentrații terapeutice uzuale și bacteriostatic la concentrații scăzute (13). Antifungicele, fie ele topice sau sistemice pot avea fie acțiune fungicidă, fie acțiune fungistatică, similar antibioticelor (13).

d. După activitatea dependentă de timp sau concentrație

Agenții antimicrobieni sunt adesea clasificați ca având activitate fie dependentă de timp, fie dependentă de concentrație, în funcție de proprietățile farmacodinamice (13).

Proprietățile farmacodinamice ale unui medicament depind de relația dintre concentrația medicamentului și activitatea antimicrobiană (13).

Caracteristicile farmacocinetice ale medicamentelor cum ar fi concentrațiile serice în timp și aria de sub curba concentrației plasmatice în funcție de timp (ASC), atunci când sunt integrate cu valorile MIC, pot indica probabilitatea de distrugere bacteriană și succesul clinic.

Aceste relații farmacocinetice și farmacodinamice sunt de asemenea importante în prevenirea selectării și răspândirii tulpinilor rezistente (13).

Cel mai important factor care determină eficacitatea beta-lactamicelor, a unor macrolide, tetraciline, combinații de sulfamide cu trimetoprim și a cloramfenicolului este durata de timp în care concentrațiile serice depășesc MIC-ul unui anumit agent patogen. Creșterea concentrației medicamentului de mai multe ori peste MIC nu crește semnificativ rata de distrugere microbiană (13).

Alți agenți antimicrobieni, cum ar fi aminoglicozidele, fluorochinolonele și metronidazolul exercită caracteristici bactericide dependente de concentrație. Rata lor de distrugere crește pe măsură ce concentrația medicamentului crește peste MIC-ul agentului patogen și nu este necesară sau benefică menținerea nivelurilor de medicament peste MIC, între doze (13).

Unele medicamente prezintă activități dependente atât de timp, cât și de concentrație. Cel mai bun indicator al eficacității pentru aceste medicamente este zona de 24 de ore de sub concentrația serică raportată la curba de timp (AUC) / raportul MIC. Glicopeptidele, rifampicina, și, într-o oarecare măsură, fluorochinolonele se încadrează în această categorie (13).

Antibioticele

Antibioticele sunt metaboliți biologic activi produși de germenii microscopici, ca mijloc de luptă cu concurenții lor, folosite pentru a preveni și trata infecțiile bacteriene (14, 22, 23).

Termenul de antimicrobian: orice compus natural, sintetic sau semisintetic care poate determina oprirea creșterii microbiene și fungice. Primul pas corect în instituirea terapiei este alegerea celui mai potrivit antibiotic pentru vindecarea animalului. Antagonismul bacterian remarcat de Pasteur, care a observat că o cultură de *Bacillus anthracis* este oprită în dezvoltare în prezența bacilului piocianic.

Victor Babeș, în 1885, a studiat antagonismul bacterian și a propus termenul de antibioză în terapie. Termenul „antibiotic” a fost introdus de către Vuiellamin. După spectrul de acțiune, antibioticele se clasifică în:

- antimicrobiene,
- antifungice,
- antiprotozoarice,
- antivirale și
- antitumorale.

De asemenea antibioticele se pot clasifica în funcție de:

- -grupa de acțiune
- -tipul activității antibacteriene.

Clasificarea antibioticelor pe grupe de acțiune

Clasificarea antibioticelor pe grupe este prezentată în Tabelul 2.

Tabelul 2.

Clasificarea antibioticelor pe grupe de acțiune

Beta-Lactamine	peniciline de extracție, semisintetice și cefalosporine
Aminoglicozide	cap de serie streptomina
Macrolide	cap de serie eritromicina
Polipeptide ciclice	cap de serie polimixina B
Tetraciclone	cap de serie tetraciclina
Cloramfenicoli	cap de serie cloramfenicolul
Sinergistine	
Antibiotice diverse	antibiotice care nu se pot încadra structural și chimic.

Beta-lactaminele

Sunt antibiotice cu spectru îngust, care acționează asupra cocilor gram pozitivi și bacililor gram pozitivi, și nu sunt active față de bacteriile gram negative.

Acționează asupra actinomicetilor și spirochetilor, iar penicilinele de semisinteză (ampicilina, amoxicilina) acționează și asupra bacteriilor gram negative.

Aminoglicozidele

Prezintă un spectru compensator față de beta-lactamine, fiind active și asupra bacteriilor gram negative și față de cele gram pozitive, din acest motiv se asociază cu beta-lactaminele. Acestea sunt mai active asupra acido-alcool rezistenților (bacilul Koch).

Macrolidele

Sunt active asupra cocilor și bacililor gram pozitivi, puțin active asupra cocilor și bacililor gram negativi. În plus sunt active asupra actinomicetelor, micoplasmelor, protozoarelor și spirochetelor.

Sinergistinele

Acționează asupra cocilor gram pozitivi și negativi, și asupra bacililor gram pozitivi și nu sunt active asupra bacililor gram negativi. Prezintă acțiune și asupra actinomicetelor, micoplasmelor și asupra unor protozoare.

Polipeptidele ciclice

Dintre acestea, polimixina B și colistinul prezintă activitate bună asupra bacteriilor gram negative și asupra actinomicetelor, iar bacitracina, tirotricina, asupra bacteriilor gram pozitive.

Tetraciclonele

Prezintă un spectru larg, fiind active asupra cocilor gram pozitivi și negativi, ricketsiilor, spirochetelor, micoplasmelor, actinomicetelor și a unor protozoare.

De asemenea acționează asupra virusurilor mari. Antibioticele pot acționa gemstatic, gemicid, germilic (bacteriolitic) (vezi tabelul 3), iar acțiunea depinde de concentrația antibioticelor.

Tabelul 3.

Clasificarea principalelor substanțe cu activitate antibiotică cu utilizare în MV

Bactericide	Bacteriostatice
Penicilinele	Tetraciclonele
Cefalosporinele	Eritromicinele
Aminoglicozidele	Sulfonamidele
Rifamicinele	Novobiocina
Chinolonele	Cloramfenicolii

După tipul activității antibacteriene antibioticele sunt clasificate conform Tabelului 4.

Tabelul 4.
Clasificarea după tipul activității antibacteriene

Tipul activității antibacteriene	Substanța
Inhibiția sintezei peretelui celular	Penicilina, Cefalosporina, Vancomicină, Bacitracină
Afectarea permeabilității bacteriene	Polimixina, Colistinul, Nistatina, Amfotericină B, Eritromicina
Inhibiția sintezei proteice	Cloramfenicol, Tetraciclina, Aminoglicozide, Lincomicina, Eritromicina
Inhibiția sintezei acizilor nucleici	Chinolone, Sulfamide, Rifampicina, Trimetoprim

Prevederile din fiecare țară impun alegerea judicioasă a asocierilor de antibiotice, în lumina noilor prevederi legate de reziduuri, conceptul de polifarmacie în cazul antibioticelor fiind o chestiune dificilă.

Comparația eficientă de antibiotice trebuie să respecte regulile:

Bactericid + Bactericid = Sinergie (ex. gentamicină + carbenicilină, penicilină + streptomycină)

Bacteriostatic + Bacteriostatic = Adiție de efecte (ex. eritromicină + tetraciclina),

Bacteriostatic + Bactericid = Antagonism.

Beta-Lactaminele sunt considerate bactericide, cu activitate în faza de înmulțire logaritmică.

Prezintă activitate bacteriostatică în concentrații mici, sau bacteriolitică în concentrații mari.

Aminoglicozidele sunt antibiotice bactericide, motiv pentru care se asociază cu beta-lactaminele.

Tetraciclina și cloramfenicolul sunt antibiotice bacteriostatice, astfel nu este permisă asocierea lor cu antibioticele bactericide.

Sulfamidele

Sunt substanțe care au în structura lor gruparea sulfonamică: SO₂-NH₂, structură asemănătoare cu cea a acidului para-amino bezoic (APAB), precursor esențial al vitaminelor B.

Clasificarea sulfamidelor:

- antimicrobiene,

- diuretice,
- hipoglicemiante
- antitiroidiene

De asemenea se pot clasifica în: sulfamide sistemice, topice și enterice, după cum se observă în tabelul 5)

Tabelul 5.
Sulfamidele sistemice, topice și enterice

Sulfamide sistemice	Sulfamidele topice	Sulfamidele enterice
Sulfanilamida (sulfamida mamă)	Sulfacetamida	Sulfaguanidina
Sulfadimidina (sulfametazina)	Sulfatioureea (Badionalul)	Ftalilsulfatiazol
Sulfadiazina	Neoxazolul	Ftalilsulfacetamida
Sulfadimetoxina (sulfadoxina)	Sulfanilamida (sulfamida mamă)	Succinilsulfatiazol

În prezent se cunosc, trei tipuri de derivați care pleacă de la para-aminobenzen sulfonamidă:

- substituții la funcția N1,
- substituții la funcția N4 și
- dublu substituții la funcțiile N1 și N4, cei mai importanți fiind cei din primul tip.

Există și alți compuși considerați sulfamide: homosulfamida ce are interpusă între funcția aminică și nucleul benzenic funcția metilen și sulfonele, ce acționează asupra bacilului Hansen (germenul leprei la om).

Solubilitatea sulfamidelor influențează eficacitatea, astfel concentrația în țesuturi este guvernată de rata absorbției la locul administrării și de concentrația lor în compartimentele organismului.

Rata absorbției este proporțională cu hidrofilia lor. Derivații de para-aminobenzen sulfonamidă sunt pulberi cristaline albe, fără miros, gust amar, insolubile în apă, totuși solubilizarea se poate obține la pH-uri extreme.

Antifungicele

Un agent antifungic este definit ca o substanță care elimină selectiv fungii patogeni pentru gazdă, cu toxicitate minimă pentru aceasta. Dezvoltarea de agenți antifungici noi a fost lentă, comparativ cu cercetarea antibacteriană, iar principalele cauze ar fi:

- incidența scăzută în trecut a infecțiilor fungice, astfel creșterea incidenței a condus la cercetări masive asupra agenților antifungici, după cum reiese din creșterea numărului de publicații începând cu anii 1960.
- **fungii sunt organisme eucariote**, cu o relație evolutivă strânsă cu gazda umană sau animală, ceea ce complică obținerea unor antifungice eficiente și fără toxicitate.

Infecțiile fungice se pot clasifica în infecții: sistemice și superficiale.

Antimicoticele se clasifică în cele cu:

- acțiune topică,
- acțiune sistemică și
- cu activitate mixtă.

Principalele criterii de clasificare ale antifungicelor folosite în medicina veterinară sunt:

- structura chimică,
- mecanismul de acțiune,
- spectrul antimicotic și
- calea de administrare sau locul de acțiune.

După structura chimică (vezi tab. 6).

Tabelul 6.
Clasificarea antifungicelor după structura chimică (28)

Clasa chimică	Substanța
Griseofulvine	Griseofulvina
Poliene	Amfotericina B, Natamicina, Nistatina
Azoli: Imidazoli	Clotrimazol, Econazol, Enilconazol, Ketoconazol, Miconazol, Parconazol
Azoli: Triazoli	Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol
Alilamine	Terbinafina
Tiocarbamați	Tolnaftat
Benzimidazoli	Tiabendazol
Pirimidine	Flucitozina
Echinocandine	Casprofungina, Anidulafungina, Micafungina

După mecanismul de acțiune (vezi tab. 7)

Tabelul 7.
Clasificarea antifungicelor după mecanismul de acțiune (28, 29)

Reprezentanți	Mecanism de acțiune
Azoli Clotrimazol, Fluconazol, Voriconazol, Posaconazol	Acționează asupra căii de sinteză a ergosterolului prin blocarea activității 14 alfa-dimetilazei, ce determină modificarea structurii și permeabilitatea mb. fungice
Inhibitorii biosintezei ergosterolului de tipul alilaminelor Naftifin, Terbinafină, Butenafină	Inhibă biosinteza ergosterolului prin blocarea squalen epoxidazei
Poliene Amfotericina B, Nistatina	Acționează prin legare la nivelul mb. celulare, cu modificarea structurii și a permeabilității membranei fungice, prin legarea selectivă de ergosterol
Antimetaboliți (flucitozina)	Reprezenți de molecule mici analoge matriței ADN, ce determină o sinteză incorectă a moleculelor de ADN
Echinocandine (casprofungin)	Inhibă sinteza glucanului din compoziția peretelui fungic
Alte antifungice (griseofulvina)	Acționează la nivelul fusului mitotic, determinând alterarea polimerizării microtubulilor citoscheletului fungic blochează diviziunea celulară în metafază

După modul de acțiune (vezi tab. 8).

Tabelul 8.
Clasificarea antifungicelor după modul de acțiune (14, 28)

Topice	Sistemice
Chimioterapice	Antibiotice
Fenol, Hexaclorfenol, Clorură de benzalconiu, Fuxină, Rezorcină	Griseofulvina, Nistatina, Amfotericina B
Imidazolicele Clotrimazol, Enilconazol, Econazol, Miconazol, Ketoconazol, Tiabendazol	Imidazolice Ketoconazol, Parconazol
Acizi organici acidul undecilenic, Caprilic, Salicilic, Ac. Benzoic	Triazoli Itraconazolul, Fluconazolul, Micetina, Voriconazol, Posaconazol
Tolnaftați Acidul benzuldazic	Echinocandine Casprofungin, Anidulafungin, Micafungin
Iodofori Povidona	Antimetaboliți Flucitozina
Alilamine Terbinafina, Naftidina	Alilamine Terbinafina
Poliene Amfotericină B, Natamicina, Nistatina	
Altele Amarolfina, Tolnaftat, Haloprogin	

După spectrul antimicotic

1. Cele cu spectru larg: amfotericina B, natamicina, ketoconazol, miconazol, econazol, fluconazol, itraconazol, terbinafina, naftina, amarolfina, ciclopiroxul.
2. Cele cu spectru îngust: griseofulvina, clotrimazol, flucitozina, haloprogin, tolnaftat.

2. Mecanismul de acțiune, cinetica și spectrul de activitate

Antibioticele

Antibioticele pot acționa la nivelul peretelui bacterian, la nivelul membranei celulare, asupra sintezei proteice sau pot să interfereze metabolismul acizilor nucleici, după cum se poate observa și din fig 2.

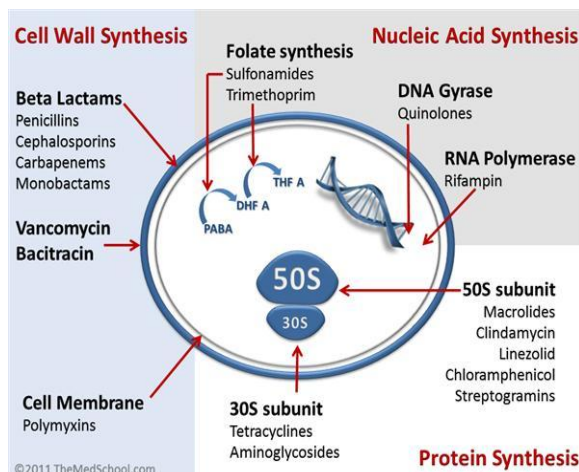


Figura 2. Mecanismele de acțiune ale antibioticelor

Acționează asupra:

- **sintezei peretelui bacterian:** beta-lactamicele, bacitracina și glicopeptidele.
- **membranei celulare:** polimixinele.
- **sintezei proteice:** aminoglicozidele, cloramfenicolul, lincosamidele, glicicliclinele, macrolidele, oxazolidinonele, streptograminele, pleuromutilinele și tetraciclinele.
- **Interferarea metabolismului acizilor nucleic:** fluorochinolonele, nitroimidazoli, nitrofurani, rifampicină și griseofulvină.

Beta Lactaminele – Penicilinele

Se extrag din culturi de *Penicillium nodatum*, *P. crustosum*, *P. crysogenum*.

Penicilinele nu se administrează per os, numai în injecții intramusculare, subcutanate sau intravenoase, cel mai frecvent pe cale intramusculară profundă. Timpul de acțiune la penicilina G cristalizată este scurt, 4-6 / zi.

Există și peniciline retard (depozit) cum ar fi:

- esterii penicilinei G,
- procain-penicilina și
- benzatin-penicilina,

care se absorb lent la locul de administrare. Difuziunea penicinelor este foarte bună în țesuturi și organe, acestea pătrund bine în pulmon, difuzează în țesuturi și organe, în placentă ajunge în proporție de 50% în lichidul fetal, difuzează greu în L.C.R.

Eliminarea se face renal și mamar, regăsindu-se în lapte, ceea ce duce la interdicția utilizării. Se mai elimină prin salivă, bilă, se pare că și prin ouă.

Alte peniciline cu utilizare largă: Ampicilină, Amoxicilină.

Beta Lactaminele – Cefalosporinele

Cefalosporinele conțin o structură penicilamică, conțin inel β -lactamic și sunt împărțite în mai multe clase:

- de extracție,
- semisintetice și
- sintetice.

Cele naturale (Cefalosporina C) se extrag din *Cefalosporium acremonium*.

Cefalosporinele se absorb oral (generația I) și parenteral, prezintă o difuziune bună în țesuturi și organe, penetrează bine în țesuturile parenchimatose, pleură, pericard, sinovii și penetrează greu în ochi și L.C.R.

Ultima generație de cefalosporine penetrează bariera H.E. Acționează timp de 8-12 ore, cu administrare de 2-3 ori/zi.

Datorita costurilor in medicina veterinara sunt preferate substantele active din primele trei grupe de cefalosporine:

- generația I,
- generația II și
- generația III:

Generația I	Generația II	Generația III
Cefadroxil, Cefazolin, Cefalexin, Cefaclor (p.o.), Cefalotin, Cefapirin, Cefacetril, Cefrodin.	Cefamandol, Cefanocid, Ceforanid, Cefotetan, Cefoxidin, Ceftiofur, Cefuroxin.	Cefoperozona, Cefotaxin, Ceftozidină, Ceftozoxin, Ceftrixon, Moxalactam:
Acțiune bună: bacterii G+, coci G+	Acțiune bună: bacteriile G+	Activi <i>P. aeruginosa</i>
Acțiune medie: coci G-, asupra lui <i>Stafilococcus</i> ,	Active: G - : <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Salmonella</i>	Acțiune mai slabă asupra G+, Acționează puternic asupra G-
Activitate: restrânsă asupra bacteriilor Gram -	Foarte active asupra: speciilor indol pozitive: <i>Proteus</i> , <i>Haemophilus</i>	Active asupra: <i>Pseudomonas</i> , <i>B. fragilis</i> și <i>B.</i> <i>bronhiseptica</i> .
	Rezistente: <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> și <i>P. aeruginosa</i>	

Aminoglicozidele

Capul de serie al acestei clase este Streptomycină, care se izolează din *Streptomyces*, mai ales *Str. griseus*.

Streptomycină nu se administrează intravenos, doar excepțional, în perfuzii foarte lent. Intrarahidian se administrează în doze mici și în soluții diluate. Se administrează în aerosoli, în afecțiunile respiratorii. Este activă asupra cociilor G+ și G- și bacilii G-, activitate slabă asupra G+, asupra acido-alcoolorezistenților (*M. tuberculosis*, *M. leprae*). Alte antibiotice importante din această clasă Neomicina, Kanamicina, Gentamicină.

Rifampicinele (A, B, C, D)

Se extrag din *Streptomyces mediteranei* și prezintă acțiune duală, bactericidă și/sau bacteriostatică, cu un spectru larg, principal asupra G+. Administrarea rifampicinilor se face per os, fiind rezistent la sucurile digestive, dar și intramuscular și intravenos. Difuzează bine în țesuturi, iar eliminarea se face prin bilă, fecale, urină.

Macrolidele antiinfecțioase

Antibiotice cu moleculă mare, cuprind inele lactonice mari, legate între ele prin oze dimetilate.

Acestea sunt antibiotice cu spectru îngust de acțiune. Membrii importanți ai acestei clase sunt: Eritromicina, Azitromicină, Claritromicină, Oleandomicina, Spiramicina și Tilozina.

Eritromicina se extrage din *Streptomyces erythraea*, și este activă asupra: G+, cociilor G+ și G-. Prezintă acțiune bacteriolitică sau bactericidă, în funcție de doză, cu indicații în afecțiuni respiratorii, infecții genito-urinare, enterite.

Polipeptidele ciclice

Antibiotice formate din acizi aminați și un acid gras. Sunt considerate foarte toxice și se folosesc local.

Capul de serie îl constituie Polimixina, care se extrage din culturi de *Bacillus polymyxa*. Există 5 polimixine cunoscute: A, B, C, D și E.

Polimixina B prezintă acțiune bacteriostatică sau bactericidă, indiferent de stadiul de dezvoltare al bacteriilor și este activă asupra bacteriilor G-, *E. coli*, e *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Shigella*, etc.

Grupa tetraciclinelor

Cuprinde antibiotice cu spectru larg, chiar foarte larg, acestea au în structura lor patru inele condensate liniar.

Se extrag din culturi de *Streptomyces spp.* Se găsesc sub formă de cristale mici, gălbui, insolubile în apă, solubile sub formă de săruri.

Spectrul antibacterian al tetraciclinelor este larg: coci G+ și G-, bacterii G+ și G-, actinomicete, rickettsii, spirili, virusuri mari și protozoare, iar modul de acțiune este bacteriostatic. Ca reacții secundare, pot să apară tulburări hepatice în special la administrarea de clortetraciclină.

Tetraciclinele se acumulează în oase, dinți, afectând sistemul osos cu apariție de fragilitate. Doxiciclina este cea mai activă din grupa tetraciclinelor, și printre cele mai utilizate în medicina veterinară.

Cloramfenicolul

Este un antibiotic cu spectru larg, care se extrage din culturi de *Streptomyces venezuelensis*, cu acțiune bacteriostatică (nu se asociază cu beta-lactaminele).

Cloramfenicolul este o moleculă mică, se găsește sub 2 forme: **levogir** și **racemic**.

Acesta traversează bariera hemato-encefalică și difuzează bine prin bariera placentară. Se elimină metabolizat pe cale renală, și prin bilă și fecale.

Tiamulinul

Este un derivat semisintetic al antibioticului Pleuromutilin - produs de *Pleurotus nautilus*, este activ față de micoplasme, treponeme, leptospire, germeni G+ și G-. Indicația principală este dizenteria suină produsă de *B. hyodysenteriae*, de asemenea se folosește în complexul pneumoniei enzootice a porcului, artritele micoplasmice, infecțiile suine enterale și pulmonare.

Lincosamidele

Lincomicina este un antibiotic din clasa lincosamidelor care a fost utilizat în tratamentul unor infecții bacteriene stafilococice și streptococice. Este un compus natural, fiind produs de actinomiceta *Streptomyces lincolnensis*.

Lincomicina a fost aprobată pentru uz medical în septembrie 1964. Datorită toxicității sale ridicate, este utilizată rar în prezent și doar în cazuri speciale.

Totuși, se poate utiliza ca alternativă clindamicina, un derivat clorurat al lincomicinei, care este mai bine absorbită după administrarea orală și este mai activ împotriva organismelor din spectrul său.

Acestea includ stafilococii, streptococii și majoritatea bacteriilor anaerobe, împotriva cărora clindamicina prezintă activitate remarcabilă.

Sulfamidele

Spectrul de activitate la sulfamide este reprezentat de: coci Gram negativi și Gram pozitivi (mai ales streptococi, stafilococi, pneumococi, bacterii Gram negative) și Gram pozitive (*B. anthracis*, *Pasteurela*), *Clostridium*, *B. mallei*, în actinobaciloză, în actinomicoză și asupra *Corynebacterium spp*, de asemenea dau rezultate bune în coccidiozele aviare. Nu sunt active în: rickettsioză, asupra virusurilor

mici și în cazul bacililor acido-alcoolo-rezistenți.

Modul de acțiune la sulfamide este bacteriostatic, determină inhibiția înmulțirii bacteriene, lezând ușor celulele bacteriene. Aceasta va permite ulterior fagocitoza celulelor bacteriene.

În prezența sulfamidelor, fagocitoza este activată, iar celulele sunt mai vulnerabile.

Procesul de fagocitoză este atât de intens, încât nici nu se mai formează imunitate.

Asocierea sulfamidelor cu potențializatori de sulfamide determină creșterea efectului și transformarea din bacteriostatic în bactericid, exprimat prin creșterea indexului terapeutic de câteva ori.

Combinăția este antagonizată de către prezența timidinei (cu rol în deturnarea procesului de formare al ADN).

Acțiunea bacteriostatică este maximă în faza de multiplicare intensă a bacteriilor și în special asupra germenilor de după multiplicarea de invazie.

Cea optimă este cea după faza logaritmică de înmulțire a bacteriilor prin sărăcirea de acid para-aminobenzoic și folosirea prin substituție a sulfamidelor.

Mecanismul de acțiune constă în interferarea metabolică a sintezei de acid folic (vezi Fig. 3), dar există și bacterii care nu necesită acțiunea APAB în formarea acizilor nucleici ci își pot lua compuși metabolici gata sintetizați de către mediu (acidul folic).

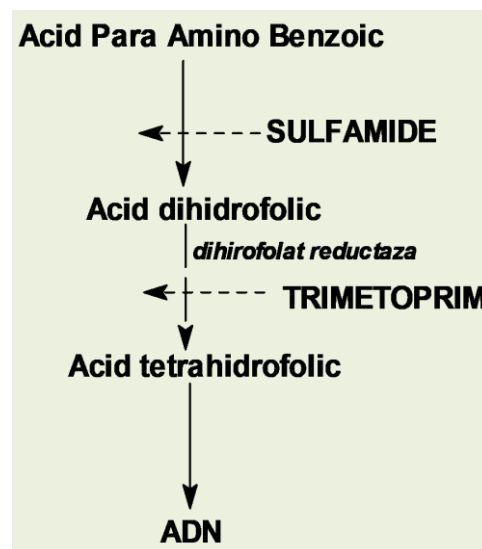


Figura 3. Siturile de acțiune ale sulfamidelor și a trimetoprimului

Molecula de sulfamidă este asemănătoare cu cea de acid para-aminobenzoic, atât ca dimensiuni, structură spațială, distanțe interatomice și distribuția sarcinilor electrice.

Absorbția sulfamidelor este variabilă cu specia, și este tributară gradului de plenitudine intestinal astfel:

- câinii și pisicile absorb rapid, aproape complet,
- la vaci, rata absorbției este mult mai lungă (se recomandă administrarea în lapte călduț pentru a închide gutiera esofagiană și a favoriza pasajul direct în cheag).

Sărurile monosodice de sulfamide se administrează strict i.v., excepții fiind sulfadimidina sodică și sulfadimetoxinul sodic, care se pot administra profund i.m.

Difuziunea sulfamidelor în țesuturi și organe este foarte bună (cele care se absorb ușor au acțiune generală), inclusiv prin bariere, în circulația fetală ating până la 50% din concentrația terapeutică maternă.

Coeficient de difuziune în pulmoni este foarte important, la fel ca și cel de difuziune în organele în care infecția se localizează.

Sulfamidele pătrund în elementele figurate, seroase, lichid sinovial, transudate, exsudate, cu efecte benefice în terapie (cu condiția să nu existe puroi), difuzează bine în LCR traversând bariera HE.

Concentrații mari se găsesc în rinichi și în ficat, în aceste organe concentrarea sulfamidelor depășește concentrațiile sanguine ale substanței.

Sulfamidele administrate pe cale orală se absorb bine, pe cale parenterală absorbția este în funcție de calea folosită, cea i.v. fiind rapidă și se realizează concentrații maxime imediate.

Pe calea seroaselor absorbția este bună cu concentrații sanguine înalte, pe cale rectală absorbția este neuniformă și este puțin folosită în medicina veterinară, iar pe cale i.m. se administrează doar unele soluții uleioase.

În sânge, sulfamidele cuplează cu proteinele plasmatică. Din acest punct de vedere se împart în sulfamide clasice cu un procent redus de cuplare și durată de acțiune în organism mai scurtă, și sulfamide retard

care cuplează masiv cu proteinele plasmatică și acționează timp îndelungat în organism, eliberându-se sub formă liberă prin sânge.

Concentrațiile în sânge trebuie să asigure un nivel minim inhibant asupra bacteriilor sau germenilor pe toată durata tratamentului, C.M.I - 3 mg sulfamidă / 100 ml sânge.

Metabolizarea sulfamidelor se realizează în ficat, prin biotransformare, sau conjugare. Un mecanism important este acetilarea sulfamidelor la funcția aminică (întâlnită la sulfamidele clasice).

Acetilarea la funcția aminică a sulfamidelor are dezavantajul că în urină metabolizii precipită; în urina acidă putând forma chiar microcristale (care pot bloca tubii renali). Acetilarea este o cale importantă mai ales pentru sulfamidele vechi.

Un avantaj al sulfamidelor pirimidinice (sulfadiazină, sulfamerazină, sulfadimidină) este că derivatul acetil este mult mai solubil, ca la alte sulfamide.

O cale importantă de metabolizare la sulfamidele retard este glucuronoconjugarea care permite formarea unor metabolizii, cu eliminare ușoară.

Eliminarea se realizează prin rinichi, sulfamida necuplată este excretată de glomerul, moleculele ionizate fiind excretate activ în tubii proximali. Reabsorbția se petrece în tubii uriniferi prin procese de difuziune pasivă a componentelor liposolubile neionizate.

Reabsorbția sulfamidei are loc în tubuli prin difuziunea pasivă a compușilor neionizați liposolubili. Proportia de medicament neionizat va fi dependentă de pKa și de pH-ul fluidului tubular.

Din punct de vedere al vitezei de eliminare renală, sulfamidele se împart în 6 categorii:

1. Sulfamide cu eliminare ultrarapidă (Sulfatiouree/ Badional), timp terapeutic util de 2-3 ore;
2. Sulfamide cu eliminare rapidă (Sulfatiazolul), timp terapeutic util de 4-6 ore;
3. Sulfamide cu eliminare medie (Sulfafenazolul, Orisul, Sulfametoxazolul, Gantanol, Sulfisomidina sau Elkosin), timp de menținere în organism de 12 ore;

4. Sulfamide cu eliminare lentă (Sulfamerazina, Sulfodimerazina, Sulfametinul, Bayrena), care se elimină din organism după 24 de ore;
5. Sulfamide cu eliminare foarte lentă
6. (Sulfametoxipirazina, Longun sau Sulfalen), cu durată de acțiune în organism de 48 de ore;
7. Sulfamide cu eliminare ultralentă (Sulfadimetoxipirimidina, Sulfadoxin sau Sulformetoxin), au timp util terapeutic de 72 de ore (în administrările orale la păsări atinge 5 zile).

Trimetoprimul este principalul compus chimioterapic folosit pentru ca potențializator de sulfamide. Prezintă acțiune bacteriostatică, cu spectru apropiat de cel al sulfamidelor, fiind folosit în bolile majore ale câinelui, pisicilor și animalelor de fermă.

Antifungicele

Locurile și mecanismele de acțiune ale antifungicelor de la nivelul celulei fungice sunt următoarele (vezi Fig. 4):

Ergosterolul întâlnește în membrana celulară fungică (locul de acțiune al antifungicelor din clasa azolilor și alilaminelor)

- Inhibarea sintezei de **ADN** (locul de acțiune al flucitozinei)
- Inhibarea sintezei **microtubulilor** (locul de acțiune al griseofulvinei)
- legarea ergosterolului (locul de acțiune al antifungicelor din clasa polienelor)
- echinocandinele acționează asupra complexului proteic responsabil de sinteza a β -1,3 glucan, prin blocarea enzimei glucan sintetază.

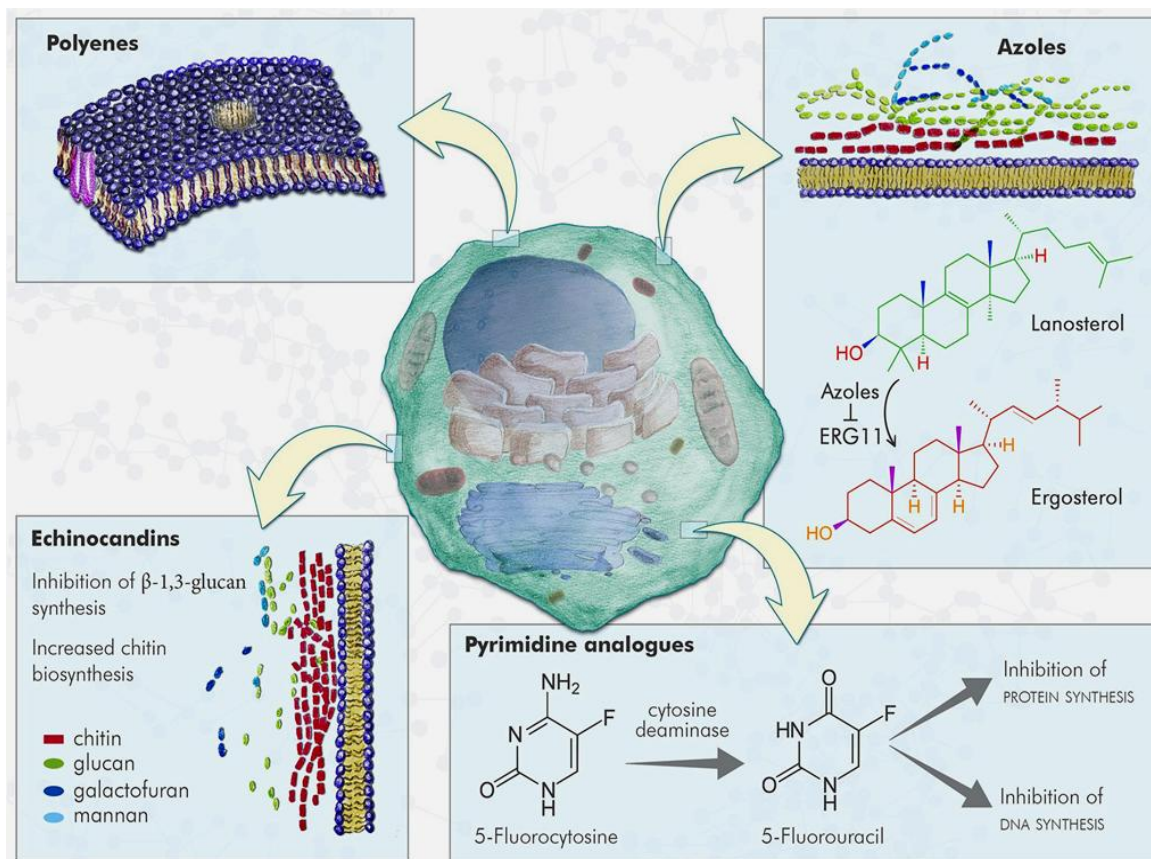


Figura 4. Locurile de acțiune ale antifungicelor de la nivelul celulei fungice (24)

Antifungicele sistemice

Antibioticele antifungice: Griseofulvina

A fost izolată (din *Penicillium griseofulvum*) pentru prima dată în 1939 și

comercializată din anul 1956. Este un compus puternic lipofil, bine absorbit pe cale orală (hrană bogată în lipide) și atinge concentrația terapeutică în piele și la nivelul foliculilor piloși.

Se găsește sub două forme farmaceutice: griseofulvină **micronizată** care conține particule

cu un diametru de 4 μm și griseofulvină ultramicronizată ale cărei particule nu depășesc diametrul de 1 μm .

Reducerea dimensiunilor particulelor crește disponibilitatea pentru absorbție

Timpul de înjumătățire plasmatic la câine este de 47 de minute.

Cu toate acestea, timpul de înjumătățire la locul de acțiune, în stratul cornos, este prelungit deoarece este legat strâns de keratinocite și rămâne în piele până când aceste celule sunt reînnoite

Griseofulvina este metabolizată în ficat pe cale oxidativă, prin demetilare și conjugare cu acid glucuronic, rezultând metaboliți inactivi farmacodinamic, demetilgriseofulvină și glucuronidă.

Mai puțin de 1% din medicament este excretat nemodificat prin urină.

După ce pătrunde în interiorul celulei, griseofulvina interferează sinteza microtubulilor ceea ce duce la inhibarea fusului mitotic (blocarea acestuia în metafază) (vezi Fig. 5).

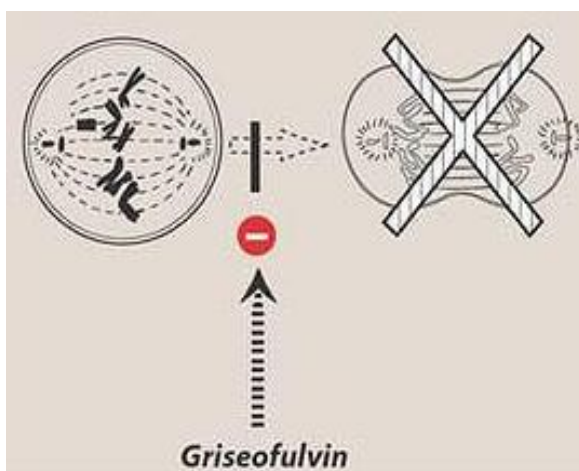


Figura 5. Mecanismul de acțiune al griseofulvinei (27)

Activitatea griseofulvinei este limitată asupra dermatofitelor: *Microsporum spp.*, *Trichophyton spp.*, și *Epidermophyton* și nu este eficace împotriva levurilor precum *Candida spp.* sau *Malassezia spp.*

Griseofulvina acționează fungicid, după administrare pătrunde în zonele de cheratinizare a pielii, impregnează celulele precursorare de cheratină din stratul cornos al pielii, dar este eliminată din stratul cornos în 48 până la 72 de ore.

Antifungicele polienice Amfotericina B

Amfotericina B este un antibiotic macrolidic din clasa polienelor, produs de *Streptomyces nodosus*.

Aceasta este slab solubilă în apă, prezintă un caracter amfoter - poate forma săruri atât în mediul acid, cât și în cel bazic.

Aceste săruri sunt mult mai solubile în apă, dar activitatea antifungică este mai modestă, comparativ cu molecula mama.

Absorbția în tractul gastrointestinal este nesemnificativă, prin urmare aceasta trebuie administrată intravenos, local sau intratecal.

Amfotericina B se leagă de proteinele serice (~95%), în principal β -lipoproteine iar distribuția amfotericinei B se realizează în mai toate țesuturile, cu excepția: pancreasului, musculaturii striate, oaselor, umorii apoase și fluidelor: pleural, pericardic, sinovial și peritoneal.

Cele mai mari concentrații se găsesc în ficat, splină, rinichi și plămâni.

Amfotericina B prezintă activitate fungicidă sau fungistatică în funcție de agentul patogen și de concentrație. Mecanismul de acțiune se realizează prin legarea ergosterolului din membrana celulelor fungice și formarea unui complex capabil să modifice membrana celulară, cu formare de pori membranari care conduc la pierderi de ioni monovalenți și mai apoi la moartea celulelor (vezi Fig. 6)

Un alt mecanism implică o cascadă de reacții de oxidare precum și interacțiuni cu lipoproteinele, ceea ce împiedică permeabilitatea membranelor prin eliberarea de radicali liberi.

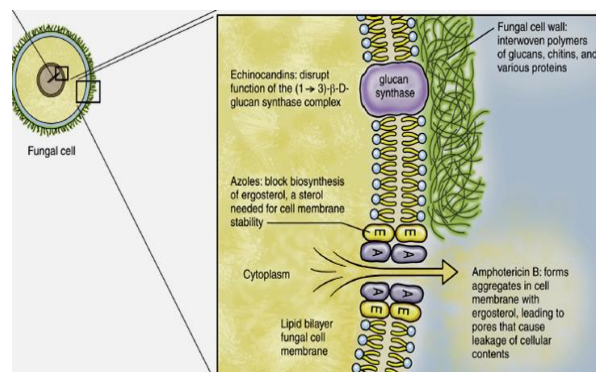


Figura 6. Mecanismul de acțiune al Amfotericinei B (25)

Funții sensibili la Amfotericină B sunt *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida spp.*, *Mucor spp.*, *Sporothrix spp.* și diverse specii de *Aspergillus*.

Antifungicele azolice: Imidazolicele și Triazolii

Acestea prezintă un spectru larg de activitate și sunt disponibile sub formulări topice, orale și intravenoase. Există două categorii principale de medicamente antifungice azolice, vezi Fig. 7:

Medicamentele antifungice triazolice, itraconazolul și fluconazolul prezintă o biodisponibilitate orală crescută, sunt metabolizate mai lent și au un impact mai mic asupra sintezei sterolului la mamifere, decât imidazolii.

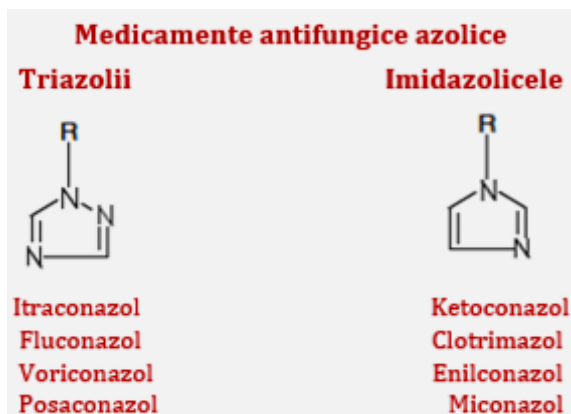


Figura. 7 Triazolii și imidazolicele (25)

Din grupa imidazolilor, enilconazolul, clotrimazolul și miconazolul prezintă o biodisponibilitate orală slabă și sunt utilizate topic pentru tratamentul micozelor superficiale.

Efectul antifungic asupra membranei celulare a fungilor se realizează prin inhibarea sintezei ergosterolului (fig. 8), care este o componentă cheie a peretelui fungic.

Acestea acționează prin blocarea căii de sinteză a ergosterolului, inhibând activitatea enzimei 14-alfa-dimetilază, care catalizează conversia lanosterolului la ergosterol și se ajunge la o depleție de ergosterol și o acumulare de steroli de tip C14-metil în membrana citoplasmatică fungică.

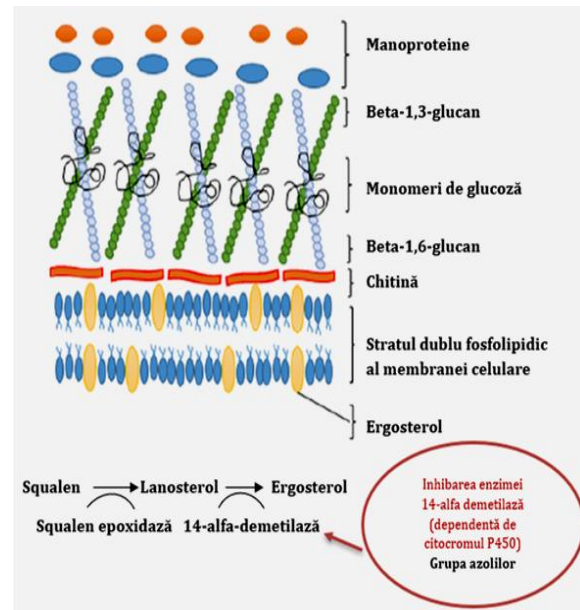


Figura 8. Mecanismul de acțiune al antifungicelor azolice (26)

Ketoconazolul este un derivat imidazolic cu efecte fungicide și fungistatice asupra dermatofităților, levurilor și a unor funghi filamentoși, care a devenit disponibil în 1979.

Este un compus extrem de lipofil, această proprietate duce la concentrații mari de ketoconazol în țesuturile grase și exudate purulente. Se leagă puternic de proteinele plasmatiche (> 98%), prin urmare nu atinge concentrații terapeutice în lichidul cefalorahidian, seminal sau ocular, dar se găsește în cantități apreciabile în lapte.

Ketoconazolul este metabolizat în ficat prin dezalchilare oxidativă și hidroxilare aromatică în câțiva metaboliți inactivi, care sunt eliminați prin bilă și excretați odată cu materiile fecale. Timpul de înjumătățire este de aproximativ 2-2,7 ore la câini

Acesta prezintă activitate antifungică crescută asupra speciilor de *Candida*, *Malassezia pachydermatis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, precum și majoritatea dermatofităților din genul *Microsporum Spp*, *Trichophyton spp.* și *Epidermophyton floccosum*.

Fluconazolul este un derivat triazolic cu efect fungistatic asupra *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Malassezia spp.* și *Blastomyces* (spectrul cel mai îngust).

Acesta este absorbit bine, indiferent de circumstanțe, și este eliminat în principal pe cale renală fiind excretat prin urină într-o formă activă.

Itraconazolul prezintă activitate asupra: *Candida*, *Aspergillus* (avantaj), *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, dermatofiți: *Microsporum*, *Trichophyton*. *Malassezia*, *Sporothrix*, *Pythium*. Absorbția este bună și este dependentă de pH-ul gastric și de prezența alimentelor.

Voriconazolul este un reprezentant nou al triazolilor, cu activitate asupra *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Scedosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*.

Posaconazolul prezintă un spectru larg de activitate împotriva celor mai comuni fungi patogeni, precum *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Scedosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*.

Alilamine (Terbinafina)

Biodisponibilitatea orală a terbinafinei la majoritatea speciilor de animale variază de la 31% la pisici, la peste 46% la câine, până la peste 85% la șoareci .

Natura lipofilică a terbinafinei determină concentrații mari în țesuturi, cum ar fi stratul cornos al pielii și derm. Este excretată în sebum atingând concentrații mari în foliculii piloși, piele și unghii.

Terbinafină prezintă un spectru larg de acțiune, acționează fungicid asupra *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.* și a unor specii de *Aspergillus*. De asemenea, este fungicid sau fungistatic împotriva *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida spp.* și *Malassezia spp.*

Terbinafină acționează prin inhibarea 2,3-squalen-epoxidazei din membrana celulei fungice intervenind astfel în prima parte a sintezei de ergosterol, care este componenta

esențială a membranei celulare fungice, având ca rezultat distrugerea celulei din cauza deficitului de ergosterol.

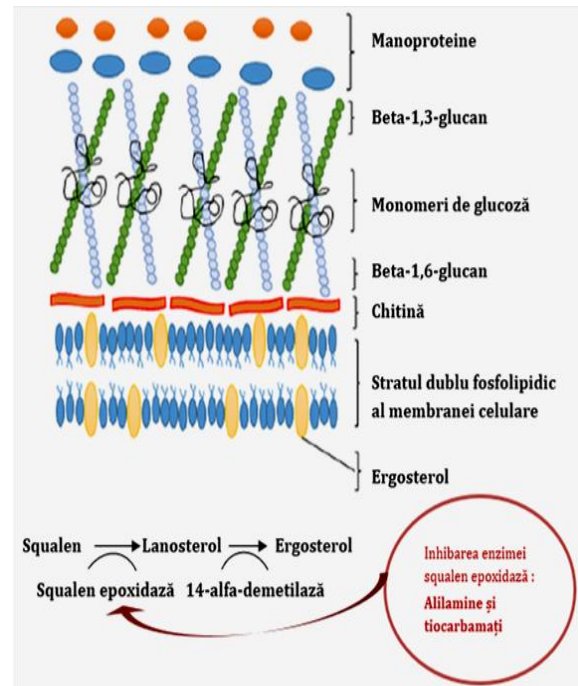


Figura 9. Mecanismul de acțiune al terbinafinei (26)

Echinocandinele

Echinocandinele au fost descrise pentru prima dată în anii '70 și sunt compuși care vizează peretele celulei fungice prin inhibarea selectivă a sintezei de beta-1,3-glucan.

Este o clasă restrânsă din punct de vedere al spectrului de activitate, cu eficiență împotriva majorității speciilor de *Candida* și *Aspergillus spp.*

Din această clasă fac parte caspofungina, micafungina și anidulafungina. Caspofungina se leagă în proporție mare de albumină (97%). Eliminarea caspofunginei din plasmă este lentă, cu un clearance de 10- 12 ml/min.

Datorită structurii sale, aceasta nu este absorbită oral, fiind disponibilă doar sub formă injectabilă.

Antimetaboliții

Flucitozina este un agent antifungic sintetic, derivat fluorurat pirimidinic. Se administrează pe cale orală, absorbția este rapidă și completă în tractul gastrointestinal.

Disponibilitatea flucitozinei poate fi influențată de prezența bolului alimentar, rata

de absorbție a acestora se reduce corespunzător cu cantitatea de alimente ingerată.

Pentru efectul antifungic, flucitozina trebuie să pătrundă în celula fungică cu ajutorul citozin-permeazei și să fie apoi transformată în forma activă, 5-fluorouracil (5-FU) (figura 10), de către enzima citozin-dezaminază, apoi 5-FU este convertit fie în 5-fluorouridintrifosfat, care poate fi încorporat în ARN fungic ceea ce perturbă sinteza proteinelor, fie este transformat în fluorodeoximonofosfat, inhibitor puternic al timidilat-sintetazei care inhibă sinteza ADN-ului fungic.

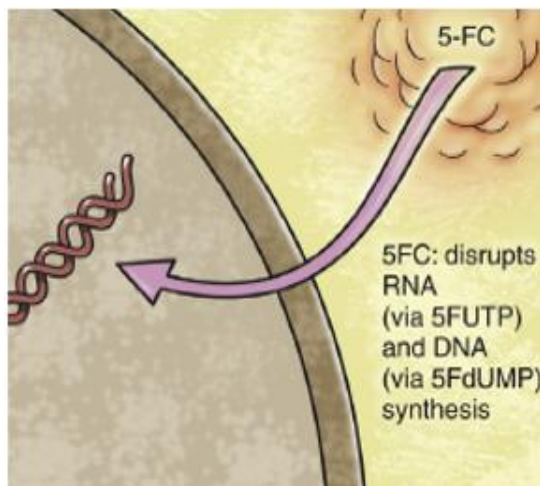


Figura 10. Mecanismul de acțiune al flucitozinei (25)

Prezintă un spectru de activitate antifungică îngust, fiind activă împotriva *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* și *Cladosporium spp.*

Antifungicele topice

Enilconazolul prezintă activitate antimicotică față de *M. canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *Malassezia pachydermatis*. Este utilizat ca antimicotic topic, doză de 4 mg/kg, în dermatofitozele ce afectează bovinele, cabalinele și câinii.

Clotrimazolul este limitat la utilizarea topică, deoarece după administrarea orală metabolismul produce concentrații nedetectabile ale medicamentului în plasmă.

Prezintă un spectru larg cu activitate fungistatică/fungică asupra: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium canis*, dar și asupra *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Coccidioides immitis* și *Cryptococcus neoformans*.

Miconazolul se recomandă în tratamentul dermatofitozelor produse de *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, precum și a altor micoze produse de fungi filamentoși (*Sporothrix schenckii*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor spp.*, *Cladosporium carrionii*), levuri (*Candida albicans*, *Malassezia spp.*), fungi dimorfici (*Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*).

Miconazolul este utilizat în special topic, fiind indicat în tratamentul dermatofitozelor, dar și în otitele micotice sau mixte la carnivore.

Natamicina este un antibiotic polienic ciclic produs de tulpini de *Streptomyces natalensis* care acționează asupra membranei celulei fungice, în mod similar cu amfotericina B. Natamicina este eficientă împotriva *C. albicans*, *A. niger*, *Trichophyton spp.*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium spp.*, *Acremonium spp.*, *Fusarium spp.* și *Pseudallescheria boydii*.

Nistatinul este un antibiotic polienic produs de *Streptomyces noursei*, descoperit la începutul anilor '50.

Este limitat la activitatea topică, deoarece sistemic produce toxicitate. Administrat pe cale orală, nistatinul nu se absoarbe decât în cantități neglijabile iar pe cale parenterală este toxic.

Poate fi administrat oral pentru terapia topică, în caz de candidoză orală sau intestinală. Prezintă un spectru de activitate larg, fiind activ asupra *Candida spp.* cu localizare la nivelul mucoaselor, *A. fumigatus*, *C. neoformans*, *T. beigellii*.

Bibliografie

1. **Bîlbîe V, Pozsgî N.** (1985). Bacteriologie medicală, Vol. II, Ed. Medicală București

2. **Boerlin P and White DG.** 2006, Antimicrobial Resistance and its Epidemiology. Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine 4th edn Prescott, JD Baggot, RD Walker and PM Dowling, Eds. Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA.
3. **Commission Staff Document** (2019) EU Action on Antimicrobial Resistance, Available at: https://ec.europa.eu/health/amr/antimicrobial_resistance_en [Accessed: 15/02/2019]
4. **American Veterinary Medical Association (AVMA)** (2005). Judicious Therapeutic Use of Antimicrobials. Disponibil la: <https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/judicious-therapeutic-use-antimicrobials>
5. **Antimicrobial Resistance Learning Site** The Human Health Impact of Antimicrobial Resistance In Animal Populations <http://amrls.cvm.msu.edu/veterinary-public-health-module/ii.-the-human-health-impact-of-antimicrobial-resistance-in-animal-populations>
6. **Commission Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine** / Orientări pentru utilizarea prudentă a substanțelor antimicrobiene în medicina veterinară (2015/C 299/04)
7. **Cristina RT.** (2018). Evoluția & Implicațiile RAM în lumina On-Health în România. Prezentare EFSA - Focal point Romania, 25.10.20180 http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1975-2018_EFSA_CRISTINA_RT.pdf
8. **Cristina RT.** (2011). Circulația & utilizarea produselor medicinale veterinare. Prezentare SNEC 2011. <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/906-2011-SNEC.1.pdf>
9. **Ghidul național privind utilizarea prudentă a antimicrobienulelor în medicina veterinară**, 2016
10. **ECDC/EMEA JOINT TECHNICAL REPORT**, The bacterial challenge: time to react, 2009 https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf
11. **Cristina R.T.** Orientari privind utilizarea prudentă și rațională a antibioticelor la animale, Cursurile SNEC 2016, http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1634-2016_SNEC_CRISTINA_T_Romeo.pdf
12. **Regulamentul (CE) nr. 1831/2003** privind aditivii din hrana animalelor, cu amendamentele ulterioare;
13. **Giguere, S., Prescott, J.F., Dowling, P.M.** 2013, Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 5th ed., Ed. Wiley Blackwell
14. **Cristina, R.T.** 2006, Introducere în farmacologia și terapia veterinară, Ed. SOLNESS, Timișoara
15. **Baron, S., Galveston, T.X.** 1996, Medical Microbiology 4th ed., Chapter 76, Antifungal Agents: University of Texas Medical Branch at Galveston
16. <https://www.zpb-associates.com/friday5-0504/>
17. **Cohen ML.** (1992). Epidemiology of drug resistance: Implications for a post-antimicrobial era. Science, 257:1050-1055.
18. **Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH.** (2012). Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals and their putative impact on public health: a global perspective. Clin Microbiol Infect, 18:646–655.
19. **Martinez JL.** (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environ Poll, 157: 2893-2902.
20. **EMEA/CVMP/SAGAM/62464/2009** – Joint scientific report of ECDC, EFSA and EMEA on meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in livestock, companion animals and foods EFSA-Q-2009-00612 301, 1-10 /. Disponibil la: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/10/WC500004306.pdf
21. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01196/full>
22. **Cristina T. Romeo, Doma O. Alexandru, Dumitrescu Eugenia, Muselin F, Chirilă B. Andreia,** 2018, Despre evoluția și implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar și evoluția acestui fenomen în România, Medicamentul Veterinar / Veterinary Drug Vol. 12(1)
23. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/antibiotic-resistance>

24. **Di Mambro T., Guerriero I., Aurisicchio L., Magnani M., Marra E.,** 2019, The Yin and Yang of Current Antifungal Therapeutic Strategies: How Can We Harness Our Natural Defenses?, *Front. Pharmacol.*
25. **Sykes, J.E., Papich, M.G.** 2013, Antifungal Drugs. In *Canine and Feline Infectious Diseases*, (pp.87-96), Ed. Elsevier
26. Scorzoni, L., Marcos, C.M., Assato, P.A., Oliveira, H.C., Costa-Orlandi, C.B., Fusco-Almeida, A.M., 2017, Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis, *Front. Microbiol.* 8:36
27. <https://docplayer.net/86503755-Antifungal-agents-dr-ayman-el-sahar.html>
28. **Mareș, M., Năstasă, V., Moraru, R.** 2013, *Terapia antifungică în medicina veterinară*, Ed. PIM, Iași
29. **Corneli, O., Călin, M.** 2016, *Antibiotice antifungice: clasificare, mecanisme de acțiune și mecanisme de rezistență*, Ed. MEDICHUB MEDIA, București
- Nota:** alături de bibliografia citată, la redactarea acestui articol au fost citate integral sau parțial pasaje din următoarele materiale:
- Cristina T. Romeo, Doma O. Alexandru, Dumitrescu E, Muselin F, Chirilă B.A. (2018).** Despre evoluția și implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar și evoluția acestui fenomen în România. *Medicamentul Veterinar /Veterinary Drug*, 2018, 12(1):4-49. Identificabil la: [http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1948-2018_VD_12\(1\)_ART2.RO.pdf](http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1948-2018_VD_12(1)_ART2.RO.pdf)
- Cristina T. Romeo (2018).** Evoluția & Implicațiile RAM în lumina On-Health în România, prezentare EFSA - Focal point Romania. Hotel Ramada Plaza, București. 25.10.2018. Identificabil la: http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1971-2018_EFSA_CRISTINA_RT.pdf
- Cristina T. Romeo (2018).** Evoluția / implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar. Prezentare ASAS 06.06.2018. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1934-2018-ASAS.pdf> și <http://www.asas.ro/wcmqs/sectii/medicinavet/erinara/documente/Punct%20de%20vedere%20privind%20rezidenta%20la%20medicament.pdf>
- Cristina T. Romeo.** Orientari privind utilizarea prudentă și rațională a antibioticelor la animale. Cursurile SNEC 2016. Identificabil la: http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1634-2016_SNEC_CRISTINA_T_Romeo.pdf
- Cristina T. Romeo (2010).** Suport curs farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/890-Suport%20curs.II.pdf>
- Cristina T. Romeo (2012).** Implicațiile uzului de antibiotice și despre chinolone în terapia veterinară. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1122-2012-IOSUD-SDMVCurs.pdf>
- Cristina RT (2006).** Introducere în farmacologia și terapia veterinară, Ed. Solness, Timișoara.
- Cristina RT, Chiurciu V (2010).** Elemente de farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară, Ed. Brumar Timișoara
- Doma AO, Chirila AB, Dumitrescu E, Muselin F, Cristina RT (2015).** The importance of antibiotic resistance evolution in Western Romania's swine units. *J Biotechnol*, 208 Suppl., 2015, S102. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.320
- ECDC (2010).** European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm.
- EFSA - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2012 –** The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2598 [233 pp], doi:10.2903/j.efsa.2012.2598.
- EPRUMA 2018 -** Best-practice framework for the use of antibiotics in food-producing animals Disponibil la: file:///E:/Downloads/Responsible%20Use%20of%20Anthelmintics_%20EPRUMA_FINAL%20.pdf

Lista O.I.E a agentilor antimicrobieni importanti în medicina veterinară
http://cmvro.ro/files/download/noutati/Lista_OIE_a_agentilor_antimicrobieni.pdf

Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. Trends from 2010 to 2015 (2017). Seventh ESVAC report 30 October 2017 (document EMA/184855/2017)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf

World Health Organisation (WHO) (2015). Data Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation. (ISBN 978-92-4-154940-0). Disponibil la:
<http://www.who.int/antimicrobialresistance/publications/surveillancesystem-manual/en/>

World Health Organisation (WHO) (2015). Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance ISBN 978-92-4-156494-6 Disponibil la:
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/163468/9789241564946_eng.pdf?sequence=1

World Health Organization (WHO) (2001). Antibiotic resistance: synthesis of

recommendations by expert policy groups. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.10

World Health Organization Study Group (WHO) (2002). Future trends in veterinary public health. World Health Organ Tech Rep Ser., 907:1-85.
http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CD_S_CSR_DRS_2001.10.pdf

Sykes, J.E., Papich, M.G., 2013, Antifungal Drugs. In Canine and Feline Infectious Diseases, (pp.87-96), Ed. Elsevier

Scorzoni, L., Marcos, C.M., Assato, P.A., Oliveira, H.C., Costa-Orlandi, C.B., Fusco-Almeida, A.M., 2017, Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis, Front. Microbiol. 8:36

Riviere, J.E., Papich, M.G., 2018, Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 10th ed., chapter Antifungal and Antiviral Drugs, Ed. Wiley Blackwe



**PRODUSE ALE
INSTITUTULUI DE
CERCETARE-DEZVOLTARE
PENTRU APICULTURĂ**





VARACHET-FORTE produs medicinal de uz veterinar: se utilizează la albine pentru combaterea varroozei, parazitoză externă produsă de acarianul *Varroa destructor*.
Se administrează sub formă de fumigații prin urdiniș, iar dozarea produsului se face în funcție de tipul de stup folosit.



MAVRIROL produs medicinal de uz veterinar: se utilizează la albine pentru combaterea varroozei și braulozei, parazitoze externe produse de acarianul *Varroa destructor* și dipterul *Braula coeca*.
Se administrează sub formă de benzi textile impregnate cu substanță activă, care se introduc în stup transversal deasupra ramelor.

SOLUȚIA EFICIENTĂ PENTRU PĂSTRAREA SĂNĂȚII FAMILIILOR DE ALBINE

Dezinfectanți
pentru suprafețe
și obiecte

14 ani
de eficiență

PURSEPT

BIOCID

VIRULICID, BACTERICID
FUNGICID, MICOBACTERICID, TUBERCULICID

300 cpr.



Tablete efervescente cu dicloroizocianurat de sodiu
Grupa principală 1 TP2, TP4, TP5

Compoziție

1 comprimat de Pursept conține:
Dicloroizocianurat de sodiu 2,7 g (84 %);
Excipienți (bicarbonat de sodiu, acid citric,
agenți de comprimare) ad 3,2 g (16 %)
O tabletă de 3,2 g eliberează 1,5 g clor activ.

200 cpr.



50 cpr.



vrac



Acțiune: Biocid din grupa principală 1, TP 2, 4, 5 produsul Pursept are un efect virulicid, bactericid asupra germeilor Gram pozitivi și Gram negativi, micobactericid și fungicid.

Utilizare: – dezinfectia apei din fântâni; – dezinfectant pentru industria alimentară pentru dezinfectia echipamentului, recipientelor, ustensilelor de consum, suprafețelor sau conductelor aferente producției, transportului, depozitării și consumului de alimente sau băuturi, pentru oameni și animale; - dezinfectia instrumentarului și ustensilelor din oțel inoxidabil cu încărcătură organică redusă; - dezinfectia instrumentarului și ustensilelor din oțel inoxidabil, murdare, cu încărcătură organică ridicată; - decontaminarea generală a suprafețelor cu încărcătură organică redusă; - decontaminarea generală a suprafețelor murdare cu încărcătură organică ridicată; - dezinfectia ustensilelor de laborator și recipientelor de laborator cu încărcătură organică redusă; - pentru uz general: dezinfectia și albirea lenjeriei din bumbac.

Romvac
Company

Modalități de instalare a rezistenței la antimicrobiene și studierea eficacității antimicrobielenor

Ways to install antimicrobial resistance and study the effectiveness of antimicrobials

Romeo Teodor Cristina, Răzvan Florin Moruzi, Eugenia Dumitrescu, Florin Muselin, Alexandru Octavian Doma

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

rtcristina@yahoo.com

Cuvinte cheie: *antiinfecțioase,*
Keywords: *anti-infective,*

Rezumat

Antibiorezistența a apărut mai ales prin folosirea antibioticelor ca biostimulatori, în conservarea alimentelor de natura animală sau cel mai des prin administrarea antibioticelor nerațional, fără rețetă și antibiogramă. Articolul prezintă modalitățile de instalare a rezistenței la antimicrobiene și evaluează eficacitatea antimicrobielenor (antibiotice și antifungice). Sunt prezentate principalele modalități de răspândire și instalare a rezistenței precum și urmările acesteia la nivel global, mecanismele transmiterii rezistenței în natură și testele de evaluare a eficacității antiinfecțioaselor (biologice, fizico-chimice, in vitro, tehnicile moleculare etc.).

Abstract

Antibiotic resistance has emerged mainly through the use of antibiotics as biostimulators, in the preservation of animal foods or most often through the administration of antibiotics irrationally, without a prescription and antibiogram. The article presents the ways to install antimicrobial resistance and evaluates the effectiveness of antimicrobials (antibiotics and antifungals). The main ways of spreading and installing resistance as well as its consequences globally, the mechanisms of transmission of resistance in nature and tests to evaluate the effectiveness of anti-infectives (biological, physico-chemical, in vitro, molecular techniques, etc.) are presented.

Introducere

Rezistența la antimicrobiene (RAM) reprezintă o problemă majoră, cu implicații largi, fiind considerată un fenomen cu risc zoonotic.

Antimicrobienele au revoluționat practica medicală, astfel afecțiuni care în trecut erau mortale au devenit obișnuite și pot fi tratate în scurt timp. Acest avantaj, în prezent este supus riscului în special din cauza utilizării excesive sau inadecvate a antimicrobielenor, ceea ce a dus la creșterea cazurilor de apariție și de răspândire a bacteriilor multirezistente.

Germenii rezistenți sunt sau devin „indiferenți” („toleranți”) la antibiotice, ei sustrăgându-se prin variate modalități efectului antibacterian scontat, după administrarea de doze uzuale, netoxice. După expunerea la un

antibiotic, bacteria este selectată pentru rezistență rezultând astfel supravieuirea celor mai rezistente tulpini (FEDESA, 2000).

Deși s-a prevăzut evoluția rezistenței față de aceste medicamente, nu au fost intuite mecanismele prin care genele care conferă rezistență se vor răspândi. După Heinemann (1999), agenții antimicrobieni se apropie de sfarsitul eficienței lor.

RAM este o consecință a evoluției, a selecției naturale și mutației genetice, această mutație fiind ulterior transmisă conferind rezistență. Într-o lume unde nevoia de proteină de origine animală a crescut imens datorită creșterii logaritmice a populației, în mod logic și industria creșterii animalelor de rentă a beneficiat de uzul masiv al antibioticelor. Practicile de producție la animale au evoluat

de-a lungul anilor pentru a satisface această nevoie de proteine alimentare ale populației.

Astfel, fermele au devenit complexe foarte mari și au folosit intensiv practicile moderne de producție pentru a împinge ratele de creștere a animalelor de rentă către nivelul lor maxim.

De asemenea, rețelele practice și gestionarea incorectă au exacerbât situația existentă azi (WHO, 2002).

În ultimele decade, rezistența la produsele antiinfecțioase, antibiotice și antimicotice, a ocupat poziții dominante în preocupările legate de sănătatea publică din agenda Europeană.

Antibiorezistența a fost semnalată la câțiva ani, după ce, începând cu anii 50, antibioticele au început să fie utilizate în profilaxia și terapia bolilor infecțioase la animalele de fermă.

Acest fenomen s-a amplificat progresiv, ca urmare a utilizării (prima dată a tetraciclinelor, dar nu numai), ca promotori de creștere la păsări și suine. Consumul de antimicrobiene la animalele de la care se obțin produse alimentare este mult mai mare decât la oameni, atât în termeni de consum total, cât și în termeni de doze administrate în raport cu greutatea lor.

Agențiile europene au recunoscut că reducerea utilizării de antimicrobiene de uz veterinar este un deziderat pentru a limita RAM.

Conform unui raport ONU „*mediul natural devine un rezervor al reziduurilor de antibiotice, agenți patogeni rezistenți și alte molecule cu proprietăți antimicrobiene care sporesc răspândirea genelor rezistente în mediul microbial*” (1).

Un fapt esențial este că, animalele pot servi drept medii, rezervoare și diseminatori de tulpini rezistente și/sau ale genelor antibioretizente. Utilizarea imprudentă a antimicrobienelelor la animale alături de rețele practice poate duce finalmente la creșterea morbidității și mortalității. Eficacitatea redusă a antibioticelor duce la creșterea costurilor de asistență medicală și a crescut mult potențialul pentru transportul și diseminarea agenților patogeni cu apariția facilitată de patogeni ai rezistenței

Parlamentul European a aprobat o serie de restricții privind utilizarea antibioticelor

pentru animalele de fermă sănătoase, în încercarea de a limita răspândirea bacteriilor rezistente la antibiotice. Noua legislație, care va fi implementată până în 2022, interzice utilizarea antibioticelor destinate oamenilor în medicina veterinară, precum și utilizarea fără prescripție medicală a antibioticelor pentru animale. Veterinarii vor fi nevoiți să ofere date privind vânzările de antibiotice, iar alimentele importate vor trebui să îndeplinească standardele UE (1).

Răspândirea și transmiterea genelor rezistenței este încrucișată (vezi fig. 1) și a fost deja demonstrată ca fiind posibilă între:

- om - animal
- animal – om
- animal – mediu

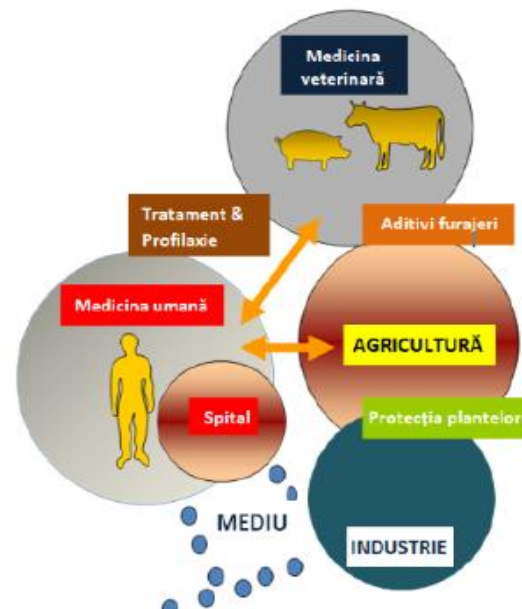


Figura 1. Răspândirea și transmiterea rezistenței

În acest sens este esențial să se rețină că în respectul One Health, un tratament antimicrobian veterinar durabil trebuie să fie legat de problemele de sănătate publică și nu de cele de sănătate animală, vezi fig. 2.

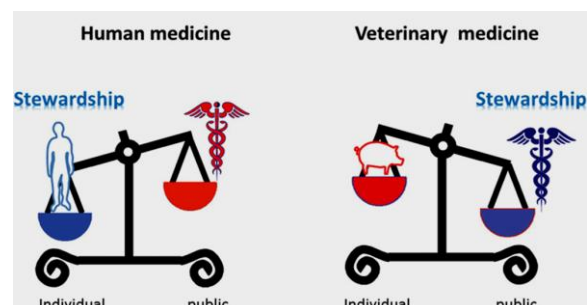


Figura 2. Balanța dintre medicina veterinară și umană

a. Modalități de răspândire, instalare a rezistenței și urmările acesteia

Utilizarea iresponsabilă a antibioticelor la animalele de fermă, a dezvoltat rezistența la animale sau la persoane care consumă carne și subproduse. Antibio rezistența a apărut mai ales prin folosirea antibioticelor ca biostimulatori, în conservarea alimentelor de natura animală sau cel mai des prin administrarea antibioticelor nerațional, fără rețetă și antibiogramă. Rezistența este un fenomen ce se răspândește la nivel mondial, conform CDC (fig. 3).

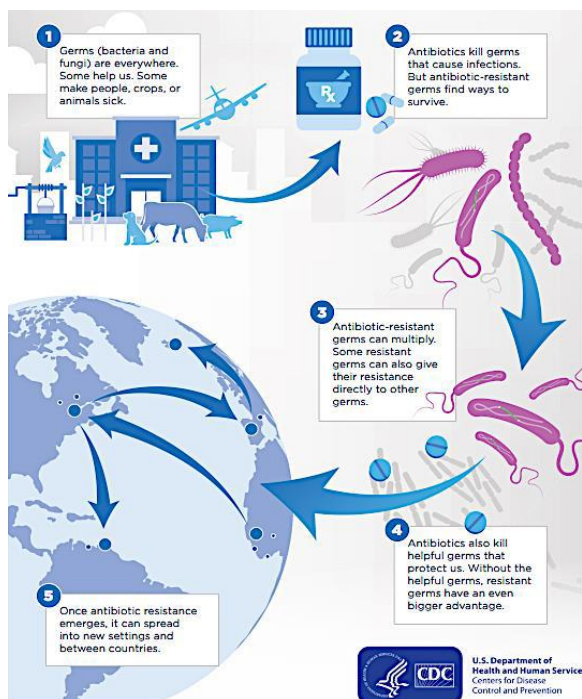


Figura 3. Răspândirea RAM la nivel mondial (16)

Riscurile RAM sunt reprezentate de faptul că infecțiile sau rănilor simple, precum și diferite proceduri medicale de rutină se bazează pe tratamentul cu antibiotice, astfel speranța de viață poate să scadă (vezi fig. 4).

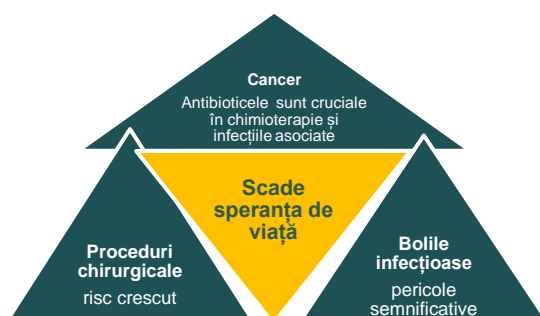


Figura 4. Riscurile RAM

Condițiile care determină apariția rezistenței la antibiotice sunt:

- prin selecție, genomul bacterian a devenit de aprox.1000 de ori mai mic decât genomul animal / uman. Acest fapt este datorat „raționalizării genomului”,
- între bacterii există concurență acerbă pentru resurse,
- pentru a se menține și reproduce, genomul bacterian are nevoie de energie și resurse. Un genom mare, necesită mai multă energie pentru a fi păstrat în funcțiune și duplicare.

Cel mai adesea, procesul de selecție (vezi fig. 5) este exacerbat de factorii umani prin:

- utilizarea inadecvată a medicamentelor în medicina umană și veterinară.
- condițiile de igienă deficitară
- practicile medicale curente greșite
- erorile în cadrul lanțului alimentar

Tehnicile de screening genomic, nu au reușit încă să livreze promisiunea lor de “revoluție” în descoperirea de noi antibiotice, acest lucru a condus în timp la apariția de “superbugs”, adică bacterii rezistente la majoritatea antibioticelor utilizate.

Exemple clasice: *S. aureus* rezistent la meticilină (MRSA), *M. tuberculosis* super-rezistent la antibiotice.

Apariția rezistenței la fluoroquinolone, după infecții banale cu *Campylobacter* și *E. coli* la oameni este clar urmarea utilizării acestora în furajele animalelor, cu transmiterea bacteriilor rezistente la om prin intermediul cărnii și produselor animale.

Cele mai multe rapoarte se referă la tendința de creștere a utilizării substanțelor antimicrobiene folosite în doze sub-terapeutice la animalele de rentă și păsări.

Atât dovezile moleculare cât și cele epidemiologice indică faptul că prevalența rezistenței la antibiotice printre oameni a fost declanșată prin introducerea enrofloxacinii în furajarea păsărilor, fapt care a determinat FDA în 2011 să interzică utilizarea acestui medicament la păsări.

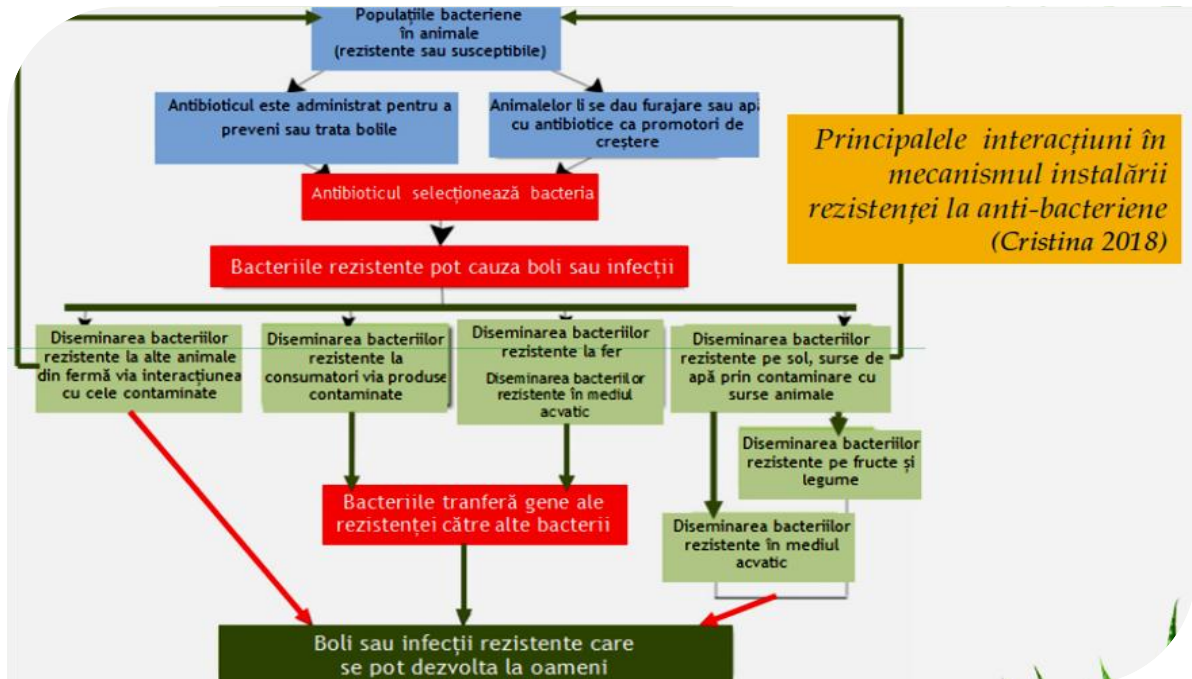


Figura 5. Principalele interacțiuni în mecanismul instalării rezistenței

În România principalele cauze ce favorizează apariția fenomenelor de rezistență la medicamente sunt:

- sub-dozarea/dozarea inadecvată a substanțelor active
- tratamentul bolilor virale la animale cu antibiotice
- administrarea la orice tratament a antibioticelor / antiparazitarelor cu spectru larg, în timp ce medicamentele cu spectru îngust ar fi suficient.

Prescrierea excesivă a antibioticelor nu este singura sursă de antibiotice care poluează mediul. Încă din anii 70, antibioticele puteau fi găsite în carnea bovinelor, porcinelor și păsărilor, aceleași antibiotice fiind identificate mai apoi în sistemele de apă municipale și freatice sau în sol, cu urmările sale dramatice.

Antibioticele administrate animalelor nu sunt complet absorbite de către acestea.

În funcție de antibiotic, între 30 și 90% din antibiotic poate fi excretat prin urină sau fecale în stare bioactivă, chiar intacte sau sub formă de metaboliți antibiotici, care-și pot păstra mai departe activitatea antimicrobiană.

Antibioticele administrate animalelor ajung adesea în sol și apă prin deșeurile medicale și

medicamentele eliminate necorespunzător sau prin praful provenit din unitățile de creștere industrială (vezi fig. 6).

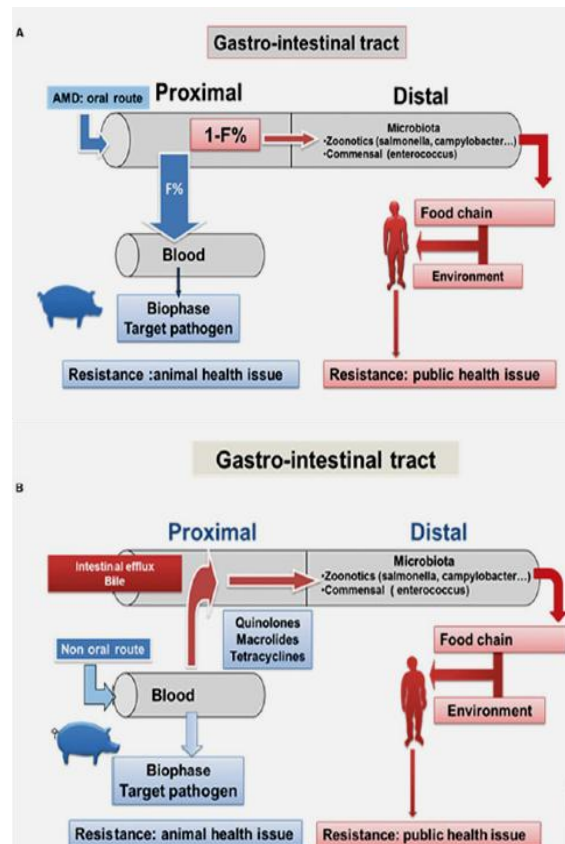


Figura 6. Impactul administrării antibioticelor pe cale orală (A) și sistemică (B)(2)

După administrarea orală de antibiotice) microbiota intestinală distală (ce cuprinde agenți patogeni zoonotici și flora comensală) va fi expusă la fracția de medicament neabsorbit în segmentul proximal digestiv, ceea ce crește presiunea selectivă locală și astfel crește densitatea bacteriilor și deci, frecvența genelor rezistenței.

Aceste organisme și genele pot ajunge la om, prin mai multe căi și, în cele din urmă, vor avea acces la microbiota TGI (tract gastro-intestinal) uman prin calea metabolică principală, lanțul alimentar.

După administrarea sistemică (vezi fig. 6) majoritatea medicamentelor a.u.v. sunt eliminate, și ajung în TGI, fie prin secreția biliară, fie prin clearance-ul intestinal, astfel apar concentrații ale farmaconului capabile să selecteze organisme rezistente.

În plus, impactul asupra microbiotei TGI animal al antibioticelor nu se limitează doar la fracția aerobă - aprox. 1-2% din totalul microbiotei; (de obicei *Escherichia coli* și *E. faeciens* - considerate bacterii santinelă) - poate, de asemenea, genera un impact negativ asupra populației anaerobe (care reprezintă o secvență mult mai mare).

Bacteriile rezistente și genele rezistenței sunt eliberate în mediu (vezi fig.7) prin intermediul excreției fecale.

Antibioticele care au fost identificate în apele de suprafață au inclus adesea: macrolide, sulfamide, tetraciline, cloramfenicoli, clortetraciclina, sulfametazina, lincomicina, trimetoprimul, sulfadimetoxinul, sulfametazin

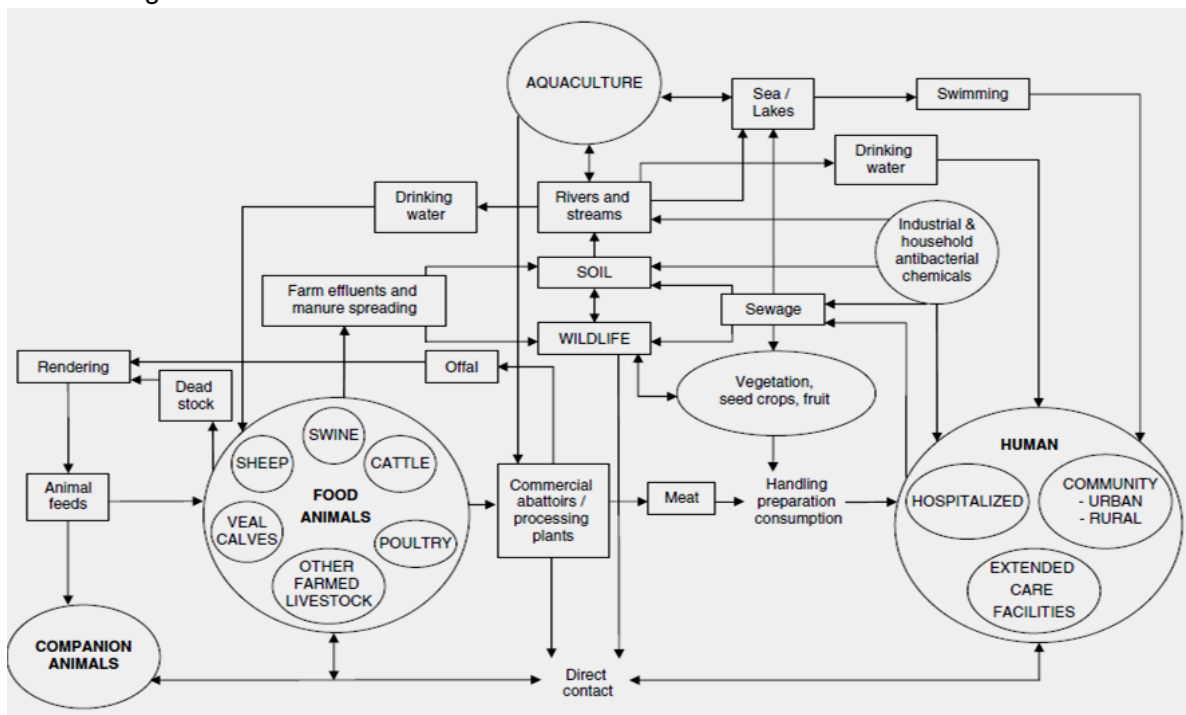


Figura 7. Mecanismul transmiterii rezistenței în natură

Rezistența la antifungice a devenit o preocupare semnificativă pentru medicina veterinară, rezistența la medicamentele antifungice disponibile în prezent se poate dezvolta secundar mecanismelor dobândite ca urmare a expunerii la aceste medicamente (11).

Rezistența la medicamentele antifungice poate fi intrinsecă sau dobândită.

Rezistența intrinsecă este o caracteristică moștenită a unei specii sau tulpini. În schimb, rezistența dobândită apare atunci când un izolat, sensibil anterior dezvoltă un fenotip rezistent ca urmare a unui tratament prelungit cu antifungice (9).

Mecanismul asociat cu rezistența dobândită depinde de modul de acțiune al clasei de medicamente antifungice și include absorbția redusă de medicamente, eliminarea

de medicamente prin pompe de eflux sau afinitatea redusă a enzimelor țintă.

Spre deosebire de celulele bacteriene, celulele fungice intacte nu preiau ușor ADN-ul exogen. Drept urmare, rezistența la medicamente transferabile nu a fost descrisă printre taxonii fungici, iar răspândirea rezistenței a fost considerabil mai lentă decât cea observată la bacterii.

Prevenirea apariției și răspândirii ciupercilor rezistente depinde de utilizarea tratamentului local mai degrabă decât cel sistemic (reducând astfel expunerea generală a florei fungice a animalului la agenții antifungici). În plus, terapia antifungică combinată este o strategie bine recunoscută pentru prevenirea apariției rezistenței la flucitozină (8).

Rezistența la medicamente antifungice poate apărea prin diferite mecanisme ale agenților fungici.

Acestea pot include: mutații în cadrul genei care codifică enzima țintă care duce la modificări în secvența de aminoacizi, exprimarea crescută a enzimei țintă prin transcrierea exagerată a genei pe care o codifică, concentrații reduse ale antifungicelor din celulele fungice din cauza efluxului medicamentos, modificări ale căii de biosinteză, ceea ce duce la scădere în producerea țintei medicamentelor antifungice (12).

Câinii sunt considerați a fi unele dintre potențialele rezervoare ale rezistenței antimicrobiene care poate fi transmisă la om prin contact direct sau indirect. Numărul de persoane care trăiesc cu animale de companie, în special câini, a crescut în întreaga lume în ultimele decenii (13).

Deși prevalența rezistenței antifungice nu este la nivelurile observate pentru unele bacterii împotriva diferitelor antibiotice, opțiunile de tratament pentru infecțiile fungice invazive sunt limitate. În mod clar, sunt necesare noi strategii de tratament pentru a rezolva această problemă, pe lângă depășirea efectelor toxice / efectelor adverse și a interacțiunilor medicamentoase asociate cu antifungicele disponibile în prezent, care pot limita eficacitatea terapiei (14).

Arsenalul nostru limitat de antifungice este în continuare amenințat de dezvoltarea tulpinilor de ciuperci rezistente la multe medicamente și apariția agenților patogeni rezistenți intrinsec (15).

În general, nivelul de rezistență la agenții antifungici este relativ scăzut, dar rămâne o provocare serioasă a managementului clinic pentru pacienții individuali, cu risc ridicat și cei cu micoze persistente (10).

b. Studiarea eficacității antimicrobiene

Pentru determinarea eficacității substanțelor antimicrobiene se cunosc mai multe teste, considerate ca fiind standard în multe țări, care permit analiza antibioticelor.

Cele mai importante testări sunt:

1. Testele biologice

Testele biologice permit o stabilire precisă și sensibilă a antibioticelor.

Metoda difuzimetrică este considerată o tehnică uzuală pentru β -lactamine, unde limitele detectabile sunt de ordinul ng./ml. (10^{-9} ng/ml).

Marea majoritate a acestor teste depind de utilizarea unui mediu cu agar, înșămânțat cu o tulpină bacteriană selecționată, peste care sunt plasate diluții diferite ale antibioticului în testare.

Plăcile sunt incubate la 37°C, după ce se face citirea, în funcție de zona de liză determinată de către antibioticul testat, raportată adesea la un antibiotic standard.

2. Testele fizico-chimice

Metodele cele mai folosite pentru testarea antimicrobiene sunt: spectrofotometria, spectrofotofluometria și mai recent cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC).

Aceste teste sunt în general mai puțin sensibile, comparativ cu testele biologice, deoarece sunt tributare în mare măsură de metodele de preparare și purificare a probelor.

Dintre acestea HPLC este cea mai versatilă și cu perspective de utilizare.

3. Testele *in vitro*

Datorită faptului că toate antibioticele au limitări cu privire la activitatea asupra bacteriilor pe care le afectează (fie datorită activității lor intrinsece, fie datorită rezistenței acumulate) cel mai adesea este de dorit de a se determina sensibilitatea unei tulpini izolate de la animale bolnave, în ideea de a selecta conduita terapeutică cea mai corectă.

Metoda discului sau Kirby Bauer

Este mai degrabă un test calitativ, care se bazează pe aplicarea unor discuri din hârtie impregnate cu antibiotic (vezi fig. 8), plasate pe plăcuțe Petri inoculate.

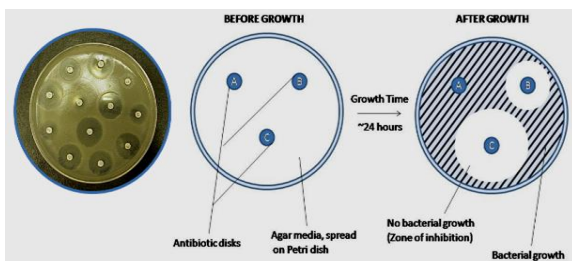


Figura 8. Antibiogramă – Metoda Kirby Bauer (17)

Dezavantajul metodei este necesitatea izolării de culturi pure pentru testare, ceea ce înseamnă o amânare cu 24-36 ore a rezultatelor. În condiții de teren acest timp este deci prea lung, tardiv pentru animalele care au nevoie de tratamentul optim. Rezolvarea (frecvent aleasă de practicienii) constă în începerea tratamentelor cu antibiotice cu spectru larg, fără a mai aștepta rezultatele. Testarea difuziei pe disc (Kirby-Bauer) pentru antifungice se realizează pe plăcuțe Petri cu mediul de cultură Mueller-Hinton, de 4 mm grosime, folosind discuri de hârtie impregnate cu antifungice (CLSI, 2006a, b).

Metodele bazate pe diluții

Testarea sensibilității prin diluții se poate face folosind bulion sau agar și furnizează date cantitative (MIC).

Se testează diluții duble de antimicrobiene (0,12 $\mu\text{g/ml}$, 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$). Întotdeauna în testare se include un control fără substanțe antimicrobiene (8).

Concentrația minim inhibantă (MIC)

Este un test care dă măsura cantitativă a unei populații bacteriene la un anumit antibiotic. Această metodă este considerată cea mai uzuală metodă standard de analiză a eficienței unui antibiotic.

MIC se obține prin creșterea unor microorganisme în concentrații succesive de antibiotic, astfel cele mai mici concentrații care vor opri creșterea bacteriilor vor fi considerate MIC, (vezi fig. 9).

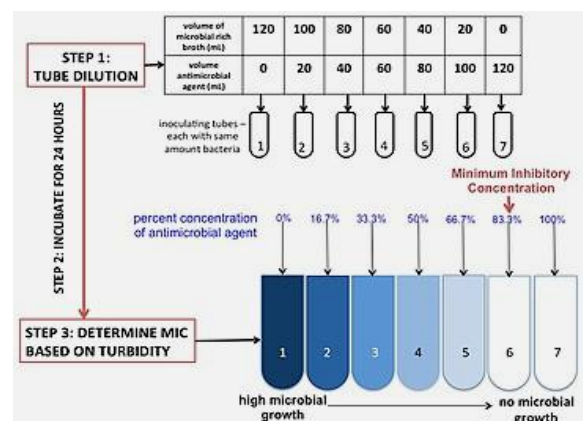


Figura 9. Metoda diluțiilor seriata și determinarea MIC pe baza turbidității

Cifra obținută nu va fi considerată absolută pentru că e afectată de multe necunoscute (ex. numărul microorganismelor inoculate la începerea testării (care trebuie să fie în jur de 10^5 bacterii/ml).

Concentrația bactericidă minimă (MBC)

În acest caz sunt utilizate concentrații mai mari, ce mai apoi vor fi adăugate la o nouă serie de antibiotic. După incubare tuburile sunt reînsămânțate în medii potivite și comparate cu o subkultură a tuburilor martor dinainte de incubare, putându-se obține trei variante:

- creștere similară cu tuburile martor = acțiune bacteriostatică
- creștere dispartă = acțiune bactericidă incompletă
- mediu steril (nici o creștere) = acțiune bactericidă

Cele mai mici concentrații care vor da acest rezultat vor fi considerate MBC pentru antibioticul studiat, împotriva unei anumite populații bacteriene.

Concentrația minimă de antibiotic (MAC)

Studiile au arătat că antibioticele *in vivo* pot exercita activitate terapeutică la concentrații mult mai mici decât MIC, și, de aceea, interpretări ca, de exemplu, concentrațiile serice, nu pot fi luate ad literam pentru a exprima eficacitatea unui antibiotic.

MAC a fost definit ca fiind concentrația antibioticului ce va reduce creșterea unui organism *in vitro* cu un factor de 10 (ex. 1 log.). Valoarea MAC trebuie să fie o pătrime sau o zecime din valoarea MIC, fiind dependentă de antibiotic și organism.

Existența efectelor benefice la concentrațiile mici explică de ce doze relativ mici, sub-terapeutice pot fi neașteptat de eficiente clinic.

Kituri pentru identificarea și determinarea rezistenței la antifungice

Exemple de kituri pentru identificarea și determinarea rezistenței la antifungice sunt **Candifast**, **Fungifast** și **Fungitest** (3).

Kiturile **Candifast** și **Fungifast** combină identificarea și testarea rezistenței la antifungice a principalelor levuri patogene.

Testele se efectuează în galerii a câte 20 de godeuri, gata de utilizare, care se însămânțează din același inocul (3, 4).

Trusa Candifast (vezi Fig. 10) permite identificarea principalelor levuri patogene precum și testarea rezistenței acestora la diferite antifungice utilizate în tratamentul micozelor superficiale.



Figura 10. Kit Candifast (4)

Kit-ul de identificare se bazează pe teste de fermentare și pe determinarea prezenței ureazei. Acest test poate identifica 8 specii de

Candida și poate preciza dacă tulpina testată face parte din genurile *Trichosporon*, *Geotrichum* sau *Rodothorula*, dar fără a putea preciza genul sau specia (4).

Fungifast (vezi fig. 11) permite identificarea următoarelor levuri: *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* (4).



Figura 11. Kit Fungifast (4)

Citirea rezultatelor se efectuează cu ajutorul schemei de interpretare colorată, inclusă în trusă, iar pentru interpretare sunt disponibile un tabel de identificare și un sistem de codificare [4].

Fungi-Test este un kit care testează sensibilitatea la următoarele antifungice: amfotericina B, ketoconazol, miconazol, itraconazol, fluconazol și flucitozină.

Testul poate preciza dacă tulpina este sensibilă, intermediar sensibilă sau rezistentă prin testarea sensibilității la două concentrații diferite pt. fiecare antifungic (5).



Figura 12. Kit Fungitest (18)

Etest, (cunoscut înainte ca Epsilometer test) fabricat de bioMérieux, este un kit de diagnostic *in vitro* manual, utilizat pentru a determina MIC (concentrația minimă inhibitorie) și dacă o tulpină bacteriană sau

fungică este sau nu este susceptibilă la acțiunea unui antimicrobian specific (7).

Ettest este un strip inert și non-poros din plastic, cu un gradient de antimicrobian predefinit, care acoperă un interval de concentrație continuă, pentru determinarea valorilor MIC a unei game largi de agenți antimicrobieni, în $\mu\text{g} / \text{ml}$ (7) (vezi fig. 13).

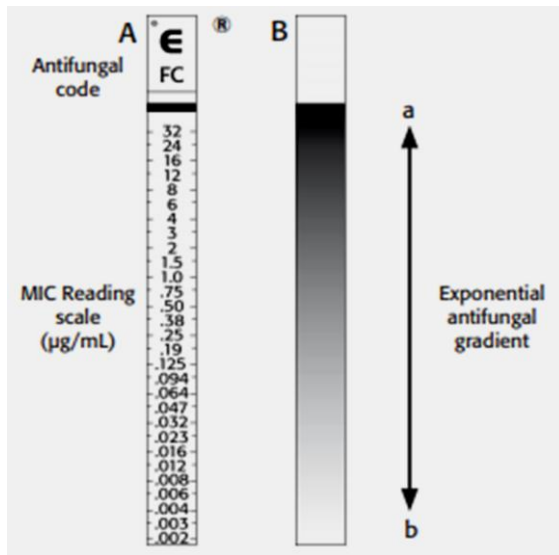


Figura 13. Strip E-test

A-scala de citire a MIC, B- Gradientul agentului antifungic cu concentrație maximă (a) și minimă (b)

O parte a stripului (A) cuprinde scala de citire a MIC în $\mu\text{g} / \text{ml}$ și un cod de două sau trei litere pentru a desemna identitatea agentului antifungic.

Un gradient predefinit, exponențial al agentului antifungic, uscat și stabilizat, este pe cealaltă parte a benzii (B), cu concentrația maximă la a și minimumul la b

Gradientul acoperă un interval de concentrație continuă pe 15 diluții de două ori ale unei metode MIC convenționale (7).

Tehnicile moleculare

Tehnicile moleculare oferă o evaluare mai rapidă și mai precisă a rezistenței primare și secundare decât metodele clasice.

Aceste aplicații înlocuiesc treptat sau completează testele bazate pe culturi, testele biochimice și imunologice pentru detectarea unei game largi de microorganisme.

Pentru animale și oameni genele care codifică rezistența la antimicrobiene au fost

detectate prin tehnici de biologie moleculară, respectiv prin: Polimerase Chain Reaction (PCR) și Real-time PCR (9, 10).

Bibliografie

- https://www.eca.europa.eu/lists/ecadocuments/sr19_21/sr_antimicrobial_resistance_ro.pdf
- <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01196/full>
- Costache, C., Colosi, I., Junie M.** Specii de Candida izolate din infectiile micotice, FMV Cluj-Napoca.
- <https://clinilab.ro/microbiologie/diagnostic-micologic>
- Iulian, O.** 2015, Abordări contemporane în sensibilitatea și rezistența antifungică, Buletinul AȘM. Științele vieții. Nr. 3(327).
- <https://www.bio-rad.com/en-ch/sku/60780-fungitest-kit?ID=60780>
- <https://www.biomerieuxdiagnostics.com/etes-tr-antimicrobial-resistance-detection-ard>
- Giguere S., Prescott J.F., Dowling P.** 2013, Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine Fifth Edition, Ed. Wiley Blackwell
- Cristina, R.T.** 2006, Introducere în farmacologia și terapia veterinară, Ed. SOLNESS, Timișoara
- Perlin S. David,** 2014, Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? *Curr Opin Infect Dis.* 22(6): 568–573.
- Wiederhold, N.P.,** 2017, Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat, *Infect Drug Resist.*, Aug 29; 10:249-259.
- Syedmojtaba S., Bosco S.M, Hoog S., Ebel F., Elad D., Gomes R., Jacobsen I., Jensen H., Martel A., Mignon B., Pasmans F., Piecková E., Rodrigues A.M., Singh K., Vicente V., Wibbelt G., Wiederhold N., Guillot J.** 2018, Fungal infections in animals: a patchwork of different situations, *Med Mycol.*; 56(Suppl 1): S165–S187
- Bourély, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Leblond, A.** 2019, Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis, *Epidemiology & Infection*, vol.4, Cambridge core.
- Wiederhold, N.P.** 2017, Antifungal resistance: current trends and future

- strategies to combat, *Infect Drug Resist.*, Aug 29; 10:249-259.
15. **Revie, N., Iyer, K., Robbins, N., Cowen, L.** 2018, Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact, *Curr Opin Microbiol.* ;45:70-76.
 16. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistancehappens.html>
 17. https://en.wikipedia.org/wiki/Disk_diffusion_test
 18. <https://www.diagnostics-bio-rad.com/wp-content/uploads/2017/01/Fungitest.pdf>
- Nota:** alături de bibliografia citată, la redactarea acestui articol au fost citate integral sau parțial pasaje din următoarele materiale:
- Cristina T. Romeo, Doma O. Alexandru, Dumitrescu E, Muselin F, Chirilă B.A. (2018).** Despre evoluția și implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar și evoluția acestui fenomen în România. *Medicamentul Veterinar/ Veterinary Drug*, 2018, 12(1):4-49. Identificabil la: [http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1948-2018_VD_12\(1\)_ART2.RO.pdf](http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1948-2018_VD_12(1)_ART2.RO.pdf)
- Cristina T. Romeo (2018).** Evoluția & Implicațiile RAM în lumina On-Health în România, prezentare EFSA - Focal point Romania. Hotel Ramada Plaza, București. 25.10.2018. Identificabil la: http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1971-2018_EFSA_CRISTINA_RT.pdf
- Cristina T. Romeo (2018).** Evoluția / implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar. Prezentare ASAS 06.06.2018. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1934-2018-ASAS.pdf> și <http://www.asas.ro/wcmqgs/sectii/medicinaveterinara/documente/Punct%20de%20vedere%20privind%20rezidenta%20la%20medicament.pdf>
- Cristina T. Romeo.** Orientari privind utilizarea prudentă și rațională a antibioticelor la animale. Cursurile SNEC 2016. Identificabil la: http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1634-2016_SNEC_CRISTINA_T_Romeo.pdf
- Cristina T. Romeo (2010).** Suport curs farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/890-Suport%20curs.II.pdf>
- Cristina T. Romeo (2012).** Implicațiile uzului de antibiotice și despre chinolone în terapia veterinară. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1122-2012-IOSUD-SDMVCurs.pdf>
- Cristina RT (2006).** Introducere în farmacologia și terapia veterinară, Ed. Solness, Timișoara.
- Cristina RT, Chiurciu V (2010).** Elemente de farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară, Ed. Brumar Timișoara
- Doma AO, Chirila AB, Dumitrescu E, Muselin F, Cristina RT (2015).** The importance of antibiotic resistance evolution in Western Romania's swine units. *J Biotechnol*, 208 Suppl., 2015, S102. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.320
- ECDC (2010).** European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm.
- EFSA - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2012 –** The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2598 [233 pp], doi:10.2903/j.efsa.2012.2598.
- EPRUMA 2018 -** Best-practice framework for the use of antibiotics in food-producing animals Disponibil la: file:///E:/Downloads/Responsible%20Use%20of%20Anthelmintics%20EPRUMA_FINAL%20.pdf
- Lista O.I.E** a agenților antimicrobieni importanți în medicina veterinară http://cmvro.ro/files/download/noutati/Lista_OIE_a_agentilor_antimicrobieni.pdf
- Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015.** Trends from 2010 to 2015 (2017). Seventh ESVAC report 30 October 2017 (document EMA/184855/2017) http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/doc

[ument_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf](http://www.who.int/publications-library/Report/2017/10/WC500236750.pdf)

World Health Organisation (WHO) (2015). Data

Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation. (ISBN 978-92-4-154940-0). Disponibil la: <http://www.who.int/antimicrobialresistance/publications/surveillancesystem-manual/en/>

World Health Organisation (WHO) (2015).

Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance ISBN 978-92-4-156494-6 Disponibil la: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/163468/9789241564946_eng.pdf?sequence=1

World Health Organization (WHO) (2001).

Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.10

World Health Organization Study Group (WHO) (2002).

Future trends in veterinary public health. World Health Organ Tech Rep Ser., 907:1-85. http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CD_S_CSR_DRS_2001.10.pdf

Sykes, J.E., Papich, M.G. 2013, Antifungal Drugs. In Canine and Feline Infectious Diseases, (pp.87-96), Ed. Elsevier

Scorzoni, L., Marcos, C.M., Assato, P.A., Oliveira, H.C., Costa-Orlandi, C.B., Fusco-Almeida, A.M. 2017, Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis, Front. Microbiol. 8:36

Riviere, J.E., Papich, M.G., 2018, Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 10th ed., chapter Antifungal and Antiviral Drugs, Ed. Wiley Blackwell

Mareș, M., Năstasă, V., Moraru, R. 2013, Terapia antifungică în medicina veterinară, Ed. PIM, Iași

Herbal - MycoDerm

gel



antiinflamator și antimicotic ■
adjuvant în dermatite pruriginoase și arsuri, ■
pentru canide și ecvidee ■



- **Compoziție:** tinctură de propolis, extract de aloe vera, uleiuri volatile (salvie, tămâie, lavandă), ulei de măsline, provitamina B5
- **Indicații:** ca tratament adjuvant în dermatita atopică, în combaterea inflamației și a pruritului, în eczeme uscate, alergii de contact, micoze (*Mycosporum* și *Candida*) și arsuri de gradul unu și doi.
- **Administrare:** zilnic, 2 - 3 aplicări în strat subțire, până la dispariția semnelor clinice (cu excepția micozelor, unde tratamentul trebuie continuat oca. 7 - 10 zile).



Răspunsul microorganismelor la tratamentele antimicrobiene

The response of microorganisms to antimicrobial treatments

Romeo Teodor Cristina, Răzvan Florin Moruzi, Eugenia Dumitrescu, Florin Muselin,
Alexandru Octavian Doma

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

rtcristina@yahoo.com

Cuvinte cheie: antiinfecțioase, răspunsul microorganismelor

Keywords: anti-infective, microorganisms' answer

Rezumat

Rezistența la antibiotice este semnalată peste tot în lume, aceasta compromite tratamentul bolilor infecțioase și este una dintre cele mai mari amenințări la adresa sănătății mondiale. Există două modalități prin care bacteriile patogene pot dezvolta rezistență la antibiotice: pe verticală, prin acumularea de modificări genetice în timpul procesului natural de copiere a genomului său, și pe orizontală, prin schimbarea genelor rezistente de la un microb la altul. Articolul prezintă diferența dintre bacteriile rezistente și cele sensibile la antiinfecțioase, modalitățile și manifestările, fazele și tipurile rezistenței și toate mecanismele conexe la antibiotice, antifungice și sulfamide.

Abstract

Antibiotic resistance is reported all over the world, it compromises the treatment of infectious diseases and is one of the biggest threats to global health. There are two ways in which pathogenic bacteria can develop resistance to antibiotics: vertically, by accumulating genetic changes during the natural process of copying its genome, and horizontally, by changing resistant genes from one microbe to another. The article shows the difference between resistant and anti-infective bacteria, the ways and manifestations, the phases and types of resistance and all the mechanisms related to antibiotics, antifungals and sulfamides.

Raspunsul microorganismelor la antimicrobiene

1. Rezistența la antibiotice

Este semnalată peste tot în lume, aceasta compromite tratamentul bolilor infecțioase și este una dintre cele mai mari amenințări la adresa sănătății mondiale.

Rezistența poate afecta orice specie, indiferent de vârstă și conduce la costuri medicale mari și mortalitate crescută. Bacteriile posedă în permanență capacitatea de a se adapta, de a evolua și de a dobândi rezistența la antibiotice.

Literatura de specialitate relevă mai multe moduri prin care o bacterie poate să fie rezistentă la un antibiotic, mecanismul general fiind prezentat în fig. 1.

Există două modalități prin care bacteriile patogene pot dezvolta rezistență la antibiotice:

pe verticală, prin acumularea de modificări genetice în timpul procesului natural de copiere a genomului său, și pe orizontală, prin schimbarea genelor rezistente de la un microb la altul (1).

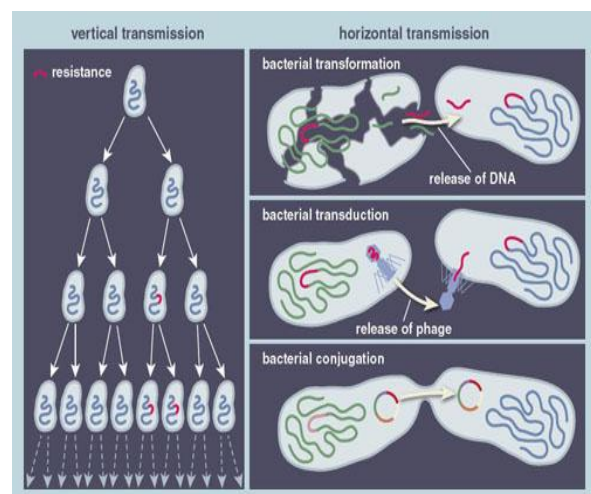


Figura 1. Mecanismul general al rezistenței

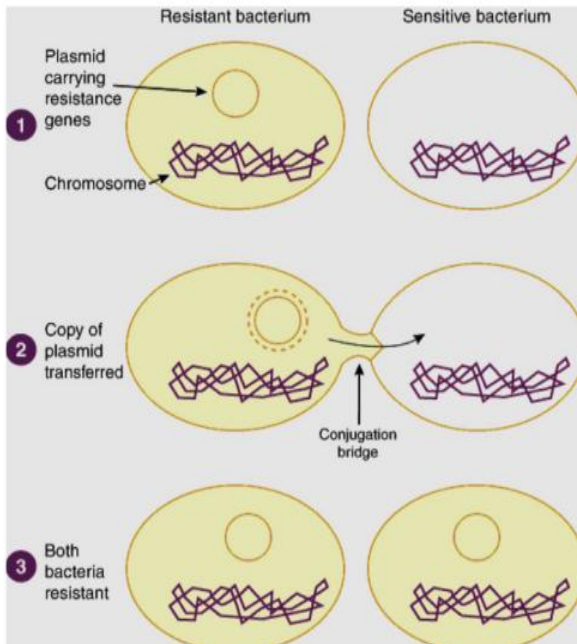


Figura 2. Cele două modalități prin care bacteriile patogene pot dezvolta rezistență la antibiotice (1)

Cei de la National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID, 2012), prezintă foarte sugestiv etapele și factorii generali ai instalării rezistenței la medicamente, astfel instalarea rezistenței la antibiotice este stadială, cunoscând trei etape principale:

a) O mutație genetică poate provoca rezistență la medicamente (vezi fig. 3).

Bacteriile se multiplică logaritmice. Câteva dintre aceste bacterii vor evolua și vor deveni mutante.

Unele dintre mutații pot determina rezistența bacteriilor la medicamente. În prezența medicamentelor, doar bacteriile rezistente vor putea supraviețui sau chiar să se multiplice.

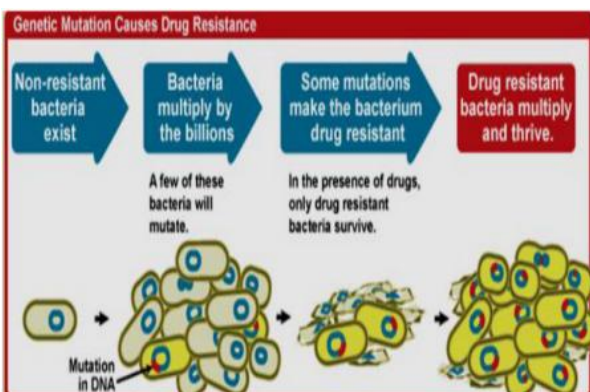


Figura 3. Rezistența determinată de o mutație genetică

b) Modul în care transferul genelor facilitează răspândirea rezistenței (vezi fig 4)

Bacteriile se multiplică de ordinul miliardelor, iar care posedă ADN-ul rezistenței la medicamente pot transfera o copie ale acestor gene altor bacterii. Bacteriile non-rezistente vor primi ADN-ul nou și astfel devin și acestea rezistente la medicamente. În prezența medicamentelor, numai bacteriile rezistente vor supraviețui, acestea se vor multiplica și vor prospera.

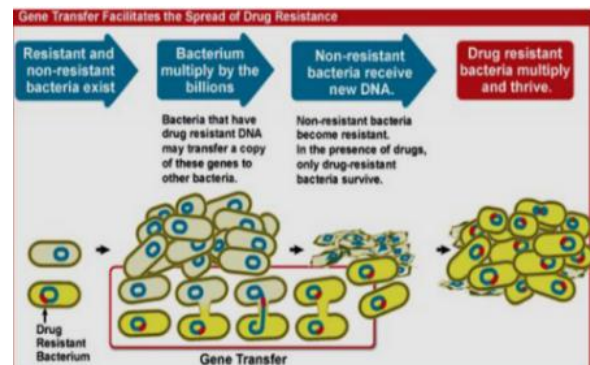


Figura 4. Modul în care transferul genelor facilitează răspândirea rezistenței

c) Diferența dintre bacteriile non-rezistente și cele rezistente la medicamente (vezi fig. 5).

Bacteriile non-rezistente se multiplică, iar odată cu tratamentul medicamentos acestea mor, în timp ce bacteriile rezistente la medicamente continuă să se multiplice și să se răspândească și după instituirea tratamentului.

Acestea au nevoie de energie și resurse pentru a se menține și reproduce. În consecință, un genom mai mare va avea nevoie de mai multă energie pentru al păstra în funcțiune și pentru duplicarea lui în timpul reproducerii.

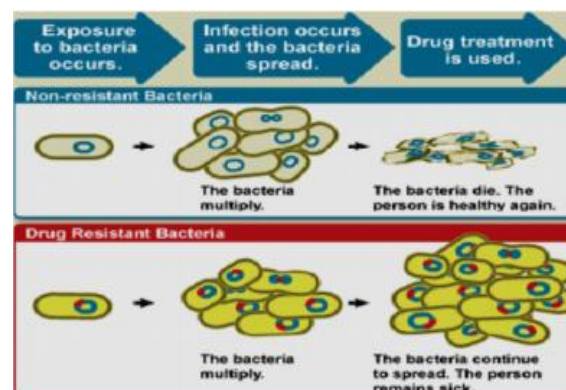


Figura 4. Diferența dintre bacteriile non-rezistente și cele rezistente

Se cunoaște că bacteriile cresc mult mai repede și într-un număr mult mai mare decât majoritatea altor organisme.

Într-un singur pumn de noroi sunt mai multe bacterii decât întreaga populație de oameni din lume.

Populația mare de bacterii este urmată de concurența intensă, și funcționează pe principiul „cel mai adaptat va supraviețui”. La bacterie, ADN-ul în exces în această competiție este considerat „balast”, fiind rapid eliminat, în cazul în care o secvență a ADN ului nu este esențială supraviețuirii sau nu conferă un avantaj selectiv, va fi rapid mutat și scos din genomul de evoluție al populației bacteriene. Pentru ca o genă și/sau o parte din genomul bacteriilor să rămână funcțională pe o perioadă îndelungată, acesta trebuie să ajute la îmbunătățirea supraviețuirii și / sau competitivității bacteriilor. Modalitățile de răspuns ale microorganismelor la acțiunea antibioticelor și antifungicelor este prezentată în figura 5.

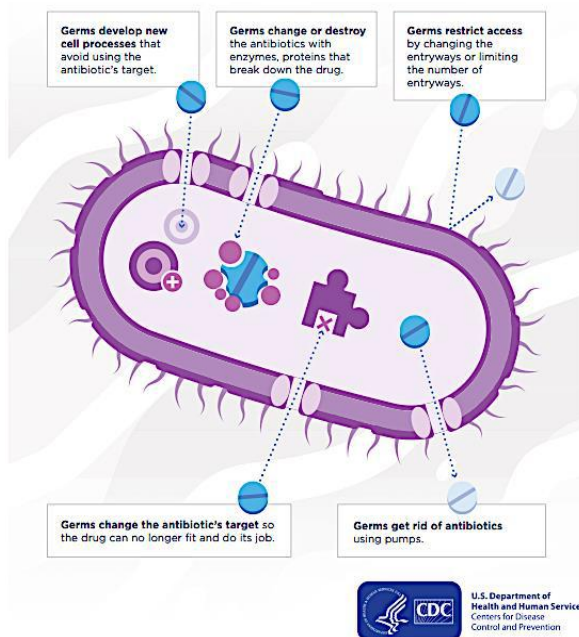


Figura 5. Cai ale microorganismelor de a contracara efectul antimicrobian (2)

La nivel individual, o persoană poate dezvolta o infecție rezistentă la tratamentul cu antibiotice, urmare a tratamentului de durată sau profilactic, spre deosebire de tratamentele pe termen scurt, cum este cazul infecțiilor acute. Acest lucru poate înseamna și că

bacteriile își pot pierde rezistența la antibioticele care nu au fost utilizate frecvent.

Dezvoltarea și întreținerea rezistenței la antibiotice este, de obicei, dependentă de populația bacteriană, aceasta fiind expusă frecvent dozelor non - letale de antibiotice, desigur fără a uita că unele bacterii sunt rezistente natural la unele antibiotice.

În realitate, aceasta înseamnă că rezistența la antibiotice este posibil să apară în medii în care bacteriile sunt frecvent expuse la antibiotice.

Bacteriile devin rezistente la un antibiotic sau grup de antibiotice ca urmare a mai multor **interacțiuni specifice:**

Inactivarea medicamentului sau deturnarea de la calea metabolică

Este urmarea degradării enzimatică a antibioticului de către enzimele bacteriene cum sunt betalactamazele (penicilinazele și cefalosporinazele). Inactivări pot surveni și la aminoglicozide, care pot fi acetilate sau fosforilate (de acetilaze și fosforilaze).

Alterarea țintei sau structurii enzimatic

Receptorul unde acționează de obicei antibioticul, poate să-și modifice afinitatea pentru bacterie și, astfel, răspunsul receptorului amplifică activitatea bacteriană și implicit să anuleze pe cea a medicamentului.

Acumularea scăzută a antibioticului în celulele bacteriene rezistente

Apare de exemplu în cazul celulelor canceroase, când acumularea tetraciclinei descrește.

Tipurile de rezistență

a. Antibio-rezistența naturală (adaptarea epigenetică)

Se întâlnește la bacteriile care se confruntă în mod constant cu niveluri sub-inhibitorii ale unui antibiotic. Acestea sunt concentrații care sunt prea mici pentru a ucide populația bacteriană, dar poate dezvolta o rezistență temporară la antibiotice. Acest tip de

rezistență se numește adaptare epigenetică, și nu produce modificări genetice care pot fi permanent moștenite de generațiile ulterioare de bacterii. Aceasta poate fi echivalată cu *un atlet care își „dezvolta musculatura” prin pregătire fizică.*

La fel și bacteriile expuse la niveluri sub-inhibitorii ale unui antibiotic pot mobiliza mijloace de apărare, cum ar fi pompele de expulzare a antibioticelor, enzime pentru a le descompune, sau se pot reduce pur și simplu prin permeabilitatea peretelui celular la moleculele de antibiotice.

După cum se poate urmări în figura 5, antibioticele de obiceiucid bacteriile prin blocarea sau interferarea activității enzimelor necesare metabolismului lor propriu (poz.1).

Bacteriile au „inventat” mecanismul *ply sly*, „adaptarea vicleană” pentru a se sustrage de la atacul antibacterian. Astfel bacteriile vor „scurpa” afara enzimele proprii pentru a diminua efectul antibioticului (poz.2).

Apoi acestea vor închide peretele celular pentru a preveni pătrunderea altor antibiotice (poz.3) și vor pompa antibioticul în exterior înainte ca acesta să poată ucide (poz.4), bacteriile mai pot modifica enzima vizată pentru a dezactiva medicamentul (poz.5). În acest mod bacteriile pot trece cu ușurință la cele mai utile instrumente proprii de supraviețuire și pentru alte invazii antibacteriene



Figura 5. Adaptarea epigenetică

b. Antibio rezistența câștigată

Apare la toate antibioticele, mai rapid sau mai lent. Acesta reprezintă și motivul pentru care unele antibiotice descoperite, sintetizate, extrase și cercetate terapeutic nu sunt introduse în terapeutică.

b.1. Adaptarea genetică (prin mutații genetice și selecție)

Numeroase surse, cel mai adesea de origine exogenă pot determina apariția

rezistenței. Radiațiile UV pot provoca daune și modificări permanente ale ADN-ului.

Mutațiile genetice sunt defapt mici modificări ale codului genetic care apar la întâmplare în timpul replicării ADN-ului, sau ca rezultat al expunerii la radiațiile ionizante, ca factori mutageni (fig. 6).

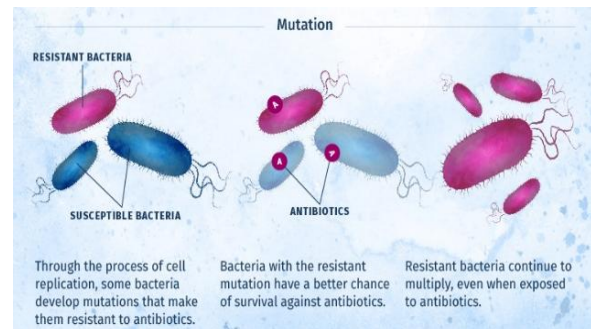


Figura 6. Adaptarea genetică – prin mutații

Multe mutații genetice se petrec în porțiuni ale genomului care nu sunt esențiale pentru organism și care nu se modifică în mod semnificativ în funcționarea organismul.

Unele antibiotice sunt mai predispușe să devină mai puțin eficace ca urmare a mutațiilor genetice în bacteriile țintă.

Unele antibiotice au ca țintă enzima bacteriana denumită ADN-giraza. Antibioticul se leagă de această enzimă, care împiedică replicarea ADN-ului bacterian.

O mutație unică la o anumită poziție în această enzimă poate stopa efectul antibioticului și va permite bacteriilor să devină rezistente la antibiotic.

Din această cauză numeroase antibiotice nu sunt recomandate pe termen lung, parțial și din cauza creșterii probabilității ca unele bacterii să devină rezistente.

b.2. Achiziționarea genetică

Bacteriile pot dobândi bucăți mari de ADN de la alte bacterii, virusuri și din mediu.

Este aproape imposibil pentru unele bacterii de a evolua la întâmplare și de a întâlni o gena sau o enzima, care oferă o rezistență împotriva unui anumit antibiotic (cel puțin într-un interval de timp de săptămâni, luni și ani).

Bacteriile au mai multe moduri de a achiziționa aceste bucăți mari de ADN care conțin de multe ori mai multe gene complete.

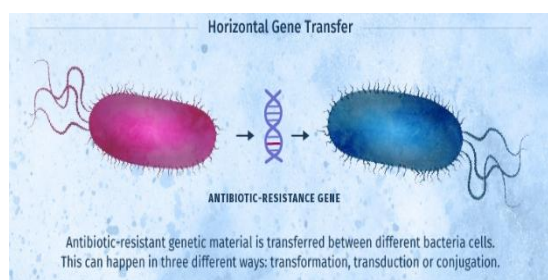


Figura 7. Transferul de gene

Plasmidele. Sunt piese mobile a ADN-ului (adesea circulare) astfel bacteriile pot tranzacționa cu ușurință și le pot dobândi din mediu, multe bacterii au plasmide multiple.

Plasmide pot conține gene care inactivează un antibiotic. Bacteria capătă o plasmidă a rezistenței, adică, un fragment de ADN care transportă gene extracromozomiale ce pot modifica rezistența la antibiotice. Informația genetică prezentă în plasmide reprezintă un factor important în patogenitatea și invazivitatea bacteriilor, în viteza de apariție a unor tulpini patogene invazive, rezistente la medicamentele antimicrobiene și în debutul simptomelor.

Transpozonii. Sunt secțiuni de ADN care pot sări dintr-un loc în altul în codul genetic, sau chiar la codul genetic unui alt organism

Bacteriofagii. Aceștia pot copia și insera în codul genetic, mai precis în genomul bacteriilor infectante.

Conjugarea apare în cazul în care există două bacterii care sunt direct adiacente una față de alta, crează o conexiune directă împărțind ADN-ul.

Naked ADN-ul (liber) bacteriile înglobează ADN-ul liber găsit în mediul înconjurător. Acest ADN poate fi de la bacterii moarte, sau o parte a unei structuri de biofilm (unele bacterii folosesc ADN-ul ca o structură pentru a se ancora într-o suprafață). Bacteriile pot utiliza tehnici pentru a obține ADN-ul și care le ajută să devină rezistente la un anumit tip și / sau clasă de antibiotice.

Fazele instalării rezistenței

Transformarea apare atunci când fragmente de ADN libere, ca urmare a lizei unui organism, sunt preluate de către un alt

organism. Gena rezistenței la antibiotice poate fi integrată în cromozom sau plasmida celei destinatarului.

Transducția este faza în care genele rezistenței la antibiotice sunt transferate de la o bacterie la alta prin intermediul bacteriofagilor și pot fi integrate în cromozomul celei recipiente, fenomen cunoscut sub denumirea de lizogenie.

Conjugarea e consecința contactului direct care are loc între două bacterii: plasmidele vor forma un pod de împerechere și ADN-ul este schimbat, situație care poate duce la dobândirea de gene rezistente la antibiotice de către celula destinatar.

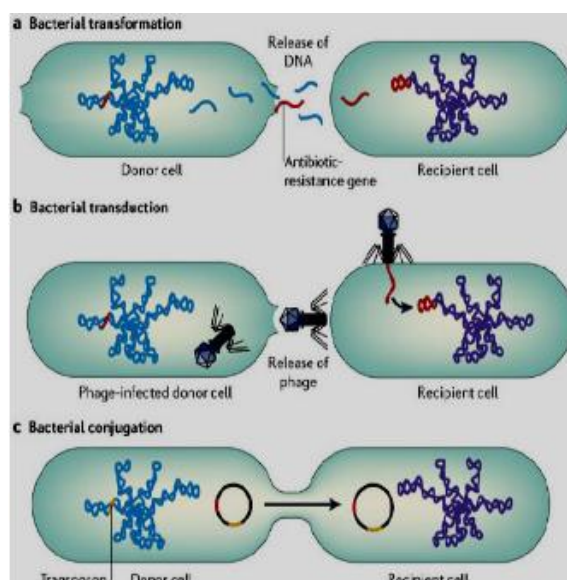


Figura 8. Fazele instalării rezistenței

Mecanismele rezistenței se pot împărți în patru mari categorii, conform fig. 9:

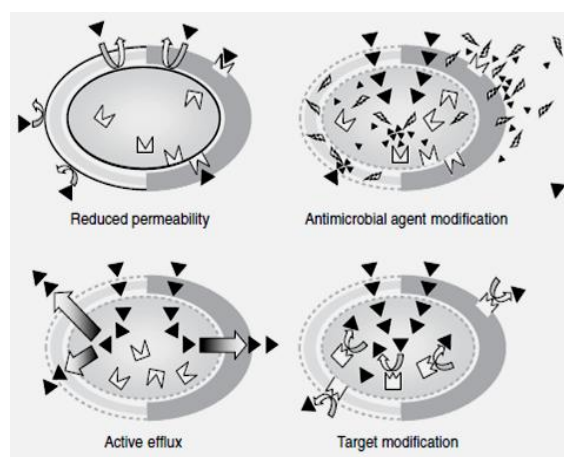


Figura 9. Cele patru mecanisme ale rezistenței

Scăderea permeabilității este cea mai comună formă de rezistență naturală. În acest caz, antibioticul nu poate penetra suprafața bacteriei și deci nu poate ajunge la nucleul celulei. În cazul bacteriilor Gram pozitive, peretele bacterian este mai permisiv la pătrunderea antibioticelor, dar în cazul bacteriilor Gram negative, aceasta reprezintă o barieră greu de depășit și care variază în funcție de specia bacteriană.

De exemplu, peretele celulei este mai permeabil în cazul speciilor de *Neisseria* și *Haemophylus*, *P. aeruginosa* și a tulpinilor de *Proteus* indol pozitive.

În cazul lui *Escherichia coli* și a altor enterobacterii, proteina specifică (porina) va preveni pătrunderea antibioticelor hidrofili cu o greutate moleculară de până la 650 daltoni.

Exemple: Rezistența bacililor Gram negativi datorită scăderii permeabilității în cazul penicilinei G, eritromicinei, clindamicinei și rezistența la vancomicină. Rezistența streptococilor, a lui *Pseudomonas aeruginosa* și a altor bacterii anaerobe la aminoglicozide.

Modificarea sau inactivarea antibioticelor este mecanismul cel mai comun al rezistenței dobândite și este determinată în mare măsură de producția enzimelor betalactamaze.

Betalactamazele reprezintă un grup de enzime produse de bacteriile Gram pozitive, Gram negative aerobe și anaerobe capabile să hidrolizeze inelul beta-lactamic și astfel să inactiveze antibioticul corespunzător.

Acest mecanism specific a fost dovedit de mult a fi un factor important în rezistența germenilor ca *Staphylococcus aureus*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *Bacteroides fragilis* și unele enterobacterii.

Informațiile genetice pentru sinteza acestor enzime pot fi conținute într-un cromozom sau pe o plasmidă și producția acesteia poate fi o caracteristică de producție constantă a bacteriilor, deși pot fi induse și în prezența unui substrat corespunzător.

Betalactamazele, pe baza profilului de substrat și a răspunsului la inhibitorii enzimatici sunt clasificate în cinci grupe mari. În practică, cele mai importante sunt grupurile I și III.

Grupa I betalactamică e produsă în cantități semnificative, în prezența antibioticelor, codificate de către genele cromozomului și distribuite între tulpinile *Enterobacteriaceae*. Aceste lactamaze sunt responsabile pentru rezistența tulpinilor Gram negative nozocomiale la cefalosporine.

Categoria de **enzime III lactamazice** sunt active asupra penicilinelor și cefalosporinelor și sunt aproape întotdeauna codificate plasmidic, acest grup include TEM betalactamaza prezentă în: enterobacterii, *H. influenzae* și *N. gonorrhoeae*. Printre bacteriile producătoare de betalactamază anaerobe este de remarcat *Bacteroides fragilis* care produce o cefalosporinază, inactivată de către acidul clavulanic.

Sulbactamul și acidul clavulanic sunt capabile de a inhiba betalactamazele, în esență, cele mediate de plasmide atunci când sunt combinate cu anumite antibiotice, amoxicilina, ampicilina, ticarcilina și altele.

Recent au fost identificate tulpini bacteriene betalactamazice care pot hidroliza noile betalactamazine. În acest grup sunt incluse enzimele izolate din tulpinile plasmidice mediate de *K. pneumoniae* care au capacitatea de a hidroliza cefotaxina și alte cefalosporine din a treia generație, precum și aztreonamul și enzimele mediate de cromozomi prezente în tulpinile de *Pseudomonas maltophilia* precum și în *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, și *Bacteroides fragilis* capabile să hidrolizeze imipenemul și meropenemul.

Modificarea locului de acțiune pentru antibiotic este un mecanism de rezistență care se referă la modificările produse în structura sau etapele metabolismului, pentru care medicamentele își exercită acțiunea. Aceasta se va realiza fie prin creșterea concentrației unei substanțe competitive, fie prin modificarea a diferite structuri alternative bacteriene.

Toleranța

Nu este considerată un mecanism clasic de rezistență, în practică putându-se comporta ca atare. Ea este atribuită selecției de mutanți deficitari în sisteme autolitice. Probabil că

dozele mari concepute pentru a atinge niveluri mult peste MIC ale microorganismelor ar reduce selecția acestor subpopulații atunci când e necesară prelungirea duratei tratamentului.

Pompele de eflux (vezi tabelul 1/)

Tabelul 1.

Mecanisme de rezistență, activitate și factorii determinanți ai rezistenței la antibiotice

Mecanism / Clasă	Activitate	Factorul determinant	Specii bacteriene
Alterarea enzimatică		Penicilinază	<i>Staphylococcus aureus</i>
β-Lactami (Inhibă sinteza peretelui celular)	-cidă	Carbapenemază (KPC-1, KPC-2, KPC-3)	<i>E.coli, K.pneumonie</i>
		Cefalosporinază Clasa C beta-lactamază. Această enzimă desface inelul beta-lactamic și dezactivează antibioticele	<i>E. coli, Salmonella, Klebsiella</i>
		Clasa A beta-lactamază. Această enzimă desface inelul beta-lactamic și dezactivează antibioticele	<i>E. coli</i>
		Clasa D beta-lactamază. Această enzimă desface inelul beta-lactamic și dezactivează antibioticele	<i>E. coli</i>
Aminoglicozide Agenți care se leagă de subunitatea ribozomală 30s, inhibând sinteza proteică bacteriană, ceea ce duce la moartea celulelor	-cidă	Aminoglicozide-enzime modificate	<i>S. aureus, S. marcescens, E. coli, Acinetobacter baumannii, K. pneumoniae, K. oxytoca, E.coli, Str. hygroscopicus, S. enterica, P. aeruginosa, E. coli K. pneumoniae, Salmonella spp., E. coli, K. pneumoniae, Salmonella spp.</i>
		N-acetiltransferază (plasmide, transpozoni, integron)	<i>E. coli, S. epidermidis, E. faecium, Str. suis, S. aureus</i>
		O-fosfo-transferază	<i>E. coli, S. epidermidis, E. faecium, Str. suis, S. aureus</i>
		O-nucleotidil-transferază	<i>E. coli, S. epidermidis, E. faecium, Str. suis, S. aureus</i>
Lincosamide (Lincomicină) Acționează asupra unităților ribozomale 30s și 50s, rezultând o inhibiție reversibilă a sintezei proteice (în general bacteriostatice)	-statică	Streptogramina A O-acetiltransferază Streptogramina B hidrolază	<i>Staphylococcus aureus</i>
Macrolide Acționează asupra unităților ribozomale 30s și 50s, rezultând o inhibiție reversibilă a sintezei proteice (în general bacteriostatice)	-statică	Eritromicin esterază tip I Eritromicin esterază tip II	<i>E.coli</i>
		Aminoglicozid N-acetiltransferază, care modifică ARN adenin N-6-metiltransferază - metilează adenina la poziția 2058 din unitate 23S ARN, conferind rezistență la eritromicină	<i>S. aureus</i>
Cloramfenicol Acționează asupra unităților ribozomale 30s și 50s, rezultând o inhibiție reversibilă a sintezei proteice (în general bacteriostatice)	Principal bacteriostatic, devine -cid împotriva unor agenți patogeni	cloramfenicol acetiltransferază (CATs)	<i>Salmonella typhimurium, P. aeruginosa, E.coli</i>
		Grupul A cloramfenicol acetiltransferază, pot inactiva cloramfenicolul	<i>E.coli</i>
		Grupul B cloramfenicol acetiltransferază, pot inactiva cloramfenicolul. Grupul A cloramfenicol acetiltransferază	<i>S. aureus</i>

Scăderea permeabilității			
Aminoglicozide (Kanamicină) Fenicoli (Florfenicol)	cidă		
Cefalosporine (Prima generație)			
Inhibitori ai acidului folic (Sulfamide)	statică		
Macrolide	statică		
Chinolone si Florochinolone	cidă	DHFR	<i>Staphylococcus aureus</i>
Pompe de eflux			
Aminoglicozide (Streptomycină)	Cidă	Sistem de transport al diviziunii celulelor de rezistență. Pompă de eflux cu rezistență multidrog.	<i>E. coli</i>
Cefalosporină (prima generație)			
Macrolide Alterează subunitatea ARN 23s, modificarea structurii medicamentului sau ribozomilor, eflux	Statică	Plasmide Transpozoni Sistem de transport al diviziunii celulelor de rezistență. Pompă de eflux cu rezistență multidrog. Transportor principal pentru superfamilie Pompă de eflux Macrolide-Lincosamide-Streptogramină B.	<i>S. epidermidis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Str. pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
Cloramfenicol	Principal bacteriostatic devine –cid împotriva unor agenți patogeni	Pompă de eflux cloramfenicol	<i>E. coli</i>
Chinolone	-cidă	Pompă de eflux cu rezistență multidrog.	<i>E. coli</i>
Tetraciline	-statică/cidă	Pompă de eflux tetraciline	<i>Proteus</i> <i>Enterobacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Salmonella Escherichia</i> <i>S. aureus</i>
Trimetoprim	statică singur -cidă asociat cu sulfamide		
Alterarea situsului de acțiune			
Aminoglicozide Alterarea subunității ARN 16s, modificarea structurii medicamentului	-cidă		
Cefalosporină primă generație Alterează legăturile penicilină-proteină			
Chinolone s Fluorochinolone	-cidă		
Tetraciline Mutații ale situsului de acțiune (ribozomi)	-statică / cidă		<i>E. coli</i>
Protejarea situsului de acțiune			
Glicopeptide (vancomycină) Situs de acțiune peretele celular	-cidă		<i>S. aureus (vanA)</i>
Chinolone	-cidă	Pentapeptide care protejează ADN giraza de inhibarea chinolonelor	<i>E. coli</i>
Supraproducție			
Cloramfenicol Modificarea sau mutații ale situsului de acțiune (ribozomi)	Principal bacteriostatic, devine –cid împotriva unor patogeni		

2. Rezistența la antifungice

Deși prevalența rezistenței antifungice nu este la nivelurile observate la unele bacterii împotriva diferitelor antibiotice, opțiunile de tratament pentru infecțiile fungice invazive sunt limitate. În mod clar, sunt necesare noi strategii de tratament pentru a rezolva această problemă, pe lângă depășirea efectelor toxice / efectelor adverse și a interacțiunilor medicamentoase asociate cu antifungicele disponibile în prezent, care pot limita eficacitatea terapiei.

Creșterea incidenței infecțiilor fungice (vezi fig.10) a condus la folosirea masivă a antifungicelor, astfel s-au realizat cercetări masive asupra agenților antifungici, și o creștere a rezistenței la antifungice după cum reiese din creșterea numărului de publicații începând cu anii 1960.

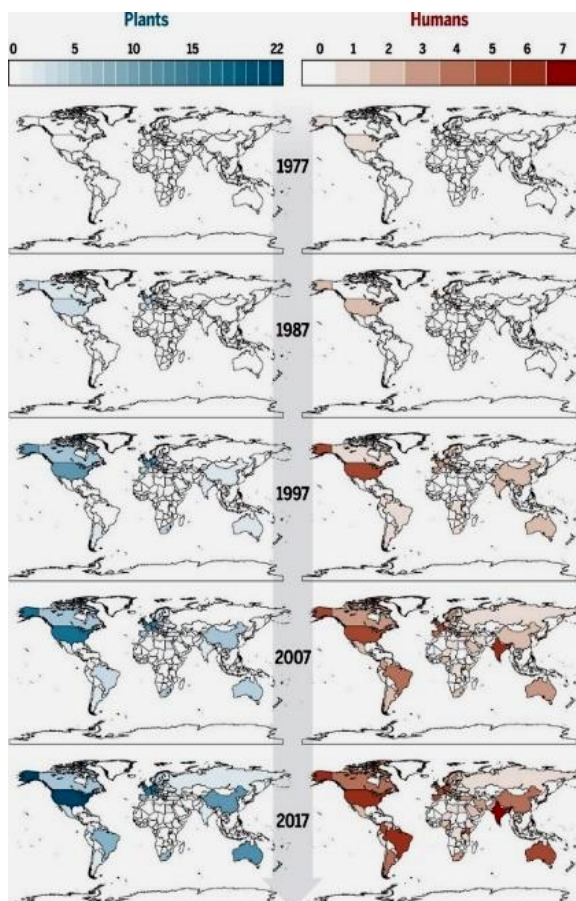


Figura 10. Creșterea incidenței infecțiilor fungice

Rezistența la medicamentele antifungice poate fi intrinsecă sau dobândită.

Rezistența intrinsecă este o caracteristică moștenită a speciei sau tulpinei. În schimb, rezistența dobândită apare când un izolat sensibil anterior dezvoltă un fenotip rezistent, de obicei ca urmare a unui tratament prelungit cu antifungice. Mecanismul precis asociat cu rezistența dobândită depinde de modul de acțiune al clasei de medicamente antifungice. Spre deosebire de celulele bacteriene, cele fungice intacte nu preiau cu ușurință ADN-ul exogen. Arsenalul nostru limitat de antifungice este în continuare amenințat de dezvoltarea tulpinilor de ciuperci rezistente la multe medicamente și apariția agenților patogeni rezistenți intrinsec.

Microorganismele dezvoltă mecanisme pentru a contracara efectele fungicide sau fungistatice ale tuturor claselor antifungice.

Mecanisme de rezistență

Fungii se bazează pe următoarele mecanisme majore:

- **reducerea acumulării medicamentului în celula fungică**
- **eliminarea antifungicelor prin pompe de eflux**
- **scăderea afinității medicamentului pentru țintă**
- **modificări ale metabolismului pentru a contrabalansa efectul medicamentului**

Mecanismele moleculare ale rezistenței primare (fig. 11) sunt extrem de diverse și specifice fiecărui agent antifungic.

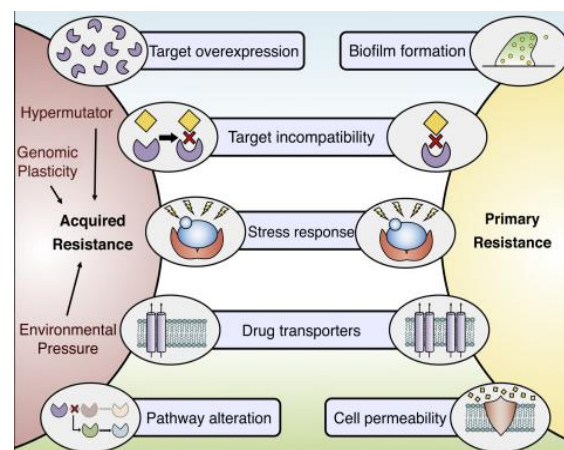


Figura 11. Mecanismele de rezistență la antifungice

În prezent sunt acumulate numeroase date despre rezistența fungilor patogeni la acțiunea diverselor preparate medicamentoase.

Azoli se leagă cu fragmentele ferice ale zonelor de legare a hemului și blochează substratul natural al enzimei - lanosterol, perturbând astfel procesul de biosinteză (vezi tabelul 2 și fig. 12).

Tabel 2.
Mecanismele rezistenței la azoli

Agent antifungic	Situs de acțiune	Mecanism de rezistență
Azoli	-inhibarea funcției	-eflux mediat de transportori
Imidazoli: Clotrimazol, Enilconazol, Ketoconazol, Miconazol	citocromului P450: 14 α -lanosterol demetilază	multidrog; -scăderea afinității asupra Erg11p prin mutații;
Triazoli: Fluconazol, Itraconazol, Posaconazol	(ERG11) -interferarea sintezei ergosterolului	- creșterea ERG11; - alterări ale biosintezei ergosterolului;

Mecanismele de rezistență la azoli care vizează membrana celulară pot apărea prin superexpresia sau modificarea țintei, suprareglarea activității transportatorilor, sau inducerea modificărilor celulare care reduc toxicitatea medicamentului sau induc toleranță față de medicament.

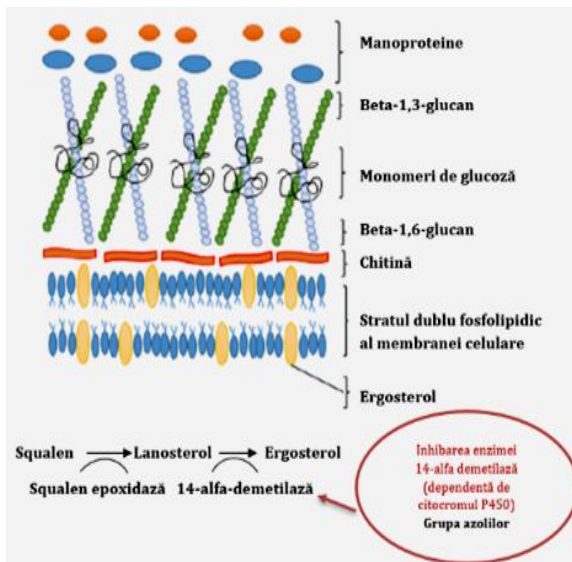


Figura 12. Inhibarea biosintezei de ergosterol de către azoli

Unul dintre cele mai răspândite mecanisme de rezistență la acțiunea preparatelor antifungice este supraexpresia enzimelor implicate în biosinteza

ergosterolului: enzima lanosterol 14 α -demetilaza citocrom P450-dependență (cunoscută ca Erg11 la levuri, de ex. la *Candida albicans* și *Cryptococcus neoformans*, și ca Cyp51A la fungii miceliali, ca de ex. *Aspergillus fumigatus*).

Levurile din genul *Malassezia* sunt foarte susceptibile la itraconazol și posaconazol și mai puțin la fluconazol, indiferent de specie și de sursă. Toți derivații azolici, cu excepția fluconazolului, prezintă o bună activitate antifungică *in vitro* împotriva *M. furfur* și *M. pachydermatis*.

Posibilitatea ca *M. pachydermatis* să dezvolte rezistență la antifungicele din clasa azolilor a fost adesea indicată în literatura de specialitate pe baza testelor *in vitro*, dar *in vivo* s-au raportat doar două cazuri.

Flucitozina după pătrundere în celula fungică este convertită în 5-fluorouracil (forma metabolic activă) care inhibă replicarea ADN-ului și sinteza proteinelor (vezi fig. 13 și tabelul 3).

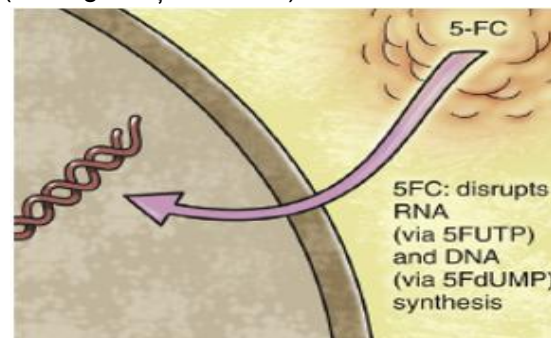


Figura 13. Mecanism de acțiune la flucitozină

Mecanismele moleculare de rezistență la flucitozină se datorează mutațiilor în enzima permeaza purin-citozinică (codificată de gena FCY2), care este responsabilă pentru gradul de utilizare a medicamentului în celulă.

Tabelul 3.
Siturile de acțiune și mecanismul de rezistență la flucitozină

Agent antifungic	Situs acțiune	Mecanism de rezistență
5-floropirimidine (Flucitozina)	Sinteza de ADN și ARN	Defect de permeabilitate a citozinei Deficiență sau lipsă de enzime implicate în metabolizarea flucitozinei Dereglaarea căii biosintetice a pirimidinei

Polienele (Amfotericina B, Nistatinul) acționează la nivelul biosintezei de ergosterol, prin legarea ergosterolului din membrana celulelor fungice și formarea unui complex capabil să modifice membrana celulară, cu formare de pori membranari care conduc la pierderi de ioni monovalenți și mai apoi la moartea celulelor. A fost descrisă rezistență la izolatele de *Candida spp.*, *C. immitis* și *Mucor spp.*

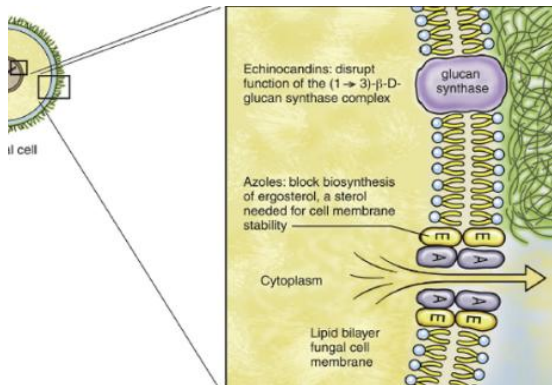


Figura 14. Mecanismul de rezistență la poliene

Echinocandinele (Caspofungina – substanța cea mai importantă) inhibă β -1,3 glucan sintetază prin modificarea afinității echinocandinelor pentru sintetaza β (1,3) – glucanului (vezi fig. 15).

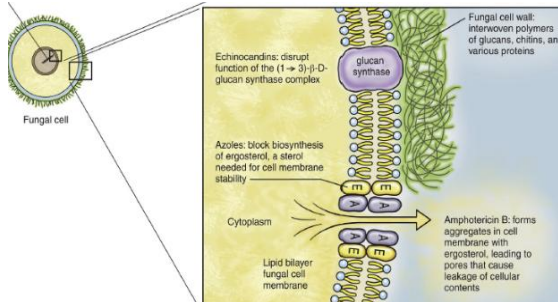


Figura 15. Mecanism de rezistență la echinocandine

3. Sulfamidorezistența

Poate fi naturală și câștigată. **Rezistența naturală** (fig. 16) apare la bacteriile și microorganismele care pot lua acidul folic preformat din mediu, deoarece nu pot să-l sintetizeze singure.

Rezistența câștigată apare mai rapid și are durată mai lungă.

Are la bază adaptarea enzimatică a metabolismului bacterian sau a unei specii a bacteriilor sau medieri ale factorului R. Mecanismul de apariție a rezistenței este prezentat în fig. 16 și tabelul 4.

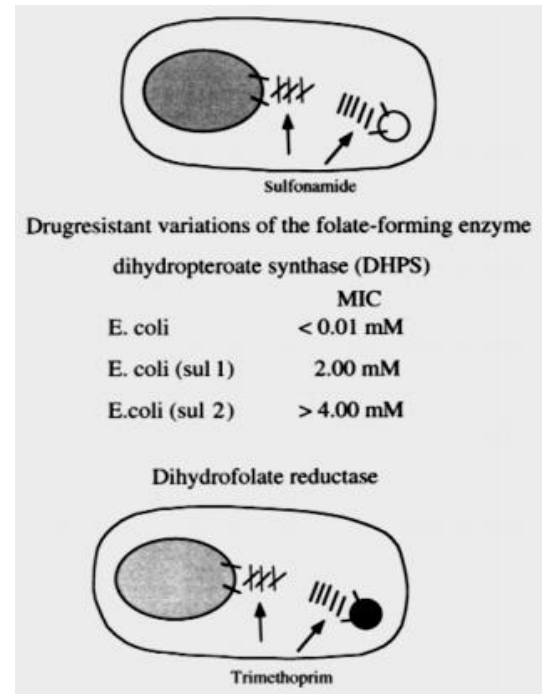


Figura 16. Rezistență naturală determinată de plasmide la sulfamide (sus) și trimetoprim (jos)

Tabel 4. Mecanism de acțiune la sulfamide și Trimetoprim

Substanțe	Activitate	Factorul determinant	Specii bacteriene
Sulfamide (Agenți care acționează ca antimetaboliți) (Blochează metabolismul acidului folic prin inhibarea dihidrofolat reductază)	Statică	dihidropteroat sintetază, care nu poate fi inhibată de sulfamide	<i>E. coli</i>
Trimetoprim (Agenți care acționează ca antimetaboliți) (Blochează metabolismul acidului folic prin inhibarea dihidrofolat reductază)	Statică singur Cidă cu sulfamide	Grupul B R67 dihidrofolat reductază care nu poate fi inhibată de trimetoprim	<i>E. coli</i>

Bibliografie

1. <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/combating-antibiotic-resistance>
2. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html>

Nota: alături de bibliografia citată, la redactarea acestui articol au fost citate integral sau parțial pasaje din următoarele materiale:

Cristina T. Romeo, Doma O. Alexandru, Dumitrescu E, Muselin F, Chirilă B.A. (2018). Despre evoluția și implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar și evoluția acestui fenomen în România. *Medicamentul Veterinar / Veterinary Drug*, 2018, 12(1):4-49.

Identificabil la: [http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1948-2018_VD_12\(1\)_ART2.RO.pdf](http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1948-2018_VD_12(1)_ART2.RO.pdf)

Cristina T. Romeo (2018). Evoluția & Implicațiile RAM în lumina On-Health în România, prezentare EFSA - Focal point Romania. Hotel Ramada Plaza, București. 25.10.2018. Identificabil la: http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1971-2018_EFSA_CRISTINA_RT.pdf

Cristina T. Romeo (2018). Evoluția / implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar. Prezentare ASAS 06.06.2018. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1934-2018-ASAS.pdf> și http://www.asas.ro/wcmqs/sectii/medicina_veterinara/documente/Punct%20de%20vedere%20privind%20rezidenta%20la%20medicamente.pdf

Cristina T. Romeo. Orientari privind utilizarea prudentă și rațională a antibioticelor la animale. Cursurile SNEC 2016. Identificabil la: http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1634-2016_SNEC_CRISTINA_T_Romeo.pdf

Cristina T. Romeo (2010). Suport curs farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/890-Suport%20curs.II.pdf>

Cristina T. Romeo (2012). Implicațiile uzului de antibiotice și despre chinolone în terapia veterinară. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1122-2012-IOSUD-SDMVCurs.pdf>

Cristina RT (2006). Introducere în farmacologia și terapia veterinară, Ed. Solness, Timișoara.

Cristina RT, Chiurciu V (2010). Elemente de farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară, Ed. Brumar Timișoara

Doma AO, Chirila AB, Dumitrescu E, Muselin F, Cristina RT (2015). The importance of antibiotic resistance evolution in Western Romania's swine units. *J Biotechnol*, 208 Suppl., 2015, S102. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.320

ECDC (2010). European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm.

EFSA - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2012 – The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2598 [233 pp], doi:10.2903/j.efsa.2012.2598.

EPRUMA 2018 - Best-practice framework for the use of antibiotics in food-producing animals Disponibil la: file:///E:/Downloads/Responsible%20Use%20of%20Anthelmintics%20EPRUMA_FINAL%20.pdf

Lista O.I.E a agentilor antimicrobieni importanti în medicina veterinară http://cmvro.ro/files/download/noutati/Lista_OIE_a_agentilor_antimicrobieni.pdf

Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. Trends from 2010 to 2015 (2017). Seventh ESVAC report 30 October 2017 (document EMA/184855/2017) http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf

World Health Organisation (WHO) (2015). Data Global Antimicrobial Resistance

Surveillance System: Manual for Early Implementation. (ISBN 978-92-4- 154940-0). Disponibil la: <http://www.who.int/antimicrobialresistance/publications/surveillancesystem-manual/en/>

World Health Organisation (WHO) (2015). Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance ISBN 978-92-4-156494-6 Disponibil la: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/163468/9789241564946_eng.pdf?sequence=1

World Health Organization (WHO) (2001). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.10

World Health Organization Study Group (WHO) (2002). Future trends in veterinary public health. World Health Organ Tech

Rep Ser., 907:1-85.
http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.10.pdf

Sykes, J.E., Papich, M.G. 2013, Antifungal Drugs. In Canine and Feline Infectious Diseases, (pp.87-96), Ed. Elsevier

Scorzoni, L., Marcos, C.M., Assato, P.A., Oliveira, H.C., Costa-Orlandi, C.B., Fusco-Almeida, A.M. 2017, Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis, Front. Microbiol. 8:36

Riviere, J.E., Papich, M.G. 2018, Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 10th ed., Chapter Antifungal and Antiviral Drugs, Ed. Wiley Blackwel

Mareş, M., Năstasă, V., Moraru, R. 2013, Terapia antifungică în medicina veterinară, Ed. PIM, Iaşi

- Secții de producție moderne utilizate complet:



Secția de producție soluții orale – vase de preparare soluții



Linia de umplere a flacoanelor



Secția de producție medicamente pulverulente

- Depozite moderne:



- de materii prime cu temperatură și umiditate controlate



- de produse finite cu temperatură și umiditate controlate



S.C. DELOS IMPEX 96 SRL
Str. Horia, Cloșca și Crișan, nr. 81, Otopeni, Jud. Ilfov, Cod 075100
J23/3758/2008 RO 8086792
TEL +40 372 714 433; +40 372 714 434 FAX +40 372 871 445
Cont: BRD fil. Carol – RON: RO57BRDE441SV14535894410
Cont: Volksbank fil. Moșilor – RON: RO69VBBU2511MO0342522701
E-mail: delosmedica@yahoo.com

nou

imbatabil în combaterea tricomonozei

Roniactiv

100 mg/g



pulbere hidrosolubilă
cu ronidazol, 100 mg / g
pentru porumbei

în tratamentul
infecțiilor cauzate
de *Trichomonas spp.*,
Histomonas spp.,
Giardia spp.



pulbere
pentru efective mari

comprimate
pentru efective mici

Romvac
Company

șos. Centurii, nr. 7, Voluntari
jud. Ilfov, Tel.: 021 350 31 09
romvac@romvac.ro, www.romvac.ro

Consumul de antimicrobiene, impactul economic și social al rezistenței

Antimicrobial use, economic and social impact of resistance

Romeo Teodor Cristina, Răzvan Florin Moruzi, Eugenia Dumitrescu, Florin Muselin,
Alexandru Octavian Doma

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

rtcristina@yahoo.com

Cuvinte cheie: antiinfecțioase,
Keywords: anti-infective,

Rezumat

Utilizarea pe scară largă a substanțelor antimicrobiene atât în medicina umană, cât și în medicina veterinară s-a accentuat, ceea ce a condus la o accelerare în apariția și răspândirea RAM. În medie, animalele din crescătoriile Europei consumă mai multe antibiotice decât oamenii. Conform studiilor, carnea de porc are cea mai mare concentrație de antibiotice. Potrivit unor estimări din literatură, cantitatea de antibiotic de uz veterinar consumat la nivel mondial de efectivele de animalele de fermă este aproape dublă față de cel de uz uman. În prezentul articol sunt prezentate cu date recente efectele consumului de antimicrobiene, impactul economic precum și cel social al rezistenței.

Abstract

The widespread use of antimicrobials in both human and veterinary medicine has intensified, leading to an acceleration in the emergence and spread of AMR. On average, animals in European farms consume more antibiotics than humans. According to studies, pork has the highest concentration of antibiotics. According to estimates in the literature, the amount of antibiotic for veterinary use consumed worldwide by livestock is almost double that for human use. This article presents with recent data the effects of antimicrobial use, the economic as well as the social impact of resistance.

1. Consumul de antimicrobiene

Utilizarea pe scară largă a substanțelor antimicrobiene atât în medicina umană, cât și în medicina veterinară s-a accentuat, ceea ce a condus la o accelerare în apariția și răspândirea RAM. Potrivit unor estimări din literatură, cantitatea de antibiotic de uz veterinar consumat la nivel mondial (vezi fig. 1) de efectivele de animalele de fermă este aproape dublă față de cel de uz uman.



Figura 1. Comparativ medicină veterinară și umană – cantitatea de antibiotic consumată la nivel mondial

În anul 2006 utilizarea antibioticelor ca promotor creștere era ceva uzual.

De exemplu, în Statele Unite pentru obținerea unui kilogram de carne și ouă, se folosesc aproximativ 300 mg de antibiotic.

Pe lângă utilizarea în scop terapeutic sau preventiv a substanțelor antimicrobiene, în multe țări acestea sunt folosite ca promotori de creștere.

La sfârșitul anilor 1940, fermierii au administrat antibiotice efectivelor de animale, de unde și apariția tulpinilor bacteriene rezistente, astfel Uniunea Europeană a interzis. Sunt convingeri că fără antibiotice industria zootehnică se va prăbuși.

Sunt autori și țări care susțin și demonstrează contrariul, de exemplu în Danemarca, cea mai mare țară europeană exportatoare de carne de porc din lume, exportând aproximativ 90% din ceea ce produc, s-a constatat o creștere după interzicerea utilizării antibioticelor pentru creșterea suinelor.

În anul 2008, ca urmare a unei dezbateri a Consiliului European cu privire la rezistența la antimicrobiene, statele membre UE au decis:

- -consolidarea sistemelor de supraveghere
- -îmbunătățirea calității datelor privind consumul și rezistența la antimicrobiene, atât în sectorul uman cât și veterinar.

Comisia Europeană a solicitat Agenției Europene pentru Medicamente (EMA) să preia conducerea în colectarea datelor privind utilizarea de agenți antimicrobieni de uz veterinar în statele membre. EMA a solicitat să consulte Centrul European de Prevenire și Control al Bolilor (ECDC), Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (EFSA) și Laboratorul de referință al UE pentru rezistența antimicrobiană (EURL-AMR).

În medie, animalele din crescătoriile Europei consumă mai multe antibiotice decât oamenii.

Conform studiilor, carnea de porc are cea mai mare concentrație de antibiotice. De asemenea, ele sunt prezente în concentrații mari în creveții și peștii de crescătorie.

Chiar și unele legume organice sunt contaminate pentru că în jur de 75% dintre antibioticele utilizate pentru animale ajung în bălegarul folosit apoi ca îngrășământ în agricultură. Astfel, bacteriile sunt expuse la antibiotic în mod constant și devin rezistente la acestea (3).

Conform unui raport ONU publicat anul trecut, „mediul natural devine un rezervor al reziduurilor de antibiotice, agenți patogeni rezistenți și alte molecule cu proprietăți antimicrobiene care sporesc răspândirea genelor rezistente în mediul microbian” (3).

Consumul de antimicrobiene de uz veterinar a fost de 259,6 tone substanță activă, din care 257,2 tone substanță activă au fost forme medicamentoase administrate în principal la animalele de rentă (99,1% din total), și doar 2,4 tone substanță activă sub formă de tablete administrate în principal la animalele de companie.

Conform Trends from 2010 to 2015 Seventh ESVAC report în cele 30 de țări UE

participante consumul preparatelor antimicrobiene veterinare, exprimate în mg per unitate de corecție a populației (PCU), a variat de la 2,9 mg / PCU până la 434,2 mg / PCU.

De asemenea utilizarea claselor de antimicrobiene a variat substanțial în funcție de țară.

Tabel 1.
Consumul de antimicrobiene la nivelul UE

Țară	Tablete		Alte forme farmaceutice		Total tone
	Tone	Procente din consum total	Tone	Procente din consum total	
România	2.4	0,9%	257.2	99,1%	259.6
UE medie/ 30 țări	2.08	0.7%	276.63	99,3%	278.71

Conform datelor, în Europa, pe parcursul scurtei existențe un pui este tratat cu antibiotice de 2,3 ori, iar un porc de 5,3 ori.

Tabel 2.
Consumul de antimicrobiene în România și UE exprimat în mg/PCU

	Consum (tone) pentru animalele de rentă	PCU 1.000 tone	mg/PCU
România	257.2	2.559	100.5
UE	276.63	312.9	100.6

În România, principalul indicator pentru consumul de antimicrobiene, și anume mg / PCU, care ne indică cantitatea de substanță activă consumată echivalată prin unitatea de corecție a populației, a avut o valoare de 100.5 mg / PCU, fiind aproape identică cu media (100.6 mg / PCU) din UE.

Valorile cele mai mari pentru acest indicator s-au înregistrat în Cipru și Spania cu valori de 434.2, respectiv 402.0 mg / PCU.

În România consumul de tetraciline a reprezentat cea mai ridicată valoare 27% (vezi fig. 4), iar alături de peniciline și sulfamide au reprezentat 50% din cantitatea totală de antimicrobiene utilizată (100.5 mg/UPC) (vezi fig 2).

În România, cele mai utilizate forme medicamentoase pentru administrarea

antibioticelor la animalele de rentă au fost: pulberile orale, soluțiile orale și premixurile.

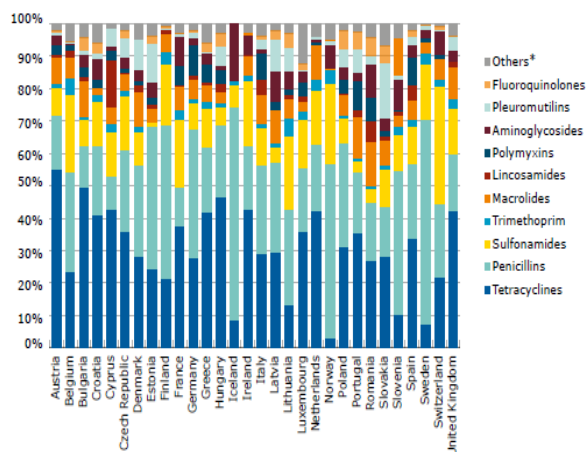


Figura 2. Proportia vânzărilor totale de antimicrobiene veterinare (%)

Aceste trei categorii reprezintă aproximativ 87% din totalul formelor (vezi fig 3).

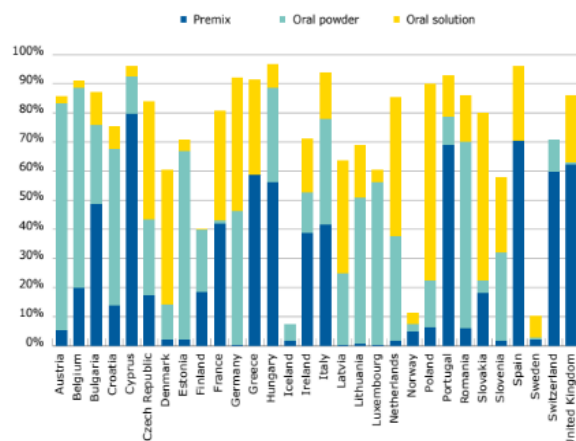


Figura 3. Procentajul consumului de soluții orale, pulberi și premixuri în UE

În studiul: *Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. Publicat: EFSA Journal 2017; 15(7): 4872, 135 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4872.*

Pe o perioadă de trei ani, 2013-2015, consumul mediu total estimat de antimicrobiene exprimate în mg s.a/kgc animal viu a fost de:

- 124 mg/kgc la om-media 118 mg/kgc (50-182 mg/kgc)
- 152 mg/kgc la animalele de rentă-media 67 mg/kg; (3-419 mg/kgc).

Valorile consumului de antibiotice au fost mai mici sau mult mai mici la animalele de

rentă față de om, în 18 din 28 de țări, în 2 țări a fost similar, iar în 8 consumul a fost mult mai mare pentru animalele de rentă față de om.

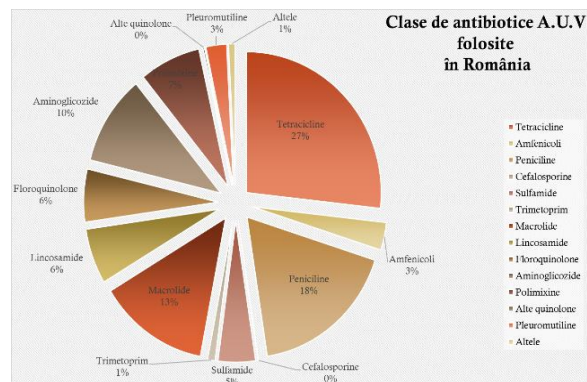


Figura 4. Proportia antibioticelor folosite în România la animale

Conform ECDC și EFSA, în România consumul ridicat de antimicrobiene atât în medicina umană, care a fost de 29.1 DDD / 1.000 de locuitori, cât și în medicina veterinară, de 257,2 tone sau 100.5 mg / PCU, ne situează între primele locuri la nivel european.

Suedia are cea mai scăzută rată de consum de antimicrobiene de uz veterinar din UE. La acest lucru a contribuit atenția acordată sănătății și bunăstării animalelor, precum și biosecurității în exploatarea agricole.

Planurile de prevenire și de control al infecțiilor sunt obligatorii pentru toate exploatarea agricole, antimicrobienele sunt utilizate numai pe bază de rețetă și se colectează de mulți ani date privind utilizarea antimicrobienele de uz veterinar la nivel național (3).

În Țările de Jos, în Franța și în special în Spania, utilizarea antimicrobienele de uz veterinar a fost mult timp ridicată.

Atât în Franța, cât și în Țările de Jos, utilizarea de antimicrobiene de uz veterinar s-a redus la aproximativ jumătate între 2011 și 2016.

Deși Spania a înregistrat o reducere de 13% între 2014 și 2016, aceasta a rămas unul dintre statele membre cu un nivel foarte ridicat de utilizare a antimicrobienele de uz veterinar.

Deși situația este diferită în fiecare dintre aceste țări, acțiunile întreprinse au inclus stabilirea unor obiective și a unor planuri naționale de reducere specifice, organizarea unei cooperări strânse între agricultori,

veterinari și producătorii de alimente, precum și restricționarea utilizării antibioticelor de ultimă instanță în sectorul veterinar (3).

Un caz specific: reducerea semnificativă a utilizării colistinei în Spania. Colistina este un antibiotic de ultimă instanță, care ar trebui să fie utilizat numai în situații speciale.

În 2014, Spania a înregistrat cel mai ridicat nivel de utilizare veterinară a colistinei din UE (folosind 37 mg/PCU). A fost lansat un plan de acțiune și autoritățile competente au colaborat cu medicii veterinari și cu profesioniștii reprezentând sectorul creșterii porcinelor pentru a conveni asupra reducerii utilizării colistinei.

S-a stabilit un obiectiv cantitativ de 5 mg/PCU pentru o perioadă de trei ani, instituindu-se totodată controale pentru a se evita utilizarea sporită a antibioticelor alternative. Utilizarea colistinei a scăzut la 7 mg/PCU până la începutul anului 2018 (aproape de media UE) (3).

2. Impactul economic și social al rezistenței

Impactul utilizării imprudente a antiinfecțioaselor este considerabil și greu de calculat.

Consumul de medicamente în medicina veterinară îl depășește pe cel din medicina umană și este recunoscut faptul că medicina veterinară contribuie major la apariția și răspândirea rezistențelor la oameni (OMS, 2012). Unul dintre primele avertismente cu privire la impactul clinic și societal al rezistenței la antibiotice a fost sunat de Alexander Fleming în cadrul prelegerii sale Nobel „Penicilina” din 1945, după cum urmează: *Poate să vină momentul în care penicilina poate fi cumpărată de oricine din magazine. Apoi, există pericolul ca omul ignorant să se supună ușor în doză și expunându-și microbii la cantități neletale de droguri să le facă rezistente. Iată o ilustrare ipotetică. Domnul X. are dureri în gât. Cumpără niște penicilină și o administrează, nu suficient pentru a ucide streptococii, ci suficient pentru a-i educa pentru a rezista penicilinei. Apoi își infectează soția. Doamna X primește pneumonie și este tratată*

cu penicilină. Deoarece streptococii sunt acum rezistenți la penicilină, tratamentul nu reușește. Doamna X moare. Cine este principalul responsabil pentru moartea doamnei X? (4).

După O'Neill în: *The review on antimicrobial resistance 2016 / Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*

https://amrreview.org/sites/default/files/160518_Final%20paper%20with%20cover.pdf mai mult

de 70% din bacteriile care determină infecții intra-spitalicești sunt rezistente la cel puțin un antibiotic.

În lume se estimează că, în fiecare an, infecțiile rezistente la medicamente conduc la decesul a cel puțin 700.000 de pacienți (vezi fig. 5) și generează costuri de 1,5 miliarde Euro / an numai în UE, prin urmare, fenomenul rezistenței (mai ales la antimicrobiene) a devenit una din prioritățile C.E.

Aproximativ 200.000 de oameni/an mor datorită tulpinilor de antibiotice multi-rezistente.

În India, infecțiile neonatale antibiotic-rezistente este cauza decesului a aprox. 60.000 de nou-născuți/an.

Din 40.000.000 oameni/an care se tratează cu antibiotice pentru boli respiratorii doar 13.000.000 au confirmată necesitatea prin examene de laborator. Doar în SUA, mai mult de 2 milioane de infecții/an sunt urmarea rezistenței bacteriene la antibioticele de primă linie, tratamentele, costând sistemul de sănătate american 20 de miliarde de USD în plus în fiecare an.

Citând surse ECDC și EMA în EU, consecințele fenomenului de rezistență sunt dramatice:

- -tulpini multirezistente: aprox. 400.000 tulpini / an;
- -zile de spitalizare în plus: 2.500.000 zile spitalizare/an;
- -costuri de extra-spitalizare: 900 milioane euro/an;
- -pierderi de productivitate: 600 milioane euro/an.
- anual, aproximativ 4 milioane pacienți dobândesc o infecție asociată asistenței medicale.

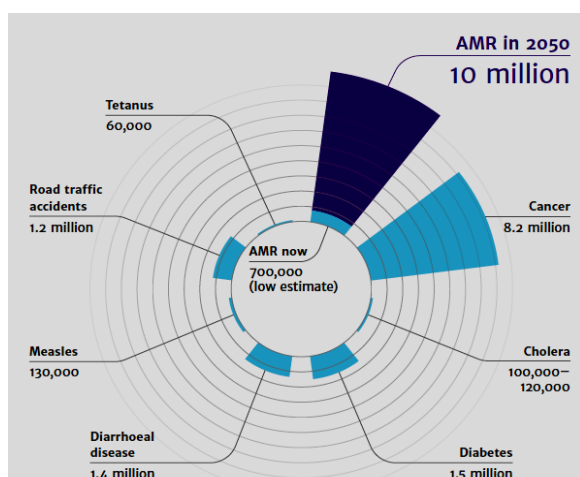


Figura 5. Impactul RAM acum și în anul 2050

RAM este o problemă care nu poate fi rezolvată de o singură țară sau regiune. Estimările privind costul acțiunilor globale privind RAM ajung la 40 de miliarde USD pe o perioadă de 10 ani (O'Neil, 2016).

Din 40.000.000 de americani care iau antibiotice pentru probleme respiratorii / an, 27.000.000 le iau degeaba.

Astăzi, antibioticele sunt rar prescrise pe baza unui diagnostic cert.

Diagnosticul poate indica dacă este sau nu este necesară terapia cu antimicrobiene, și care antimicrobian (pe baza testelor de sensibilitate).

Rezistența la antibiotice poate avea și un impact economic asupra proprietarilor de animale. Dacă este ales tratamentul "sub orice formă, cu orice preț, efectele pot fi considerabile.

De exemplu, Foster și col. descrie tratamentul cu linezolid al unui câine cu bacteriemie MRSP și discospondilită. Pacientul a fost sub tratament pentru o perioadă de 23 de săptămâni, iar judecând după dozele utilizate în raportarea de caz și după prețurile din farmaciile suedeze, costurile pentru antibioticele utilizate au ajuns la 176 000 coroane suedeze, adică 25 600 dolari.

De cele mai multe ori, un asemenea cost ar fi imposibil de acoperit de un număr foarte mare de proprietari (1).

De asemenea, și spitalele și clinicile veterinare pot fi afectate sub aspectul economic atunci când se declanșează un focar de infecții cu bacterii multirezistente.

Costurile care au urmat un focar de MRSA într-un spital de ecvine din Suedia și care a afectat 8 cai s-au estimat în jurul sumei de 1.2 milioane de coroane suedeze, aproximativ 170 000 de dolari (1).

Astfel de probleme economice sunt prezente și în fermele de reproducere sau în grajdurile pentru cursele de cai atunci când sunt prezente infecții cu agenți patogeni foarte rezistenți la antibiotice și care se raspândesc cu ușurință. În plus, costurile deja existente mai sunt completate de pierderea unor animale tinere, ale nou-născuților sau de imposibilitatea participării la diferite competiții, de exemplu.

Mai mult, bacteriile precum MRSA se răspândesc atât la animale, cât și la oameni, iar persoanele care lucrează în domeniul medical veterinar sau în alte domenii care implică animalele sunt mult mai expuși la infecțiile MRSA (1).

Datorită fenomenului rezistenței se va pierde imensul avantaj câștigat în ultimul secol asupra:

- **Bolilor infecțioase:** pneumonia, tuberculoza, HIV, malarie etc.
- **Cancerului:** Antibioticele sunt cruciale pentru a ajuta chimioterapia și implicit pentru lupta împotriva infecțiilor asociate.
- **Procedurilor chirurgicale:** Transplantul de organe, operația de cezariana, protezările, abdomenul acut, operațiile pe tendoane etc.

Rezistența la antibiotice este o problemă majoră care cuprinde interacțiunile dintre oameni, animale și mediu (vezi fig. 6).

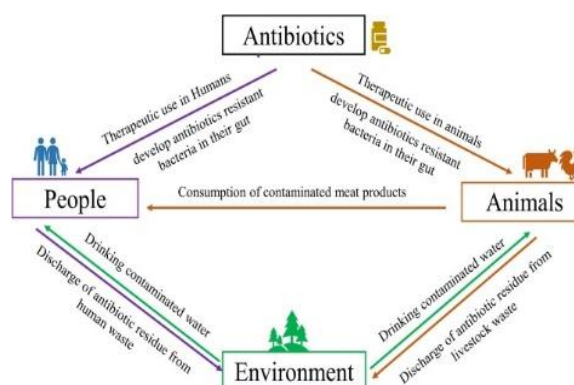


Figura 6. Interacțiunile dintre antibiotice-animale-mediu-oameni

Bacteriile rezistente la antibiotice pot fi contactate de către oameni:

(i) în mod indirect de-a lungul lanțului trofic prin consumul de alimente contaminate sau produse alimentare derivate

(ii) în urma contactului direct cu animalele colonizate/infectate sau prin intermediul substanțelor biologice cum ar fi sângele, urina, fecalele, saliva.

Acest fenomen este considerat o problemă trans-sectorială, deoarece antibioticele sunt frecvent utilizate în acvacultură, în fermele de animale și în culturile agricole, iar bacteriile rezistente la antibiotice și genele de rezistență se pot răspândi la orice nivel al lanțului trofic (vezi fig. 7).

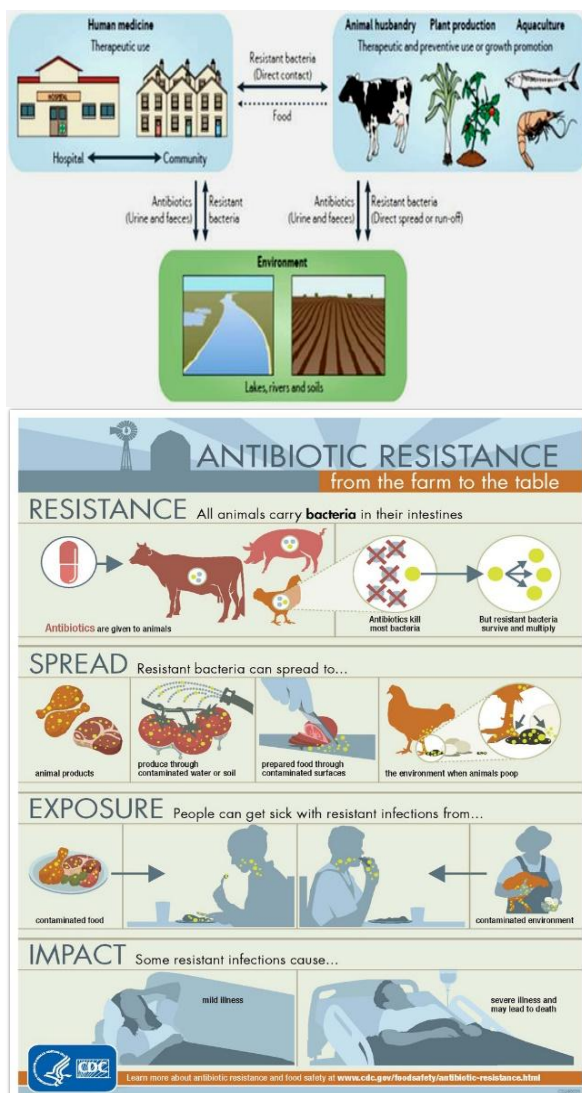


Figura 7. Modul de răspândire a RAM

Reziduurile de antibiotice, bacteriile rezistente la antibiotice și genele de rezistență sunt considerate ca fiind poluanți de mediu și responsabili pentru accelerarea antibio-rezistenței.

Solul și apa sunt considerate rezervoare vitale și surse de rezistență la antibiotice, cu atât mai mult cu cât acestea sunt afectate de practicile din agricultură.

Antibioticele care au fost identificate în apele de suprafață au inclus adesea: macrolide, sulfamide, tetraciline, cloramfenicoli, clortetracilina, sulfametazina, lincomicina, trimetoprimul, sulfadimetoxinul, sulfametazina.

În acest sens s-au efectuat o serie de studii și rapoarte care demonstrează o rezistență ridicată la ampicilină, sulfamide și tetraciline pentru *Salmonella spp.* izolată de la om, *Salmonella* și *Escherichia coli* izolate de la purceii pentru îngrășare și de la viței.

S-au identificat proporții ridicate de tulpini rezistente la ampicilină, sulfamide și tetraciline, în timp ce rezistența la cefalosporine de generația a treia a fost mai puțin frecventă.

Astfel, într-un raport de la nivelul UE, nivelul de rezistență pentru *E. coli* izolat de la viței cu vârstă sub un an au fost în general mai mici decât cele de la porcii pentru îngrășat, cu o proporție de 43,8% la tetraciline, 34,4% la sulfametoxazol, 29% la ampicilină și 24,7% pentru trimetoprim.

Referitor la purceii la îngrășat nivelul de rezistență pentru *E. coli*, a fost de 52,1% la tetracilină, 42,4 % la sulfametoxazol, 38,5% la ampicilină și 32,2% pentru trimetoprim.

Legătura AC/AR demonstrată statistic ($p < 0,05$) pentru:

- fluorochinolone/ *E.coli* în ambele sectoare
- cefalosporinele din generația 3 & 4 la *E.coli* la oameni
- tetraciline la *E. coli* la animale
- carbapeneme și polimixine / *K. pneumoniae* la om
- macrolidele la animale au fost asociate cu rezistența la *Campylobacter spp.* la animale și oameni.

- cefalosporinele generația 3 și 4 = rezistență la fluorochinolone / *E.coli* la om
- fluorochinolonele/ *Salmonella spp.* și *Campylobacter spp.* La om a fost legat de consumul de fluorochinolone la animale

Bazele sănătății publice - apă curată, condiții de igienă, prevenirea, controlul și supravegherea infecțiilor sunt la fel de critice pentru reducerea impactului rezistenței antimicrobiene, precum și pentru controlul bolilor infecțioase.

Dr. Keiji Fukuda, reprezentantul special al directorului general pentru rezistența la antimicrobiene la Organizația Mondială a Sănătății (OMS)

Având în vedere că țările din G20 reprezintă 80% din producția mondială totală a consumului de carne, o mare parte din consumul de antibiotice la animale și probabilitatea de a genera rezistență la medicamente, le revine acestora în prezent. (O'Neil, 2016)

În ultimul deceniu s-a înregistrat un număr crescut de infecții cu MRSA și cu bacterii Gram negative rezistente la cefalosporinele de generație a treia sau chiar la carbapeneme la câini și cai.

De asemenea, la câini a crescut incidența infecțiilor cu *Staphylococcus pseudintermedius* methicilin-rezistent (MRSP) (1).

Staphylococcus pseudintermedius este un patogen oportunist foarte frecvent izolat de la câini și reprezintă principala cauză a infecțiilor cutanate, ale urechilor și ale rănilor preexistente.

Din cauza faptului că *S. pseudintermedius* este rezistent la majoritatea antimicrobienele folosite în medicina veterinară și pentru a nu mai contribui la dezvoltarea rezistenței, în ultima perioadă s-a preferat evitarea antibioticelor sistemice în afecțiunile pielii, preferându-se medicație topică de genul samponanelor cu diverse antibiotice.

Deși îmbăierile și șamponările sunt mai laborioase și de termen lung, această metodă de tratament a dat de foarte multe ori rezultate (1). În timp ce piodermitele asociate cu MRSP la câini pot fi tratate fără medicație

antimicrobiană sistemică, infecțiile mai profunde și mai puternice și unele infecții asociate cu intervențiile chirurgicale pot fi fatale în urma netratării corespunzătoare, de multe ori afectând bunăstarea animalelor, ajungându-se la eutanasiere.

Această situație este valabilă și în cazul infecțiilor cu MRSA și bacterii Gram-negative multirezistente la câini, pisici și cai (1).

Antibioticele alternative precum glicopeptidele, oxazolidinonele și carbapenemele sunt la ora actuală menționate în cadrul unor studii și cazuri clinice, însă aceste substanțe nu sunt autorizate pentru uzul veterinar, iar informațiile legate de farmacocinetică, eficacitate și siguranță la diferite specii sunt limitate (1).

Și mai important este faptul că medicul veterinar este pus în fața unei mari dileme etice: **substanțele care sunt critice pentru tratarea infecțiilor cu bacterii multirezistente la om ar trebui folosite și la animale, luând în calcul riscul dezvoltării rezistenței la bacteriile patogene și cele comensale, rezistență ce s-ar putea transmite și la oameni?**

Majoritatea oamenilor care studiază acest aspect evidențiază faptul că aceste substanțe ar trebui limitate și le recomandă a fi folosite în medicina veterinară numai în cazurile în care nu există o altă variantă de tratament.

În unele țări precum Finlanda și Suedia, medicii veterinari nu au voie să prescrie aceste substanțe medicamentoase, ceea ce înseamnă că există situații în care eutanasierea este singura opțiune, acesta fiind un exemplu cum afectează pe plan social rezistența la antimicrobiene (1).

Puține studii au încercat să coreleze direct factorii socioeconomi cu ratele de rezistență naționale. Un astfel de studiu a constatat că ratele de rezistență pentru trei bacterii importante: *Escherichia coli*, *Klebsiella rezistentă la 3GC* și *Staphylococcus aureus rezistent la meticilină (MRSA)*, au scăzut pe măsură ce venitul național brut (VNB) pe cap de locuitor a crescut.

Cu toate acestea, VNB nu a contabilizat toată variația ratelor detectate între grupurile de venituri, iar pentru *S. aureus* a reprezentat mai puțin de jumătate (2).

Țările din același grup de venit au rate de rezistență extrem de variabile.

De exemplu, conform celor mai recente date disponibile, ratele de MRSA au fost mai mari în Statele Unite (44%) decât în Australia (18%), Canada (16%) și UE (17%).

Ratele de rezistență din UE au variat de la un nivel scăzut de 0% în Islanda la un maxim de 57% în România (2).

Ratele raportate de MRSA de la țările cu venituri mici și mijlocii sunt adesea derivate din mai puține izolate și s-ar putea să nu fie la fel de fiabile ca cele din țările cu venituri mari.

Ratele MRSA raportate au fost de peste 80% în unele părți din Africa de Vest și în mare parte din America Latină și peste 40% în mare parte din Asia de Sud și de Sud-Est, dar rămân întrebări despre fiabilitatea și comparabilitatea acestora.

Ratele de rezistență pentru mai multe combinații antimicrobiene-patogene sunt mai mari și cresc mai repede în țările cu venituri mici și mijlocii decât în țările cu venituri mari (2).

În general, țările cu venituri mari folosesc mai multe antimicrobiene pe cap de locuitor decât în cele cu venituri mici și mijlocii, dar ratele de consum de antimicrobiene cresc cel mai rapid în țările cu venituri mici și mijlocii.

Utilizarea antimicrobienelelor la animale crește, de asemenea, în multe țările cu venituri mici și mijlocii, ca răspuns la creșterea veniturilor și a cererii consumatorilor de proteine animale.

Unele țări cu venituri mari, în special în Europa, și-au redus consumul de antimicrobiene după ce au introdus limite privind utilizarea antimicrobienelelor ca promotori de creștere la animale, în timp ce altele, precum Germania și Statele Unite, au fost printre cei mai mari consumatori de antimicrobiene în agricultură în 2010 (2).

Situația din România este din păcate una severă; avem o cunoaștere limitată a dimensiunilor sale în țara noastră, ceea ce știm este extrem de îngrijorător și au fost parcursi prea puțini pași (în comparație cu celelalte state europene) către controlul rezistenței microbiene.

Explicațiile acestei neglijări prelungite a rezistenței microbiene sunt multiple; este utilă identificarea lor pentru a defini obstacolele ce trebuie depășite în cadrul unui program de acțiune național destinat combaterii fenomenului (5).

Preocupările față de riscul reprezentat de utilizarea nejustificată a antibioticelor și consecințele acesteia există în cadrul Uniunii Europene de aproape două decenii; principalul document aflat în vigoare este Recomandarea Consiliului European 77/2002 (15.11.2001) privind utilizarea prudentă a antibioticelor.

Una dintre modalitățile de acțiune indicate în acest document este coordonarea între domeniile sănătății umane, veterinară și creșterea animalelor, inclusiv înființarea unui comitet interministerial care să aibă responsabilitatea elaborării / actualizării strategiei naționale și a planului național de acțiune pentru combaterea rezistenței la antibiotice (5).

Bibliografie

1. Bengtson B., Greko C., 2014, Antibiotic resistance--consequences for animal health, welfare, and food production, *Ups J Med Sci*, 119(2):96-102. doi: 10.3109/03009734.2014.901445.
2. Molly M.P., Gelband H., 2017, SOCIOECONOMICS, ANTIMICROBIAL USE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE, *Economics and Innovation*.
3. https://www.eca.europa.eu/lists/ecadocument/sr19_21/sr_antimicrobial_resistance_ro.pdf
4. Barriere S.L., 2014, Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance, 151-153, *PharmD*.
5. <http://www.ms.ro/2017/03/06/hotarare-a-guvernului-privind-infiintarea-comitetului-national-multisectorial-pentru-limitarea-rezistentei-microbiene-la-antibiotice/>

Nota: alături de bibliografia citată, la redactarea acestui articol au fost citate integral sau parțial pasaje din următoarele materiale:

Cristina T. Romeo, Doma O. Alexandru, Dumitrescu E, Muselin F, Chirilă B.A. (2018). Despre evoluția și implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele

- antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar și evoluția acestui fenomen în România. *Medicamentul Veterinar / Veterinary Drug*, 2018, 12(1):4-49. Identificabil la: [http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1948-2018_VD_12\(1\)_ART2.RO.pdf](http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1948-2018_VD_12(1)_ART2.RO.pdf)
- Cristina T. Romeo. (2018).** Evoluția & Implicațiile RAM în lumina On-Health în România, prezentare EFSA - Focal point Romania. Hotel Ramada Plaza, București. 25.10.2018. Identificabil la: http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1971-2018_EFSA_CRISTINA_RT.pdf
- Cristina T. Romeo. (2018).** Evoluția / implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar. Prezentare ASAS 06.06.2018. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1934-2018-ASAS.pdf> și <http://www.asas.ro/wcmqs/sectii/medicinaveterinara/documente/Punct%20de%20vedere%20privind%20rezitentia%20la%20medicament.pdf>
- Cristina T. Romeo.** Orientari privind utilizarea prudentă și rațională a antibioticelor la animale. Cursurile SNEC 2016. Identificabil la: http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1634-2016_SNEC_CRISTINA_T_Romeo.pdf
- Cristina T. Romeo. (2010).** Suport curs farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/890-Suport%20curs.II.pdf>
- Cristina T. Romeo (2012).** Implicațiile uzului de antibiotice și despre chinolone în terapia veterinară. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1122-2012-IOSUD-SDMVCurs.pdf>
- Cristina RT. (2006).** Introducere în farmacologia și terapia veterinară, Ed. Solness, Timișoara.
- Cristina RT, Chiurciu V. (2010).** Elemente de farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară, Ed. Brumar Timișoara
- Doma AO, Chirila AB, Dumitrescu E, Muselin F, Cristina RT. (2015).** The importance of antibiotic resistance evolution in Western Romania's swine units. *J Biotechnol*, 208 Suppl., 2015, S102. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.320
- ECDC (2010).** European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm.
- EFSA - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2012 –** The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2598 [233 pp], doi:10.2903/j.efsa.2012.2598.
- EPRUMA 2018 -** Best-practice framework for the use of antibiotics in food-producing animals Disponibil la: file:///E:/Downloads/Responsible%20Use%20of%20Anthelmintics_%20EPRUMA_FINAL%20.pdf
- Lista O.I.E** a agentilor antimicrobieni importanti în medicina veterinară http://cmvro.ro/files/download/noutati/Lista_OIE_a_agentilor_antimicrobieni.pdf
- Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015.** Trends from 2010 to 2015 (2017). Seventh ESVAC report 30 October 2017 (document EMA/184855/2017) http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf
- World Health Organisation (WHO) (2015).** Data Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation. (ISBN 978-92-4-154940-0). Disponibil la: <http://www.who.int/antimicrobialresistance/publications/surveillancesystem-manual/en/>
- World Health Organisation (WHO) (2015).** Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance ISBN 978-92-4-156494-6 Disponibil la: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/163468/9789241564946_eng.pdf?sequence=1
- World Health Organization (WHO) (2001).** Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.10
- World Health Organization Study Group (WHO) (2002).** Future trends in veterinary public health. *World Health Organ Tech Rep*

Ser., 907:1-85.
http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CD_S_CSR_DRS_2001.10.pdf

Sykes, J.E., Papich, M.G. 2013, Antifungal Drugs. In Canine and Feline Infectious Diseases, (pp.87-96), Ed. Elsevier

Scorzoni, L., Marcos, C.M., Assato, P.A., Oliveira, H.C., Costa-Orlandi, C.B., Fusco-Almeida, A.M. 2017, Antifungal Therapy:

New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis, Front. Microbiol. 8:36
Riviere, J.E., Papich, M.G. 2018, Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 10th ed., chapter Antifungal and Antiviral Drugs, Ed. Wiley Blackwel



O gamă
 variată de produse
 farmaceutice de uz veterinar

SUPLIMENTE NUTRIȚIONALE LICHIDE

Farmavit AD3E + C
 Farmavit AD3E
 Farmavit Aminocomplex
 Farmavit AD3E + KC
 Farmavit E + Se
 Vitamina E



BEDGEN 40 AS premix



EXTRACTE NATURALE DIN PLANTE

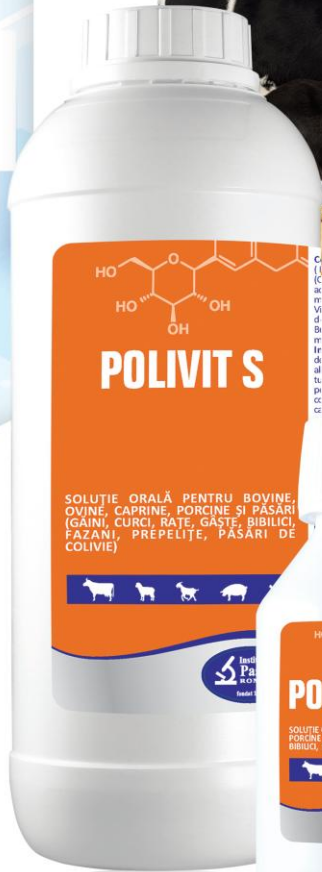
XL Herbs - dezinfectant
 ANTI AI Herbs - antiviral
 CG Herbs - tratamentul afecțiunilor aparatului respirator
 King Herbs - imunostimulator
 Entice Herbs - tratamentul afecțiunilor aparatului digestiv
 Coccilin - tra. amonului coccidiozei, histomonozoi, trichomonozoi



- * Stimulează secreția de bilă
- * Detoxifică și protejează ficatul
- * Emulsifică grăsimile
- * Imunostimulator

Îmbunătățește digestia
 Îmbunătățește producția de ouă și ecloziunea
 Reduce incidența Sindromului Ficatului Gras
 Reduce efectele eroziunii pipotei
 Stimulează sistemul imunitar

www.vetorex.ro | office@vetorex.ro | 0744.631.428



**COMPLEX DE VITAMINE
CU O COMPOZIȚIE
ECHILIBRATĂ PENTRU
STIMULAREA
SISTEMULUI IMUNITAR**

Produs fabricat în România

Utilizarea responsabilă a antimicrobielenor, noi mijloace și strategii împotriva fenomenului RAM

Responsible use of antimicrobials, new means and strategies against AMR

Romeo Teodor Cristina, Răzvan Florin Moruzi, Eugenia Dumitrescu, Florin Muselin, Alexandru Octavian Doma

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

rtcristina@yahoo.com

Cuvinte cheie: *antiinfecțioase,*

Keywords: *anti-infective,*

Rezumat

Administrarea antibioticelor trebuie să fie complementară cu bunele practici de management, multe stări de boală putând fi evitate sau reduse la minimum prin: utilizarea practicilor de management care reduc semnificativ expunerea la bacteriile generatoare de boli; optimizarea mediului pentru animal, inclusiv o bună igienă, nutriție și programe de vaccinare coerente. Sănătatea animalelor este rezultanta unei palete largi de factori grupați în: factori legați de animal, sistemul de creștere și management. Articolul prezintă noi mijloace și strategii împotriva fenomenului RAM.

Abstract

The administration of antibiotics must be complementary to good management practices, many disease conditions can be avoided or minimized by: using management practices that significantly reduce exposure to disease-causing bacteria; optimizing the animal environment, including good hygiene, nutrition and coherent vaccination programs. Animal health is the result of a wide range of factors grouped into: animal-related factors, breeding and management system. The article presents some new means and strategies against the phenomenon of AMR.

Utilizarea responsabilă a antimicrobielenor: Principii generale

Antiinfecțioasele a.u.v. constituie mijloace importante în prevenirea și tratamentul afecțiunilor bacteriene, virale, fungice și parazitare fiind esențiale pentru păstrarea sănătății și bunăstării animalelor.

Principalele obiective ale uzului de antiinfecțioase la animalele de rentă:

- Protecția sănătății publice și a animalelor.
- Utilizarea responsabilă și optimizarea eficacității fiecărui antibiotic / boli relevante, acum și în viitor.
- Instruirea permanentă a părților interesate: fermieri, profesioniști ai domeniului.

Administrarea antibioticelor trebuie să fie complementară cu bunele practici de management, multe stări de boală putând fi evitate sau reduse la minimum prin:

- utilizarea practicilor de management care reduc semnificativ expunerea la bacteriile generatoare de boli;
- optimizarea mediului pentru animal, inclusiv o bună igienă, nutriție și programe de vaccinare coerente.

Sănătatea animalelor este rezultanta unei palete largi de factori grupați în:

- 1. Factori legați de animal**
- 2. Sistemul de creștere**
- 3. Management**

Acești factori se evaluează separat, dar și în corelație, din interdependența acestora rezultând cel mai adesea complexitatea situațiilor clinice. Deci, fiecare situație poate avea specificul ei terapeutic.

Atitudinea profesională trebuie să se concentreze pe păstrarea eficienței agenților antimicrobieni și include:

- Acumularea de informații privind strategiile de prevenire, de gestionare și de diminuare a bolilor;

- Evaluarea capacității agenților antimicrobieni de a selecționa la animale, microorganismele rezistente și importanța relativă a acestei rezistențe pentru sănătatea publică și sănătatea animală;
- Respectarea recomandărilor privind utilizarea responsabilă a agenților antimicrobieni, în creșterea animalelor, în conformitate cu prevederile autorizațiilor de introducere pe piață;
- Depozitarea corespunzătoare a antiinfecțioaselor și metodele adecvate de eliminare a produselor.

Responsabilitatea medicului veterinar este de a:

- efectua o examinare clinică adecvată.
- administra / prescrie agenți antimicrobieni doar când este necesar, luând în considerare lista OIE a agenților antimicrobieni importanți în medicina veterinară;
- alege agenții antimicrobieni, pe baza experienței clinice și acolo unde este posibil, a informației legate de diagnostic, furnizate de un laborator (ex. izolarea / identificarea agentului patogen, antibiograma) (vezi fig. 1);
- asigura un protocol de tratament complet, incluzând: măsurile de precauție, timpi de așteptare, mai ales atunci când se prescrie extra-label ori off-label.



Figura 1. Criterii în alegerea agenților antimicrobieni

Soluția integrată

- Controlul eficient al antibioretistenței prin elaborarea unor kit-uri moderne de analize microbiologice și moleculare pe gene specifice cel mai frecvent întâlnite.

- Realizarea unor baze de date virtuale (de tip gene bank), pentru speciile identificate.
- Conceperea unor formule terapeutice noi, cu eficiență antimicrobiană față de o gamă largă de microorganisme.
- Detectarea precoce a antibioretistențelor, cu identificarea factorilor de risc, va duce la utilizarea rațională și în siguranță a antiinfecțioaselor la om și animale.
- Monitorizarea constantă a fenomenului rezistenței va duce la creșterea calității vieții, prin adaptarea la realitățile întâlnite, în urma utilizării metodologiilor preconizate.

Noi mijloace și strategii împotriva fenomenului RAM

Pe măsură ce rezistența la antimicrobienele convenționale crește, sunt cercetate diferite alternative la antimicrobiene, inclusiv produse obținute din principii activi din plante, vaccinuri, anticorpi, probiotice, bacteriofagi, peptide antimicrobiene, nanoconjugate (vezi fig. 2 și tabelul 1) etc.

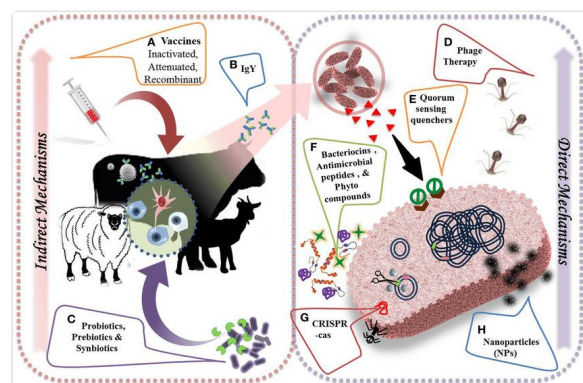


Figura 2. Alternative la antimicrobiene

Lupta împotriva RAM este constantă, iar descoperirea de noi antimicrobiene este critică. Deși antibioticele au servit omenirii în ultimii 70 de ani, capacitatea bacteriilor de a se adapta rapid, a determinat căutarea altor opțiuni. Pentru a crește eficacitatea antifungicelor se dorește obținerea unor substanțe cu toxicitate redusă, biodisponibilitate crescută, cu un spectru antifungic îmbunătățit, la care se adaugă în prezent planuri de combatere a rezistenței.

Elucidarea modului de acțiune al unui compus antifungic potențial poate scurta timpul până la obținerea medicamentului ideal.

Moleculile antifungice mici obținute din produse naturale pot reprezenta modele structurale pentru studiul relației structură-activitate, oferind astfel mai multe informații pentru potențialii agenți antifungici noi.

Limitările medicamentelor de azi:

- biodisponibilizare nesatisfăcătoare
- efect limitat
- citotoxicitate potențial mare
- tratamente lungi și frecvente

În acest context sunt necesare caracteristici specifice care pot reduce morbiditatea și mortalitatea. Lupta împotriva rezistenței antimicrobiene necesită o gamă largă de abordări și dezvoltarea de alternative la antibiotice, la oameni și animale, este esențială pentru luptă. Vaccinurile au un rol vital în combaterea rezistenței la medicamente, prin prevenirea infecțiilor în primul rând. Alternative atractive la vaccinuri (fig. 3), ar mai putea fi:

- anticorpii patogeni specifici,
- agenții imunomodulatori,
- bacteriofagii,
- peptidele antimicrobiene și
- produsele pro-, pre- sau simbiotice.

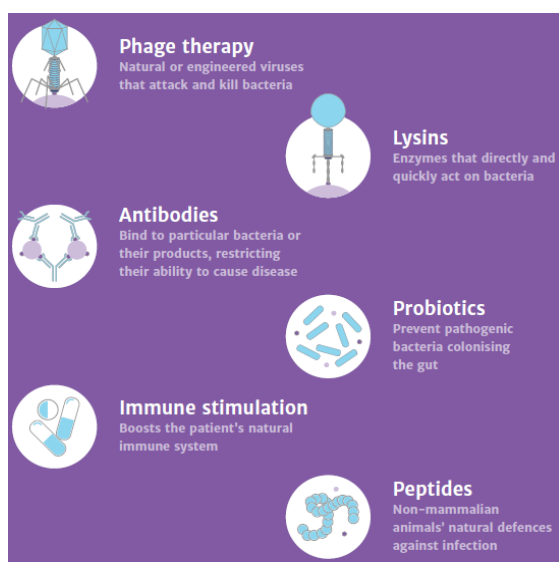


Figura 3. Alternative - combatere RAM

Exemple de reducere a consumului de antibiotice:

- un vaccin eficient pentru prevenirea furunculozei în Norvegia (Midtlyng et al., 2011).
- utilizarea unui vaccin pentru a preveni enterita produsă de *Lawsonia intracellularis* la porci.

Bacteriofagii

Bacteriofagii sau virusurile care „mănâncă” bacteriile au fost folosiți pentru a trata animalele infectate înainte ca antibioticele convenționale să fie utilizate în același scop.

Aceștia se fixează pe suprafața celulei bacteriene și apoi injectează materialul genetic în citoplasma bacteriană (vezi fig. 4).

Acesta preia ulterior controlul celulelor gazdă, ceea ce duce la sinteza componentelor fagului și la asamblarea de noi fagi în bacteriile infectate. Se produce liza bacteriană și eliberarea descendenților fagului care pot începe un al doilea ciclu de infecție.

Bacteriofagii sunt o abordare alternativă, dar selectivă, pentru a ținti bacteriile patogene și a „ignora” bacteriilor comensale.

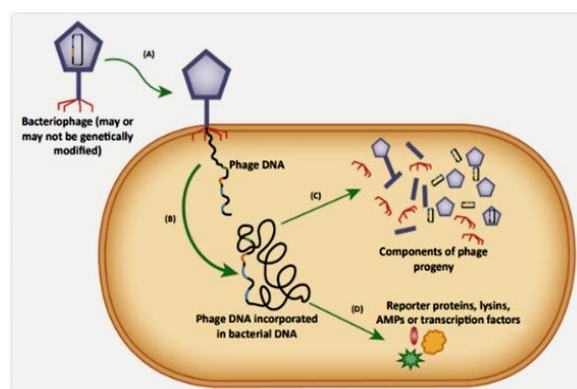


Figura 4. Mecanism de acțiune la bacteriofagi

Medicamentele eco-green

Medicamentele lipofile sunt selecționate în medicina veterinară din motivele:

- -necesitatea retardării și corelarea cu timpul de înjumătățire.
- -dezvoltarea de noi farmaci potenți și eco-green: ceftarolina, telavancina, și dalbavancina.

Nanobiotehnologia și nano-dispozitivele cuprind următoarele avantaje:

- terapie invazivă minimală
- funcții cu densitate înaltă
- concentrații în volume foarte mici

- maximizează activitatea terapeutică (vezi fig.5)
- minimizează efectele toxice secundare
- țintesc celule specifice și nu țesuturi

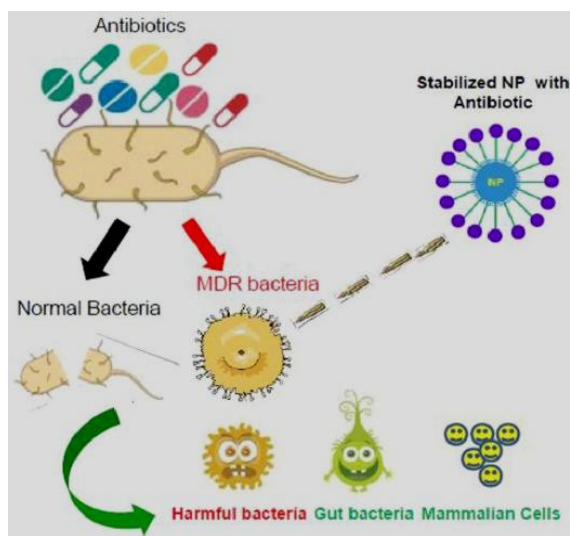


Figura 5. Modul de acțiune al unui antibiotic stabilizat cu nanoparticule

Nanoparticulele de argint (NA) au fost dezvoltate recent ca o nouă clasă de agenți antimicrobieni, împotriva a numeroase microorganisme patogene.

Nanoparticulele sunt purtătoare eficiente de medicamente (fig. 6) și sunt asociate cu creșterea biodisponibilității medicamentelor și minimizarea inhibării acțiunii unor substanțe.

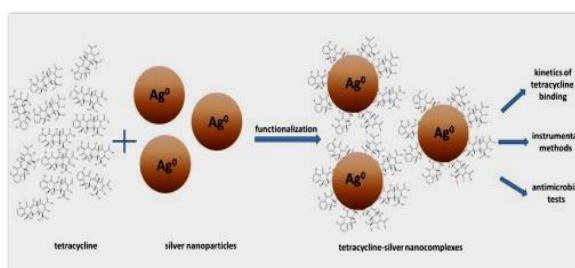


Figura 6. Nanoparticule de argint asociate cu tetracycline

Nanoparticulele de argint în terapie singulară prezintă un spectru larg de activitate antimicrobiană, incluzând: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Trichophyton rubrum*, *Trichosporon asahii*, *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Colletotrichum spp.* și *Fusarium spp.*

Nanoparticulele de argint conjugate cu nistatină și flucitozină:

- efectele fungistatice asupra *Candida albicans* ale nistatinului și flucitozinei sunt de numai 30%, respectiv 33%, comparativ cu un procent de 50%, respectiv 62% când cele două substanțe antifungice au fost conjugate cu NA, la aceeași concentrație.
- datele indică faptul că o conjugare cu NA îmbunătățește potența antifungică a diferitelor substanțe asupra *C. albicans*.

În tratamentul asupra *A. brasiliensis* cu nistatină și nistatină-NA se observă o deformare ușoară până la severă, respectiv o suprafață neregulată (Figura 7. b-c), în tratamentul cu flucitozină, a suferit modificări în comparație cu controlul (Figura 7-d).

Complexul flucitozină-NA a condus la o modificare morfologică severă (Figura 7-e), iar combinația de nistatin-NA și flucitozină-NA în amestec 1:1, a distrus complet celulele fungice (Figura 7-f).

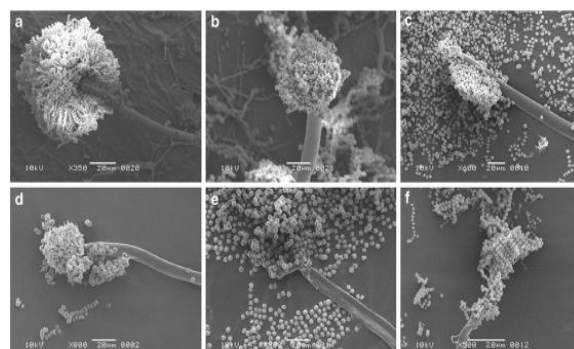


Figura 7. Tratamentul asupra *A. brasiliensis* cu nistatină și nistatină-NA

Nanoparticulele de argint, pe lângă conjugarea cu diferite substanțe active, sunt încorporate în îmbrăcăminte, încălțăminte, vopsele, pansamente pentru răni, diferite aparate, produse cosmetice și materiale plastice, datorită proprietăților antibacteriene.

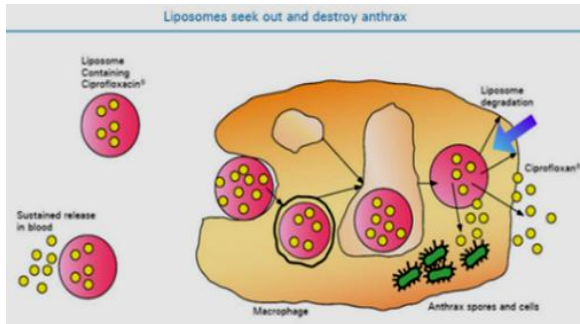
- Nano-dispozitivele sunt:
- Nanotubii,
- Nanofirele,
- Nanostructurile,
- Nanosferele,
- Nanoporii,
- Fulerenele.

Tot mai sofisticate datorită studiilor la nivel molecular, acest fapt permițând acestora să: țintească, identifice, elibereze precis substanța

activă și să monitorizeze eficacitatea terapeutică în timp real.

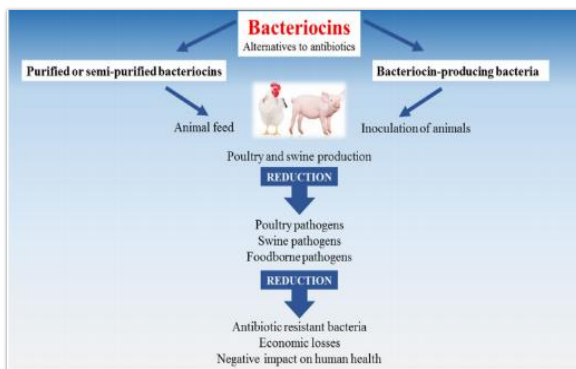
ADLib este o cale nouă de a produce anticorpi. Se deschide calea aplicatiilor în domeniul produselor de diagnostic în vederea tratamentelor personalizate.

Lipozomii



Bacteriocinele

Bacteriocinele sunt peptide bacteriene, stabile la temperaturi ridicate, sintetizate ribozomal, care prezintă activitate inhibitorie împotriva unor microorgansime patogene (3).



Bacteriocinele au fost descrise pentru prima dată în anul 1925, dar abia în ultimele două decade au oamenii de știință au început să arate un interes deosebit pentru acestea. Bacteriocinele sunt produse atât de bacterii Gram-pozitive cât și de ele Gram-negativ (3).

Mai des se utilizează bacteriocine derivate din bacterii Gram-pozitive, bacterii lactice și bacterii folosite în mod normal în fermentația alimentelor. Bacteriile lactice produc două clase de bacteriocine (3).

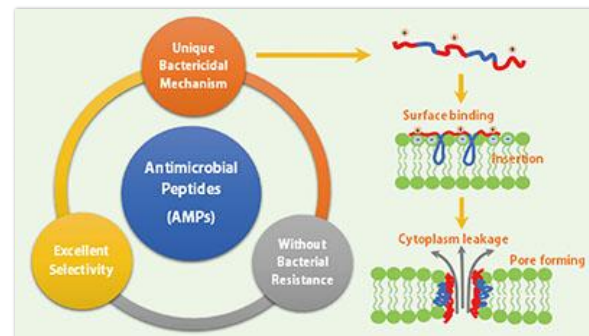
Clasa I include peptide modificate cunoscute ca bacteriocine care conțin lantionină, de exemplu nisina, linardina, azolina, cianobactina și glicocina (3).

Clasa a-II-a de include bacteriocine care nu conțin lantionină, acestea la rândul lor fiind grupate în alte 4 subclase (a,b,c,d) în funcție de dimensiunea lor (3)

Peptidele antimicrobiene

Peptidele antimicrobiene sunt peptide naturale care se găsesc atât în organismul animal, cât și în plante, fungi și bacterii.

Sunt cunoscute mai bine de 4.500 de sevcențe de peptide antimicrobiene (1).

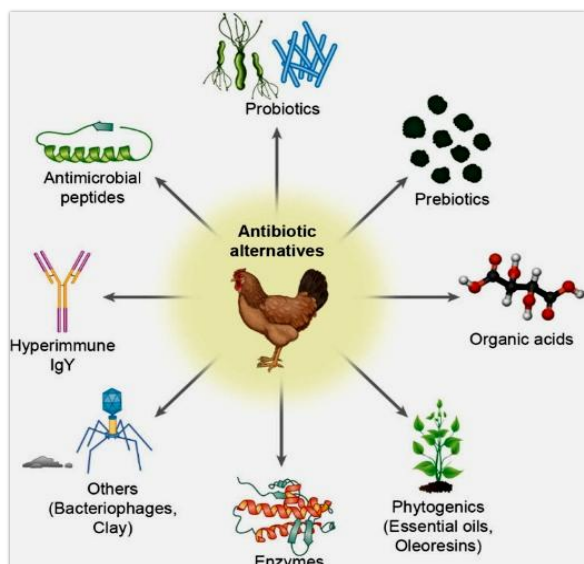


Peptidele antimicrobiene, în funcție de structură sunt împărțite în patru grupuri:

1. Peptide α -helicoidale
2. Peptide β -helicoidale, care de obicei conțin două sau mai multe legături bisulfidice
3. Peptide cu conformație de ansă, stabilizate în prezența unei singure legături bisulfidice și/sau ciclizarea lanțului peptidic
4. Peptide scurte cu conformație extinsă. În general, peptidele conțin 10-50 de amino acizi, dintre care aproximativ jumătate sunt hidrofobici (1).

Veninul de scorpion conține o sursă importantă de substanțe biologice active cu potențial terapeutic crescut și aplicații biotehnologice care pot fi folosite ca prototipuri pentru dezvoltarea unor medicamente noi (2).

În veninul diferitelor specii de scorpioni au fost identificate peptide cu activitate antimicrobiană, care nu conțin legături sulfurice, care au un caracter hidrofobic, ceea ce permite interacțiunea cu membranele celulare ale microorganismelor. Din veninul de scorpion s-au obținut două peptide analoge, Stigmurin, numite StigA25 și StigA31 (2).



Genetica

Cercetătorii au reprogramat genetic un serotip de *E. coli*. Acesta poate ucide chiar și alte grupuri de bacterii responsabile pentru infecțiile greu de tratat prezente în: plămâni, vezică urinară ori de pe dispozitivele medicale implantate.

CRISPR-Cas9

Cercetătorii au conceput o plasmidă care poate elimina o genă de rezistență la antibiotice din bacteria *Enterococcus faecalis*,

ceea ce ar putea duce la noi metode de combatere a rezistenței la antibiotice. Mecanismul folosit pentru eliminarea genelor de rezistență la antibiotice este proteina specializată, CRISPR-Cas9 care poate face "tăieri" aproape oriunde la nivelul ADN.

Alături de CRISPR-Cas9 (vezi fig. 8), s-au adăugat secvențe de ARN omologe ADN-ului din gena de rezistență la antibiotice la plasmida proiectată. Aceste ARN-uri ghidează CRISPR-Cas9 pentru a face reducerile în locurile potrivite.

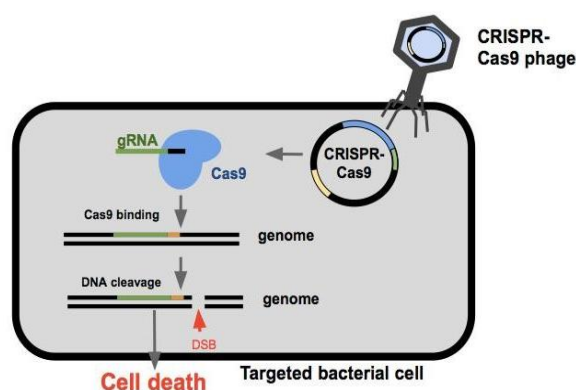


Figura 8. CRISPR-Cas9

Tabel 1.
Principalele alternative - avantajele și dezavantajele acestora

Structura	Avantaje	Posibile dezavantaje
Bacteriofagi	Produse farmaceutice autoreplicante Selectiv pentru tulpinile specifice de bacterii Potrivit ingineriei genetice	Imunogenitatea. Farmacocinetica Eliberarea de endotoxine bacteriene Dezvoltarea rezistenței
Lizină	Potrivit ingineriei genetice Selectiv pentru tulpinile specifice de bacterii Nu este predispusă la dezvoltarea rezistenței	Producerea Insuficiente date
CRISPR/Cas9	Poate fi reglat pentru o varietate de aplicații antimicrobiene Scăderea consumului de antibiotice Specificitate pentru tulpinile patogene	Producție pe scară largă scumpă Toxicitate
Peptide antimicrobiene	Nu este predispus la dezvoltarea rezistenței Activitatea cu spectru larg	Producție pe scară largă scumpă Sensibile la proteoliză. Toxicitate
Bacteriocină	Specificitate pentru tulpinile patogene de bacteria. Rezistența la căldură și la UV	Producție pe scară largă scumpă Sensibile la proteoliză
SMAMPsa (Peptide antimicrobiene sintetice)	Ușor de sintetizat Nu este predispus la dezvoltarea rezistenței Activitatea cu spectru larg	Toxicitate Calea de administrare
Probiotice	Disponibilitate ușoară	Folosit mai ales pentru infecții intestinale
Anticorpi	Selectiv pentru tulpinile specifice de bacterii Microflora protejată	Cost ridicat de producție Perioada de valabilitate

Plantele reprezintă o sursă primară pentru obținerea de produse medicinale noi (Hostettman, 1999). Principii activi ai plantelor au diverse acțiuni farmacodinamice, cum ar fi antiinflamatoare, anticarcinogene și antiaterosclerotice, antibacteriene, antifungice, antivirale, antimutagene și antialergice (Ikken și colab., 1999; Noguchi și colab., 1999; Mishra și colab., 2009)

Plante și produsele naturale cu activitate antifungică

Utilizarea plantelor medicinale în tratamentul afecțiunilor cutanate, inclusiv asupra infecțiilor micotice, este o practică veche în multe părți ale lumii. Această utilizare a fost susținută de izolarea compușilor antifungici activi din extractele plantelor. Se cunoaște faptul că uleiurile esențiale ale multor plante au activitate atât antibacteriană cât și antifungică (vezi tabelul 2).

Tabel 2.
Plante cu activitate antifungică

Plante	Fungi
<i>Kaempferia galanga</i> (ghimbir aromată)	<i>Saprolignea parasitica</i> (pești)
<i>Salvia texana</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Candida albicans</i>
<i>Nigella sativa</i>	Dermatofiti
<i>Melaleuca alternifolia</i> (arbore de ceai)	<i>Aspergillus spp.</i> , Dermatofiti <i>Candida albicans</i>
<i>Daucus carota</i> (morcov)	<i>Cryptococcus neoformans</i> , Dermatofiti
<i>Anacardium occidentale</i> (arborele de caju)	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Caryophyllus aromaticus</i>	Dermatofiti Candidoze
<i>Centella asiatica</i>	<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i>
<i>Aloe vera</i>	<i>Trichophyton verrucosum</i>
<i>Hypericum perforatum</i> (Sunătoare)	Dermatofiti, <i>Malassezia furfur</i> , <i>Candida albicans</i>
<i>Mentha spicata</i>	<i>T. rubrum</i> <i>M. gypseum</i>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Microsporum canis</i>
<i>Artemisia sieberi</i>	<i>T. rubrum</i> , <i>T. verrucosum</i> , <i>T. schoenleinii</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i>

Caryophyllus aromaticus (arborele ce produce cunoscutele „cuișoare”) este renumit pentru uleiul volatil bogat în eugenol cu certe proprietăți antibacteriene și antifungice

destinat tratamentului dermatofitozelor la animale.

O altă specie recunoscută pentru proprietățile antimicrobiene este *Melaleuca alternifolia*, ce produce un ulei volatil (tea tree oil) bogat în terpineol, terpinen și cineol, cu spectru de acțiune atât bacterian cât și fungic larg. Gelul cu 5% ulei volatil de *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Anti-Fungal Gel, vezi fig. 9) destinat tratamentului topic al dermatofitozelor.



Figura 9. Tea Tree Anti-Fungal Gel cu ulei de *Melaleuca alternifolia*

Usturoiul (*Allium sativum*) prezintă activitate antibacteriană și antifungică, astfel uleiurile esențiale, extractele în apă și etanol inhibă creșterea *in vitro* a speciilor *Bacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida spp.* și *Cryptococcus spp.* 1

Într-un studiu realizat de Hassan și Hany s-a demonstrat activitatea antifungică a gelului de Aloe vera asupra dermatofitelor, respectiv *Trichophyton verrucosum*, prin aplicări topice zilnice, rezultatele fiind comparate cu efectele aplicării unui unguent cu 10% iod pt. 20 de zile.

După 6 zile de tratament cu gelul de Aloe vera activitatea dermatofitelor a fost redusă semnificativ.

Leziunile au început să scadă treptat și, în două săptămâni, părul a început să crească. În grupul tratat cu iod, leziunile s-au retras după zece zile de tratament și regresia părului a început după două săptămâni. În termen de o lună a existat o recuperare completă în ambele grupuri tratate

Propolisul

Principalele componente sunt rășinile și balsamurile (50 - 55%), ceara (25 -35%), uleiurile aromate și eterice (10%), polenul (5%) și substanțe organice și minerale (5%)

Activitatea biologică este direct legată de conținutul de fenoli și flavonoide, acesta este utilizat pe scară largă în industria farmaceutică, cosmetică, veterinară și alimentară.

Pe lângă acțiunea antibacteriană, antivirală, citotoxică, imunomodulatoare și anestezică, propolisul manifestă și importante proprietăți antifungice, mai ales față de speciile genului *Candida* și dermatofiti, deși inhibă și dezvoltarea altor specii fungice la concentrații destul de mici, acesta potențează substanțele medicamentoase antifungice, acționând sinergic cu acestea.

Extractele de 5–10% în propilenglicol, manifestă un efect antimicotic cert, chiar fără asocierea cu alte antifungice

Plante cu activitate antibacteriană:

Angelica (*Angelica archangelica* L.), Anghinarea (*Cynara scolymus* L, *Cynara cardunculus* L.), Arnica (*Arnica montana* L.), Cimbrisorul (*Thymus serpyllus* L.) *antibioticul săracului*, Iarba mare (omanul) (*Inula helenium* L.), Schinelul (*Cnicus benedictus* L.), Coadă calului (*Equisetum arvense* L.), Urzica (*Urtica dioica* L., *Urtica urens* L.), Cuișoare (*Syzygium aromaticum*), Usturoiul (alicina), Salvia, Rozmarinul, Cimbrul și Oregano.

Apa activată cu plasmă rece (PAW)

Apa activată cu plasmă rece sau non-termică face parte din o nouă generație de antimicrobieni, extrem de eficienți împotriva microorganismelor de interes medical.

Plasma rece poate fi produsă de diferite tipuri de descărcări electrice de laborator și se încadrează în categoria procedurilor de oxidare avansată.

Tehnologia Glid Arc, de producere, cuprinde următoarele avantaje cum ar fi: timpul de activare (20 min) este mult mai mic decât prin alte tehnologii, eficiența activării

este mult mai bună și implementarea sa practică este relativ ușoară.

Grupările prezente în plasma reactorului, în principal radicalii OH și NO (oxizii de azot), când aerul umed este gazul de lucru, sunt precursori de H₂O₂, HNO₃ (acid azotic) și HNO₂ (acid azotos) în apă, cu un efect de acidificare temporară a soluției activate, ajungându-se până la un pH < 3,5.

Peroxidul de hidrogen (H₂O₂), grupările nitrati (NO₃) și nitriți (NO₂), sunt responsabile de degradarea peretelui bacterian, prin efectul oxidant asupra proteinelor, lipidelor și ADN-ului.

Durata de activitate chimică a acestor compuși este de până la 48 de ore prin intermediul unor reacții secundare de difuzie controlată pe care le produc și de aceea tratamentul cu apă activată este eficient și după întreruperea producerii plasmă, deci fără un consum suplimentar de energie, fenomen numit TPDR (reacții post-descărcare în timp).

Într-un studiu s-a încercat o formulare care să încorporeze PAW, sub formă de hidrogel (pe bază de acrilamidă) și s-a urmărit eficacitatea acestui hidrogel activat cu plasmă non-termică, și posibilitatea folosirii acestuia ca un nou produs cu activitate antifungică. Rezultatele au relevat că abilitățile antifungice ale PAH-15 min și PAH-30 min au fost mai bune decât cea a grupului fluconazol.

Acest lucru sugerează că PAH are capacități de inhibare mai bune decât unii agenți antifungici tradiționali

Unele alternative au avut consecințe negative pt. sănătatea publică

Suplimentarea cu oligoelemente, ex. Zn și Cu, ca alternativă la controlul colibacilozei suine (Fairbrother, 2005; Hojberg 2005), a crescut semnificativ proporția de *E. coli* multirezistente in vivo în microbiomul enteral al porcilor și o rezistență crescută la meticilină în cazul stafilococilor.

Bibliografie

1. Molchanova, N., Hansen, P.R., Franzyk, H. 2017, *Advances in Development of*

- Antimicrobial Peptidomimetics as Potential Drugs, *Molecules* 22(9):1430
2. **Amorium-Carmon, B., Silva, A.D., Parente, A.M.S., Furtado, A.A., Carvalho, E., Oliviera, J.W.E., Santos, E.C.G., Silva, M.S., Silva, S.R.B., Silva-Junior, A.A., Monteiro, N.K., Fernandes-Pedrosa, M.E.** 2019, Potent and Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of Analogs from the Scorpion Peptide Stigmurin, *Int. J. Mol. Sci.* 20(3):623
 3. **Lopetuso, L.R., Giorgio, M.E., Saviano, A., Scaldaferrri, F., Gasbarrini, A., Cammarota, G.** 2018, Bacteriocins and Bacteriophages: Therapeutic Weapons for Gastrointestinal Diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(1):183
- Nota:** alături de bibliografia citată, la redactarea acestui articol au fost citate integral sau parțial pasaje din următoarele materiale:
- Cristina T. Romeo, Doma O. Alexandru, Dumitrescu E, Muselin F, Chirilă B.A. (2018).** Despre evoluția și implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar și evoluția acestui fenomen în România. *Medicamentul Veterinar / Veterinary Drug*, 2018, 12(1):4-49. Identificabil la: [http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1948-2018_VD_12\(1\)_ART2.RO.pdf](http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1948-2018_VD_12(1)_ART2.RO.pdf)
- Cristina T. Romeo (2018).** Evoluția & Implicațiile RAM în lumina On-Health în România, prezentare EFSA - Focal point Romania. Hotel Ramada Plaza, București. 25.10.2018. Identificabil la: http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1971-2018_EFSA_CRISTINA_RT.pdf
- Cristina T. Romeo (2018).** Evoluția / implicațiile fenomenului rezistenței la medicamentele antiinfecțioase și antiparazitare de uz veterinar. Prezentare ASAS 06.06.2018. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1934-2018-ASAS.pdf> și <http://www.asas.ro/wcmqs/sectii/medicinaveterinara/documente/Punct%20de%20vedere%20privind%20rezitentia%20la%20medicament.pdf>
- Cristina T. Romeo.** Orientari privind utilizarea prudentă și rațională a antibioticelor la animale. Cursurile SNEC 2016. Identificabil la: http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1634-2016_SNEC_CRISTINA_T_Romeo.pdf
- Cristina T. Romeo (2010).** Suport curs farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/890-Suport%20curs.II.pdf>
- Cristina T. Romeo (2012).** Implicațiile uzului de antibiotice și despre chinolone în terapia veterinară. Identificabil la: <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/1122-2012-IOSUD-SDMVCurs.pdf>
- Cristina RT (2006).** Introducere în farmacologia și terapia veterinară, Ed. Solness, Timișoara.
- Cristina RT, Chiurciu V (2010).** Elemente de farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară, Ed. Brumar Timisoara
- Doma AO, Chirila AB, Dumitrescu E, Muselin F, Cristina RT (2015).** The importance of antibiotic resistance evolution in Western Romania's swine units. *J Biotechnol*, 208 Suppl., 2015, S102. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.320
- ECDC (2010).** European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm.
- EFSA - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control 2012 –** The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2598 [233 pp], doi:10.2903/j.efsa.2012.2598.
- EPRUMA 2018 -** Best-practice framework for the use of antibiotics in food-producing animals Disponibil la: file:///E:/Downloads/Responsible%20Use%20of%20Anthelmintics_%20EPRUMA_FINAL%20.pdf
- Lista O.I.E** a agentilor antimicrobieni importanti în medicina veterinară http://cmvro.ro/files/download/noutati/Lista_OIE_a_agentilor_antimicrobieni.pdf

Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. Trends from 2010 to 2015 (2017). Seventh ESVAC report 30 October 2017 (document EMA/184855/2017)

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf

World Health Organisation (WHO) (2015). Data Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation. (ISBN 978-92-4-154940-0). Disponibil la:

<http://www.who.int/antimicrobialresistance/publications/surveillancesystem-manual/en/>

World Health Organisation (WHO) (2015). Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance ISBN 978-92-4-156494-6 Disponibil la:

http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/163468/9789241564946_eng.pdf?sequence=1

World Health Organization (WHO) (2001). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.10

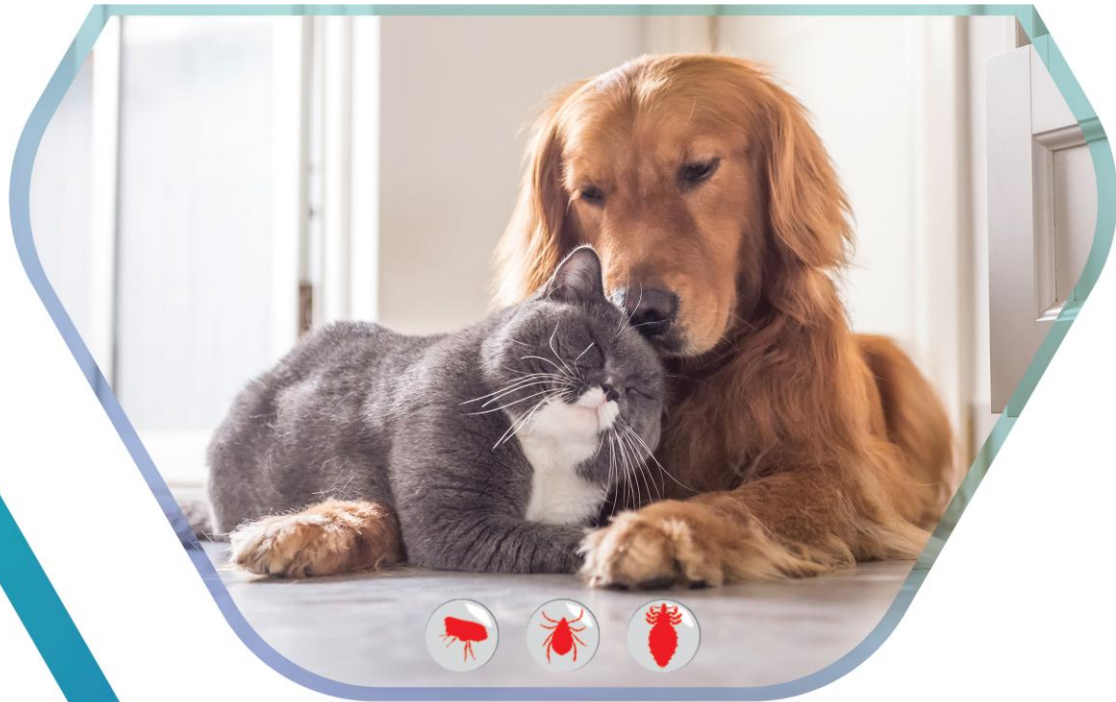
World Health Organization Study Group (WHO) (2002). Future trends in veterinary public health. World Health Organ Tech Rep Ser., 907:1-85.

http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.10.pdf

Sykes, J.E., Papich, M.G. 2013, Antifungal Drugs. In Canine and Feline Infectious Diseases, (pp.87-96), Ed. Elsevier

Scorzoni, L., Marcos, C.M., Assato, P.A., Oliveira, H.C., Costa-Orlandi, C.B., Fusco-Almeida, A.M. 2017, Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis, Front. Microbiol. 8:36

Riviere, J.E., Papich, M.G. 2018, Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 10th ed., chapter Antifungal and Antiviral Drugs, Ed. Wiley Blackwell



PETSPOT FORTE

Fipronil Pyriproxyfen



Talie mare
20-40 kg



Talie medie
10-20 kg



Talie mică
2-10 kg



Toată talia
1-10 kg



eficient până la
4 săptămâni !

Previne infestația și elimină
căpușele, purcii, păduchii.

Formulă eficientă pe bază de fipronil și pyriproxyfen



FARMAVET
Ești pe mâini bune

▼ *Lucrări originale / Original papers*

Cuantificarea lizozimului din extracte apoase de albuș de ou hiperimun și din produse biologice prin testul ELISA Sandwich

Quantification of lysozyme in hyperimmune egg white aqueous extracts and in biological products by Sandwich ELISA test

Viorica Chiurciu¹, Mariana Oporanu¹, V. Iordănescu¹, Lucica Sima¹, Teodora Supeanu¹
¹Romvac Company S.A., Șos. de Centură, nr. 7, Voluntari, RO 77190 Ilfov, România

lucica.sima@romvac.ro

Cuvinte cheie: lizozim, ou hiperimun, test ELISA

Key words: lysozyme, hyperimmune egg, ELISA test

Rezumat

Lizozimul este o proteină biologic activă prezentă în albușul de ou, având rol esențial în apărarea imunitară a embrionului. Datorită proprietăților sale antimicrobiene, acesta se extrage și se utilizează în prepararea diferitelor produse cu rol de conservant și/ sau de ingredient bioactiv. Analiza calitativă și cantitativă a acestuia poate fi efectuată prin variate metode de testare prezentate pe larg în literatura de specialitate. Lucrarea de față prezintă rezultatele obținute în urma evaluării conținutului de lizozim din soluții apoase derivate din albuș de ou hiperimun și din produsele biologice active în care acesta a fost inclus folosind tehnica ELISA sandwich.

Abstract

Lysozyme is a biologically active protein present in egg whites, having an essential role in the immune defense of the embryo. Due to its antimicrobial properties, it is extracted and used in the composition of various products as a preservative and/or a bioactive ingredient. Its qualitative and quantitative analysis can be performed by various test methods widely presented in the literature. The present paper presents the results obtained in assessing the lysozyme content of aqueous solutions derived from hyperimmune egg white and from biologically active products in which it was included by using the sandwich ELISA technique.

Introducere

Lizozimul (N-acetilmuramid glicanhidrolază sau muramidază) este o enzimă omniprezentă într-o varietate de lichide biologice și țesuturi atât la animale cât și la plante. Acesta este considerat o proteină-model utilizată în studii imunologice, structurale, fiziologice, cristalografice și de evoluție (Vidal și col., 2005). Sursa principală de lizozim este albușul de ou, acesta reprezentând 3,4% din totalul proteinelor. De altfel, lizozimul reprezintă un factor cheie al sistemului imunitar al embrionului, având rol protector împotriva agresiunii bacteriene (Schneider și col., 2010). Sunt binecunoscute proprietățile sale antibacteriene, dar și cele antivirale, antitumorale și imunomodulatoare.

De aceea, lizozimul este folosit drept conservant în industria alimentară și în produsele farmaceutice (Kerkaert și col., 2010). Cercetătorii au utilizat o serie de metode de cuantificare a lizozimului, una dintre ele având la bază acțiunea litică a acestei enzime asupra peretelui celular al *Micrococcus lysodeikticus*. Alte metode de cuantificare a lizozimului se bazează pe evidențierea proteinei prin tehnici electroforetice, cromatografice și imunoenzimatice (MacKay și col., 1984). Tehnica ELISA, varianta sandwich, datorită sensibilității și specificității ridicate, se utilizează pentru determinarea cantitativă a lizozimului, fiind aplicabilă pentru o gamă variată de probe (ser, plasmă, lapte, lizate

celulare, omogenate tisulare, produse biologice care conțin albuș, alte lichide biologice) (Kerkaert și col., 2010; MacKay și col., 1984; Thonar și col., 1988).

Departamentul de Cercetare-Dezvoltare al Companiei Romvac a demarat un experiment care a vizat obținerea de produse terapeutice pe bază de lizozim, desfășurat în mai multe etape: extracția acestuia din albuș de ou hiperimun, purificarea, caracterizarea și încorporarea în produse variate și evaluarea acestora privind conținutul de lizozim. Prezenta lucrare descrie experimentele în care 8 probe constând în soluții apoase de albuș de ou hiperimun și produse biologic active cu conținut variabil de lizozim sunt analizate cantitativ prin tehnica ELISA sandwich.

1. Material și Metodă

Cuantificarea lizozimului a fost efectuată prin tehnica ELISA sandwich utilizând kit-ul de reagenți Chicken LYZ / Lysozyme ELISA Kit (LifeSpan BioSciences, Inc.), descris în Tabelul 1. Acesta presupune o detecție colorimetrică la o lungime de undă de 450 nm, substratul cromogenic utilizat fiind TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidină).

Capacitatea de detecție a kit-ului este de 0,625-40 ng/mL, iar sensibilitatea este de obicei până la valoarea de 0,262 ng/mL.

Tabelul 1. Componentele kitului Chicken LYZ / Lysozyme ELISA (Sandwich ELISA)

Componente	Cantitate
Placă ELISA cu 96 stripuri căptușite	1 buc.
Standard liofilizat	2 flacoane
Diluant pentru probe	1 flacon cu 20 mL
Diluant de analiză A	1 flacon cu 12 mL
Diluant de analiză B	1 flacon cu 12 mL
Reagent de detecție A	1 flacon cu 120 μL
Reagent de detecție B	1 flacon cu 120 μL
Tampon de spălare (30x)	1 flacon cu 20 mL
Substrat TMB	1 flacon cu 9 mL
Soluție de spălare	1 flacon cu 6 mL
Folii adezive pentru placă	4 buc.

Probele testate au fost următoarele:

- P1 - Lizozim extras în soluție apoasă,
- P2 - Lizozim extras în soluție apoasă și concentrat,

- P3 - Proteine bioactive extrase din gălbenuș și albuș de ou hiperimun în soluție apoasă,
- P4 - Lizozim liofilizat și reconstituit la concentrația de 1 mg/ mL,
- P5 - Lizozim extras în soluție apoasă din ouă hiperimune recoltate de la găini hiperimunizate cu antigenul monovalent *Staphylococcus aureus*,
- P6 - Gel cu 46% soluție apoasă de lizozim,
- P7 - Gel cu 40% soluție apoasă de lizozim,
- P8 - Cremă cu lizozim.

Proba 5 conține lizozim extras din ouă recoltate de la găini hiperimunizate cu antigenul *Staphylococcus aureus*; celelalte probe conțin lizozim extras din ouă recoltate de la găini hiperimunizate cu antigen multiplu:

- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Klebsiella pneumoniae*,
- *Salmonella spp.*,
- *Escherichia coli*,
- *Enterococcus faecalis*,
- *Salmonella enteritidis*,
- *Salmonella typhimurium*,
- *Streptococcus mutans*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Streptococcus grup B*,
- *Proteus mirabilis*,
- *Acinetobacter baumannii*,
- *Helicobacter pylori*,
- *Clostridium difficile*,
- *Candida albicans*,
- *Candida glabrata*,
- *Candida krusei*.

1.1. Prepararea probelor

Pentru a putea calcula concentrația de lizozim din probe, valorile densității optice (DO_{450nm}) obținute în urma citirii la spectrofotometru trebuie să se încadreze în gama de valori DO obținute pentru lizozimul standard. În acest scop, probele sunt pregătite în diluții seriale, conform recomandărilor producătorului kitului, respectiv urmând Tabelul 2.

Tabelul 2. Prepararea de diluții seriale pentru probele testate

Tub	Diluția	Preparare
Tub 1	1:1	250 μ L probă
Tub 2	1:10	225 μ L tampon diluție + 25 μ L soluție din Tub 1
Tub 3	1:100	225 μ L tampon diluție + 25 μ L soluție din Tub 2
Tub 4	1:10 ³	225 μ L tampon diluție + 25 μ L soluție din Tub 3
Tub 5	1:10 ⁴	225 μ L tampon diluție + 25 μ L soluție din Tub 4
Tub 6	1:10 ⁵	225 μ L tampon diluție + 25 μ L soluție din Tub 5
Tub 7	1:10 ⁶	225 μ L tampon diluție + 25 μ L soluție din Tub 6
Tub 8	1:10 ⁷	225 μ L tampon diluție + 25 μ L soluție din Tub 7

1.2. Prepararea lizozimului standard

Se resuspendă lizozimul standard liofilizat în 1 mL diluant pentru probe. Se obține astfel o soluție a acestuia de concentrație 80 ng/mL. Soluția respectivă se prepară în diluții seriale (**Tabelul 3**), care se folosesc imediat pentru testare.

Tabelul 3. Prepararea lizozimului standard în diluții seriale

Tub	Diluția	Preparare
Tub 1	40 ng/mL	250 μ L tampon diluție + 250 μ L standard
Tub 2	20 ng/mL	250 μ L tampon diluție + 250 μ L soluție din Tub 1
Tub 3	10 ng/mL	250 μ L tampon diluție + 250 μ L soluție din Tub 2
Tub 4	5 ng/mL	250 μ L tampon diluție + 250 μ L soluție din Tub 3
Tub 5	2,5 ng/mL	250 μ L tampon diluție + 250 μ L soluție din Tub 4
Tub 6	1,25 ng/mL	250 μ L tampon diluție + 250 μ L soluție din Tub 5
Tub 7	0,625 ng/mL	250 μ L tampon diluție + 250 μ L soluție din Tub 6
Tub 8	0 ng/mL	250 μ L tampon diluție

1.3. Prepararea reagenților

Toți reagenții se aduc la temperatura camerei înainte de utilizare.

Reagenții de detecție A și B. Se pregătesc cantități suficiente de reagenți necesari testării probelor.

Se diluează Reagentul de detecție A într-o diluție de 1:100 utilizând Diluant de

analiză A. Se diluează Reagentul de detecție B într-o diluție de 1:100 utilizând Diluant de analiză B.

Soluția de spălare. Se prepară 600 mL Soluție de spălare prin diluarea a 20 mL soluție concentrată de 30x cu 580 mL apă deionizată. Soluția de spălare se depozitează apoi la 4°C.

Substratul TMB. Se extrage cantitatea necesară utilizând materiale sterile.

1.2.1. Tehnica de lucru

Reagenții și probele se aduc la temperatura camerei fără încălzire suplimentară și se amestecă ușor prin agitare, evitând spumarea. Se prepară reagenții, standardul și probele.

1. Se aplică câte 100 μ L de lizozim standard, martor negativ și probe în godeuri, se acoperă cu folie și se incubează 1 h la 37°C.
2. Se aspiră lichidul din fiecare godeu, nu se spală.
3. Se adaugă 100 μ L soluție de Reagent de detecție A în fiecare godeu, se acoperă cu folie și se agită ușor pentru amestec. Se incubează 1 h la 37°C.
4. Se aspiră lichidul din fiecare godeu și se spală de 3 ori. A se lăsa fiecare spălare să stea 1-2 minute înainte de a fi aspirată complet. După ultima spălare, a se aspira pentru îndepărtarea tamponului de spălare rămas, apoi a se răsturna placa să atingă o hârtie absorbantă curată.
5. Se adaugă 100 μ L soluție de Reagent de detecție B în fiecare godeu și se acoperă cu o altă folie. Se incubează 30 min la 37°C.
6. Se aspiră lichidul din fiecare godeu și se spală de câte 5 ori în mod similar pasului 4.
7. Se adaugă 90 μ L TMB, se acoperă cu o altă folie și se incubează 10-20 min la 37°C. A se feri de lumină și a se urmări periodic virarea culorii.
8. Se adaugă 50 μ L soluție de stopare în fiecare godeu. Se adaugă în aceeași ordine în care s-a adăugat TMB.
9. Se citește imediat densitatea optică (DO_{450} nm).

2. Rezultate și Discuții

Lizozimul extras din albuș de ou hiperimun și cel integrat în produse biologice a fost cuantificat prin metoda ELISA sandwich utilizând kit-ul de reagenți Chicken LYZ/ Lysozyme ELISA Kit (LifeSpan BioSciences, Inc.).

Lizozimul standard din kit (80 ng/mL) aplicat în diluții seriale (40 ng/mL; 20 ng/mL; 10 ng/mL; 5 ng/mL; 2,5 ng/mL; 1,25 ng/mL; 0,625 ng/mL) a fost utilizat pentru a realiza curbe de calibrare (Figura 1 și Figura 2) pe baza valorilor DO_{450nm} măsurate.

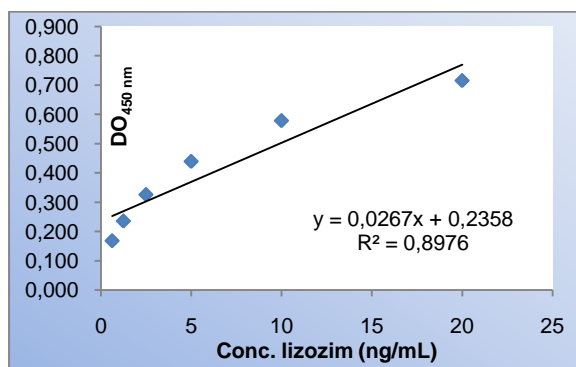


Figura 1. Curba de calibrare utilizată pentru determinarea cantitativă a lizozimului din probele P1-P4, reprezentând soluții apoase

Pentru prima curbă de calibrare s-a obținut ecuația dreptei $y = 0,0267x + 0,2358$ cu un coeficient de corelație $R^2 = 0,8976$, ilustrată în Figura 1.

Utilizând această ecuație s-au calculat concentrațiile de lizozim din probele P1-P4.

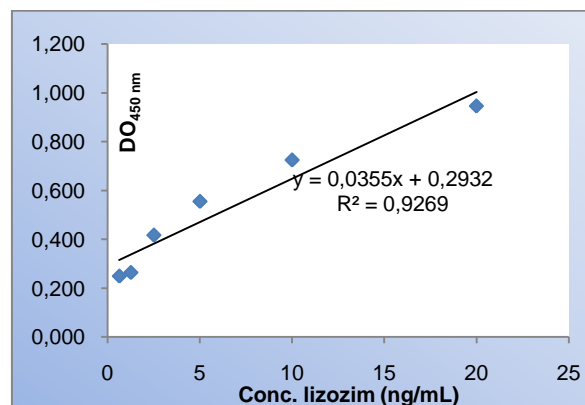


Figura 2. Curba de calibrare utilizată pentru determinarea concentrației de lizozim din probele P5-P8 reprezentând produse biologice

Pentru a doua curbă de calibrare s-a obținut ecuația dreptei $y = 0,0355x + 0,2932$, cu un coeficient de corelație $R^2 = 0,9269$, ilustrată în Figura 2.

Utilizând această ecuație s-au calculat concentrațiile de lizozim din probele P5-P8, reprezentând produse biologice.

Ținând cont de tehnica de extracție a lizozimului din albuș și de modul de preparare a produselor în care a fost încorporat, probele P1, P2, P4 au fost diluate serial începând cu diluția $1:10^3$; P3 și P5 începând cu diluția $1:10^2$; P6 și P7 diluate începând cu $1:10$, iar P8 începând cu diluția $1:2$ (Tabelele 4 și 5).

Rezultatele obținute sunt prezentate în Figurile 3 și 4 și în Tabelele 6 și 7.

Tabelul 4.
Configurarea plăcii ELISA nr. 1

	Standard	Standard	Probe	Probe	Probe	Probe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	St dil 1	St dil 1	P1 $1:10^3$	P1 $1:10^3$	P3 $1:10^2$	P3 $1:10^2$							A
B	St dil 2	St dil 2	P1 $1:10^4$	P1 $1:10^4$	P3 $1:10^3$	P3 $1:10^3$							B
C	St dil 3	St dil 3	P1 $1:10^5$	P1 $1:10^5$	P3 $1:10^4$	P3 $1:10^4$							C
D	St dil 4	St dil 4	P1 $1:10^6$	P1 $1:10^6$	P3 $1:10^5$	P3 $1:10^5$							D
E	St dil 5	St dil 5	P2 $1:10^3$	P2 $1:10^3$	P4 $1:10^3$	P4 $1:10^3$							E
F	St dil 6	St dil 6	P2 $1:10^4$	P2 $1:10^4$	P4 $1:10^4$	P4 $1:10^4$							F
G	St dil 7	St dil 7	P2 $1:10^5$	P2 $1:10^5$	P4 $1:10^5$	P4 $1:10^5$							G
H	Blank	Blank	P2 $1:10^6$	P2 $1:10^6$	P4 $1:10^6$	P4 $1:10^6$							H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

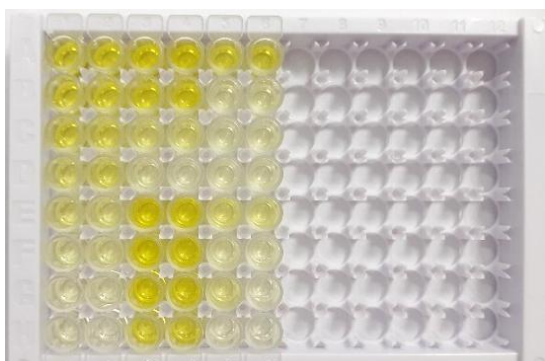


Figura 3. Imaginea plăcii ELISA nr. 1

Tabelul 5.

Valorile densităților optice obținute pentru lizozimul standard și Probele testate P1-P4

	Standard	Standard	Probe	Probe	Probe	Probe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.791	0.889	1.130	1.211	0.732	0.714							A
B	0.701	0.730	0.860	0.946	0.193	0.228							B
C	0.629	0.529	0.359	0.340	0.183	0.198							C
D	0.402	0.478	0.196	0.149	0.170	0.177							D
E	0.346	0.308	1.356	1.077	0.369	0.314							E
F	0.225	0.247	1.352	1.111	0.199	0.185							F
G	0.167	0.171	1.205	1.027	0.302	0.139							G
H	0.156	0.114	0.669	0.697	0.139	0.126							H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Se remarcă valori medii ale DO $\bar{x} = 1,171$ ridicate decât valoarea medie a DO pentru pentru proba P 1 și $\bar{x} = 1,216$ pentru P2 mai lizozimul standard ($\bar{x} = 0,840$) la aceeași diluție.

Tabelul 6.

Configurarea plăcii ELISA nr. 2

	Standard	Standard	Probe	Probe	Probe	Probe							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	St dil 1	St dil 1	P5 1:10 ²	P5 1:10 ²	P7 1:10	P7 1:10							A
B	St dil 2	St dil 2	P5 1:10 ³	P5 1:10 ³	P7 1:10 ²	P7 1:10 ²							B
C	St dil 3	St dil 3	P5 1:10 ⁴	P5 1:10 ⁴	P7 1:10 ³	P7 1:10 ³							C
D	St dil 4	St dil 4	P5 1:10 ⁵	P5 1:10 ⁵	P7 1:10 ⁴	P7 1:10 ⁴							D
E	St dil 5	St dil 5	P6 1:10	P6 1:10	P8 1:2	P8 1:2							E
F	St dil 6	St dil 6	P6 1:10 ²	P6 1:10 ²	P8 1:10	P8 1:10							F
G	St dil 7	St dil 7	P6 1:10 ³	P6 1:10 ³	P8 1:10 ²	P8 1:10 ²							G
H	Blank	Blank	P6 1:10 ⁴	P6 1:10 ⁴	P8 1:10 ³	P8 1:10 ³							H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

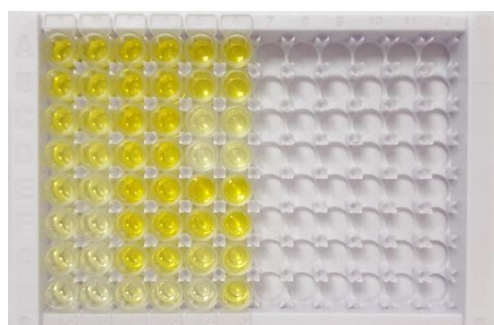


Figura 4. Imaginea plăcii ELISA nr. 2

Tabelul 7.

Valorile densităților optice obținute pentru lizozimul standard și Probe testate P5-P8

	Standard	Standard	Probe	Probe	Probe	Probe	7	8	9	10	11	12	
	1	2	3	4	5	6							
A	1.053	1.053	1.366	1.334	1.440	1.390							A
B	0.976	0.916	1.242	1.352	0.960	0.966							B
C	0.759	0.691	1.561	1.503	0.305	0.382							C
D	0.560	0.551	1.075	1.234	0.202	0.284							D
E	0.471	0.364	1.428	1.405	1.523	1.211							E
F	0.283	0.246	1.217	1.246	1.030	1.119							F
G	0.274	0.226	0.917	0.825	0.474	0.626							G
H	0.199	0.181	0.294	0.289	0.204	0.558							H

Tabel 8.

Rezultatele concentrației în lizozim din probele P1-P8 obținute prin testul ELISA sandwich

Proba		Concentrație lizozim (mg/ 100 mL)
P1	Lizozim extras în soluție apoasă	42,547
P2	Lizozim extras în soluție apoasă și concentrat	1674,906
P3	Proteine bioactive extrase din gălbenuș și albuș din ou hiperimun în soluție apoasă	0,182
P4	Lizozim extras liofilizat reconstituit la concentrația de 1 mg/mL	0,397
P5	Lizozim purificat extras din ouă hiperimune recoltate de la găini hiperimunizate cu antigenul <i>Staphylococcus aureus</i>	386,856
P6	Gel cu 46 % soluție apoasă de lizozim	1,628
P7	Gel cu 40 % soluție apoasă de lizozim	0,141
P8	Cremă cu lizozim	0,072

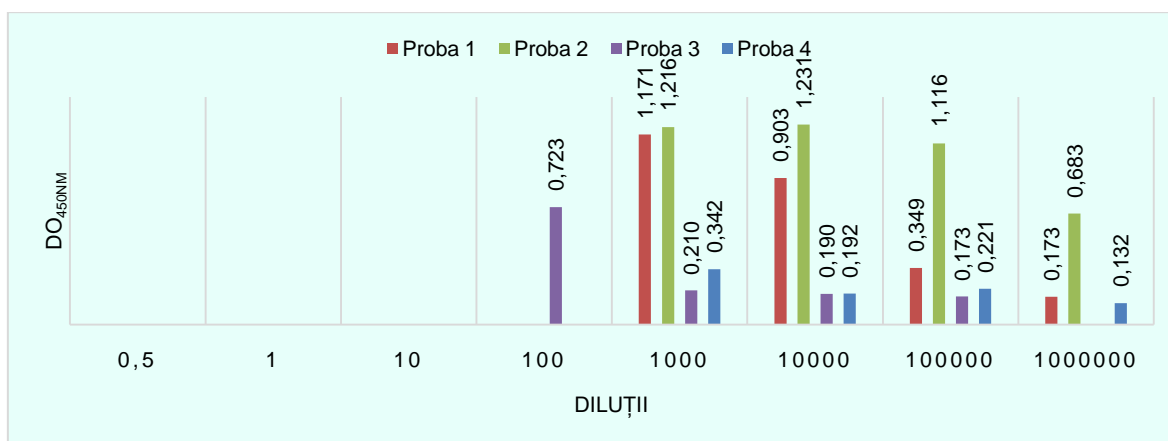


Figura 5. Valorile densităților optice ale probelor P1-P4 obținute prin testul ELISA sandwich

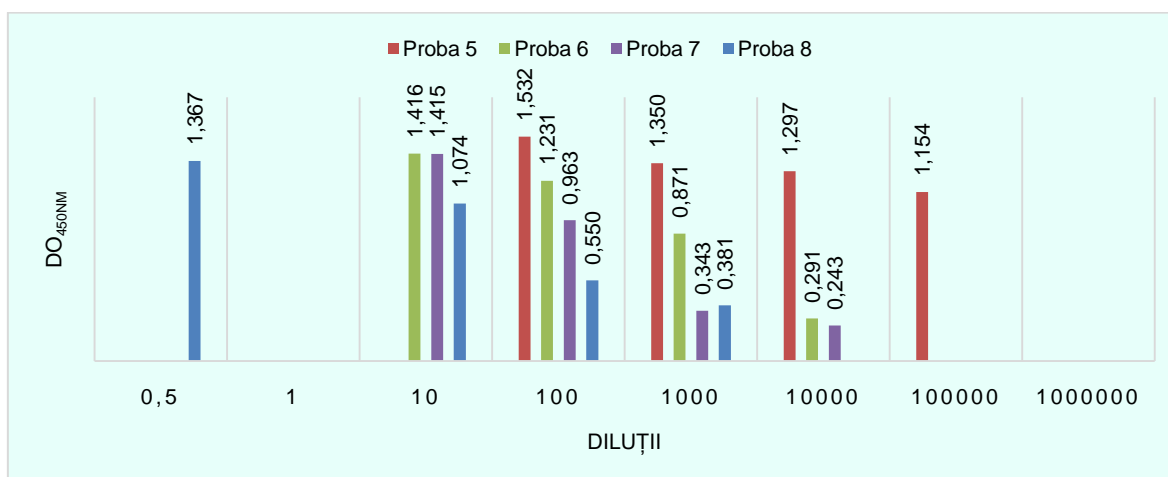


Figura 6. Valorile densităților optice ale probelor P5-P8 obținute prin testul ELISA sandwich

Se remarcă faptul că valoarea medie a DO pentru proba P 5 este de 1,350 mai mare comparativ cu valoarea medie a DO pentru standard ($\bar{x}=1,053$) la aceeași diluție.

În **Tabelul 7** și **Figurile 5** și **6** sunt prezentate concentrațiile de lizozim obținute pentru probele analizate.

Se remarcă o valoare ridicată a lizozimului în proba concentrată (1674,906 mg/100 mL) pentru P2 și o valoare scăzută (0,397 mg/100 mL) în proba P4 liofilizată și ajustată la 1 mg pulbere liofilizată/ mL. În produse, concentrația lizozimului variază în funcție de procentul de lizozim adăugat.

3. Concluzii

- Metoda ELISA sandwich a fost utilizată pentru determinarea concentrației de lizozim extras din albuș de ou hiperimun din diferite probe constând în soluții apoase și produse biologice active.
- Rezultatele au relevat valori ale concentrației de lizozim extras variabile în funcție de probele testate. În produsele biologice, concentrația lizozimului a avut valori mai mici comparativ cu soluțiile apoase din care au fost preparate.
- Metoda s-a dovedit a fi sensibilă și specifică, putând fi utilizată în mod curent în cuantificarea lizozimului prezent în diferite produse.

4. Mulțumiri

Lucrarea a fost realizată prin proiectul POC-G, Cod SMIS: 105631, ID: P_40_197, Grant nr. 52/2016, obținut de către Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș”, București, Componentă de proiect nr. 673/2019 Romvac Company S.A.

Bibliografie

1. **Kerkaert, B., Mestdagh, F., De Meulenaer, B., (2010).** Detection of Hen's Egg White Lysozyme in food: Comparison between a sensitive HPLC and a commercial ELISA method. *Food Chemistry*, **120**, 580-584.
2. **MacKay, B.J., Hannah Goodman, Cox, D., Barbara L. Crossbard, Iacono, V.J., Pollock, J.J., (1984).** Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Determination of Lysozyme in Human Parotid and Submandibular-Sublingual Salivas. *Journal of Clinical Microbiology*, **19** (6), 844-848.
3. **Schneider Nadine, Ingdris Weigel, Werkmeister, K., Monika Pischetsrieder, (2010).** Development and Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Quantification of Lysozyme in Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 76-81.
4. **Thonar, E. J-M. A., Susan B. Feist, Fassbender, K., Lenz, M. E., Matijevitch, B.L., Kuettner, K.E., (1988).** Quantification of hen egg white Lysozyme in cartilage by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Connect. Cell and Tissue Research*, **17**, 181-198.
5. **Vidal Mary-Laure, Gautron, J., Nys, Y., (2005).** Development of an ELISA for Quantifying Lysozyme in Hen Egg White. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2379-2385.

Investiția sănătății!

RomOxibendazol

antihelmitic cu spectru larg

Romvac
TRADIȚIE ȘI INOVAȚIE ÎN SĂNĂȚATEA ANIMALELOR



Cu **efect rapid**

Excelent **antiparazitar intern** pentru suine

Împotriva **trichinei** și a altor **paraziți**, care atacă organele interne și țesuturile

Recomandat pentru deparazitarea porcului, cu 3 - 4 săptămâni **înainte de sacrificare**, dar și de **3 - 4 ori în cursul anului**

Asigură o **carne sănătoasă**, tocmai bună de consumat

Comprimate și pulbere hidrosolubilă

Lizozimul – component bioactiv al oului hiperimun PC2: caracterizare, purificare și activitate antimicrobiană

Lysozyme – bioactive component of the hyperimmune egg PC2: characterization, purification and antimicrobial activity

Viorica Chiurciu¹, Teodora Supeanu¹, Ioana Alina Dimulescu¹, Cristina Urducea¹, Lucica Sima¹,
Victoriaș-Iulian Iordănescu¹, Mariana Oporanu¹

¹Romvac Company S.A., 7 Centurii Road, Voluntari, RO 77190 Ilfov, România

lucica.sima@romvac.ro

Cuvinte cheie: lizozim, purificare, cromatografie pe schimbători de ioni, Amberlite FPC 3500, *Micrococcus lysodeikticus*, determinarea lizei în placă

Key-words: lysozyme, purification, ion exchange chromatography, Amberlite FPC 3500, *Micrococcus lysodeikticus*, lysoplate method

Rezumat

Lizozimul obținut din albuș de ouă hiperimune PC2, provenind de la găini imunizate cu un complex de antigene bacteriene și fungice, a fost purificat prin cromatografie de schimb ionic pe Amberlite FPC 3500. Puriitatea lizozimului a fost analizată prin electroforeză în gel de poliacrilamidă în sistem denaturant (SDS-PAGE). Pe baza modelului de migrare a marker-ului molecular s-a constatat prezența unei singure benzi cu masa moleculară de 14,1 kDa. Prin testul de imunodifuzie în gel de agar (IDGA) s-a evidențiat prezența lizozimului care s-a testat în diluții de la 1/2 la 1/32 comparativ cu lizozimul standard (Sigma) și cu cel obținut din ouă de la găini libere de germeni specifici (SPF) și convenționale (CV). S-a stabilit identitatea imunologică între lizozimul standard și lizozimul PC2 prin testul IDGA. Lizozimul PC2 a evidențiat reacții de aglutinare cu aspect de flocoane față de cultura de *Micrococcus lysodeikticus* și cu aspect granular față de cultura de *Staphylococcus aureus*. Activitatea antimicrobiană a lizozimului a fost intensă asupra bacteriilor Gram pozitive și mai puțin intensă asupra celor Gram negative. Concentrația lizozimului s-a pus în evidență prin testul de determinare a lizei în placă față de cultura de *Micrococcus lysodeikticus*. S-au obținut valori medii ale lizozimului purificat cuprinse între 12,5 mg/ml și 14 mg/ml. S-au determinat unitățile litice (mg/ml) în produse imunologic active care conțin lizozim (geluri, emulsii, soluții, pulberi). Valorile medii ($\bar{x} \pm ds$) sunt cuprinse între $49,0 \pm 0,34$ și $60,5 \pm 0,84$. Acest studiu sugerează că lizozimul PC2 prezintă activitate imunologică având un rol important în mecanismele de apărare nespecifică a organismelor.

Abstract

Lysozyme obtained from PC2 hyperimmune egg whites, originating from hens immunized with a complex of bacterial and fungal antigens, was purified by ion exchange chromatography on Amberlite FPC 3500 resin. The purity of lysozyme was analysed by polyacrylamide gel electrophoresis in denaturing system (SDS-PAGE). Based on the migration pattern of the molecular marker, the presence of a single band with a molecular mass of 14.1 kDa was found. The agar gel immunodiffusion test (AGID) showed the presence of lysozyme which was tested in dilutions from 1/2 to 1/32 as compared to standard lysozyme (Sigma) and that obtained from eggs from chickens free of specific germs (SPF) and conventional (CV). The immunological identity between the standard lysozyme and the PC2 lysozyme was established by the AGID test. The PC2 lysozyme showed agglutination reactions with flaky clumps in the presence of *Micrococcus lysodeikticus* cultures and with granular clumps in the presence of *Staphylococcus aureus* cultures. The antimicrobial activity of lysozyme was intense against Gram-positive bacteria and less intense against Gram-negatives. The concentration of lysozyme was assessed by the lysoplate method against a *Micrococcus lysodeikticus* culture. Mean values ($\bar{x} \pm ds$) of purified lysozyme were obtained, ranging between 12.5 mg/mL and 14,0 mg/mL. Lythic units (mg/mL) were determined in immunologically active products containing lysozyme (gels, emulsions, solutions, powders). The mean values ($\bar{x} \pm ds$) were between 49.0 ± 0.34 and 60.5 ± 0.84 . This study suggests that PC2 lysozyme exhibits an immunologic activity with an important role in the mechanisms of non-specific defence of organisms.

Introducere

Lizozimul este o glicozid-hidrolază cu rol important în mecanismul de apărare antibacterian. Principala sa acțiune este liza polizaharidelor din peretele celular al bacteriilor prin scindarea legăturii glicozidice β -1,4 dintre acidul N-acetilmuramic (NAM) și N-acetilglucozamină (NAG). Din aceste motive se mai numește N-acetilmuramid glicanhidrolază sau muramidază. S-a demonstrat activitatea sa bacteriostatică, bacteriolitică și bactericidă, în special față de bacteriile Gram pozitive, printre ele fiind și un număr mare de patogeni prezenți în hrană [7]. Lizozimul din albușul de ou are proprietăți deosebite fiind considerat un bun conservant pentru alimente [5, 11]. Molecula modificată de lizozim este folosită în multe domenii, de exemplu pentru prevenirea infecțiilor, acționând ca un antibiotic natural sau ca stimulator nespecific al sistemului imun [9]. În industria farmaceutică, s-a extins folosirea lizozimului în diferite formulări (creme, picături oftalmice, geluri etc.) [5]. Albușul de ou de găină reprezintă sursa cea mai importantă de lizozim (3,5%). Lizozimul din albuș este un polipeptid cu 129 aminoacizi având o masă moleculară de 14 kDa [6]. Punctul izoelectric este cuprins între 10-11. Lizozimul a fost prima proteină secvențializată, a cărei structură tridimensională a fost complet analizată. Este o moleculă constând din două domenii legate printr-un α -helix [2].

Lizozimul este prezent în secreții, toate lichidele corpului și țesuturile organismului uman și animal. De asemenea, a fost izolat din plante, bacterii și bacteriofagi fiind o enzimă foarte stabilă [8]. Reprezintă un factor cheie de apărare naturală a oului împotriva agresiunii bacteriene. Acțiunea litică a lizozimului asupra peretelui celular al culturii de *Micrococcus lysodeikticus* reprezintă una dintre metodele utilizate la evaluarea activității enzimatică [7].

Datorită folosirii enzimei în diferite domenii, studiile de purificare ale acesteia au devenit esențiale. Diferite metode precum cristalizarea și precipitarea [4], filtrarea prin membrană [6], cromatografia de afinitate [11], cromatografia pe schimbători de ioni [1] și ultrafiltrarea [5] sunt utilizate în procesele de

purificare a lizozimului. Cercetările efectuate au avut ca scop purificarea, caracterizarea și determinarea concentrației de lizozim din albuș de ouă hiperimune PC2 și din produse imunologic active care conțin această proteină.

1. Materiale și metode

Studiul a fost efectuat în Departamentul de Cercetare-Dezvoltare al Romvac Company S.A.

1.1. Ouăle hiperimune PC2

S-au obținut după metodologia descrisă de Chiurciu și col. (2014) și provin de la găini din rasa Rhode Island Red, clinic sănătoase în vârstă de 20-23 săptămâni, imunizate cu antigene bacteriene și fungice [3,10].

1.2. Ouăle de la găini libere de germeni specifici (SPF) și ouă convenționale (CV)

Au fost obținute din fermele companiei.

1.3. Cultura de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma Aldrich)

S-a obținut pe mediu BHI îmbogățit cu 8% ser fetal. Cultura obținută s-a spălat de trei ori cu tampon fosfat pH=6,2 prin centrifugare la 3400 xg timp de 20 minute. Suspensia s-a citit la spectrofotometru SpectraMax 190 (Molecular Devices LLC) stabilindu-se densitatea optică (DO)=2,4.

1.4. Lizozim din albuș de ou, pulbere liofilizată (Sigma Aldrich)

S-a utilizat ca standard în experimentele efectuate.

1.5. Serul anti-lizozim

S-a preparat în Romvac Company S.A prin imunizarea iepurilor cu lizozim standard. S-au efectuat trei inoculări cu 5 mg/ml lizozim emulsificat în adjuvant Montanide ISA 70 (SEPPIC). Prima inoculare s-a făcut pe cale intradermică cu 2 ml antigen administrat în 3-4 puncte pe laturile corpului.

A doua inoculare s-a efectuat la 21 zile de la prima administrare pe aceeași cale și aceeași doză similară primei inoculări. A treia s-a făcut la 14 zile după a doua administrare.

1.6. Separarea lizozimului din albuș de ouă hiperimune PC2 pe schimbatori de ioni

Lizozimul s-a preparat după metoda lui Abeyrathne și colab. (2014) cu anumite modificări. Purificarea s-a făcut prin cromatografie pe schimbători de cationi utilizând Amberlite FPC 3500 (Acros Organics). Albușul s-a diluat cu un volum egal de apă deionizată 1:1 calculându-se 0,5 g Amberlite (styrene-divinylbenzene total exchange capacity >2,6 mEq/g) la 10 ml albuș; amestecul s-a omogenizat timp de 12 h la 4 °C folosind un agitator magnetic (Stuart US152) cu viteză scăzută. Soluția s-a centrifugat la 3400 x g timp de 20 minute la 4 °C; Amberlite-ul s-a colectat și s-a spălat de câteva ori cu apă deionizată apoi cu tampon glicină – NaOH 0,1M, pH=9,3. Lizozimul s-a eluat cu tampon glicină – NaOH 0,1 M, pH=9,3 conținând NaCl 0,5 M. Eluatul s-a desalifiat prin ultrafiltrare pe casetă de 30 kDa (Millipore) și s-a liofilizat utilizând aparatul Zirbus Sublimator 150 DKS.

1.7. Testul de imunodifuzie în gel de agar (IDGA)

S-a efectuat în plăci Petri de 90 mm diametru, utilizând gel de agar Noble (Difco) 1% preparat în tampon borat pH = 8,6. S-au efectuat 7 godeuri, de 6 mm diametru, unul central și șase periferice. În godeul central s-au repartizat 40 μl ser anti-lizozim, iar în godeurile periferice 40 μl lizozim purificat lucrat integral și în diluții binare de la 1/2 la 1/2048. Ca martor de reacție s-a utilizat lizozim standard (20 mg/ml). Reacțiile s-au citit la 24 ore prin vizualizarea liniilor de precipitare.

1.8. Electroforeza în gel de poliacrilamidă în sistem denaturant (SDS-PAGE)

Electroforeza s-a efectuat după metoda Laemmli la un aparat OmniPAGE Electrobloater (Cleaver Scientific Ltd.). Probele de lizozim s-au diluat la o concentrație finală

de proteină de 2 mg/ml folosind tampon Laemmli cu 2-mercaptoetanol și albastru de bromfenol (Sigma Aldrich).

După incubarea probelor timp de 10 minute la 96 °C s-au adăugat câte 5 μl din fiecare probă în gelul de migrare 10% și de concentrare 4%. S-a utilizat un marker de proteine VI (AppliChem) conținând un amestec de 12 proteine cu mase moleculare de la 10 până la 245 kDa. Electroforeza s-a realizat la 90 mV și 185 mA, timp de 90 minute; colorarea s-a efectuat cu Comassie Brilliant Blue (Sigma Aldrich).

1.9. Reacția de aglutinare rapidă (RAR)

Testul s-a efectuat în plăci de sticlă cu 12 godeuri de 16 mm diametru și 1,5 mm adâncime (Marienfeld). Cultura de *Micrococcus lysodeikticus* s-a utilizat ca martor pozitiv de reacție. Pentru efectuarea testului s-au folosit culturi bacteriene inactivate (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*) lizozim standard ca martor pozitiv și lizozim provenit din albuș de ouă SPF ca martor negativ.

1.10. Metoda difuzimetrică de determinare a lizei în placă

Șase ml suspensie de *Micrococcus lysodeikticus* s-au adus la temperatura de 56 °C și s-au amestecat cu 6 ml agar Noble 2% preparat în tampon fosfat pH=6,2.

Amestecul s-a turnat în plăci Petri de 90 mm diametru și s-a lăsat la temperatura camerei pentru solidificare.

În gel s-au efectuat godeuri de 5 mm diametru la distanța de 1 cm. În godeul central s-a repartizat lizozim standard iar în godeurile laterale probele de lizozim de analizat; citirea reacției s-a făcut la 24 ore. Diametrele zonelor de liză s-au citit în mm cu ajutorul unui șubler digital cu afișaj electronic (Digital Caliper).

Valorile concentrației în lizozim se interpretează pe o curbă etalon și se exprimă în mg/ml.

2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Purificarea lizozimului PC2 din albuș de ouă hiperimune, SPF și CV s-a realizat prin cromatografie pe schimbători de ioni, utilizând Amberlite FPC 3500. Folosind această metodă, lizozimul poate fi obținut în cantități apreciabile și cu grad de puritate ridicat. Probele analizate sunt prezentate în fig. 1.

Prin tehnica SDS-PAGE, pe baza modelului de migrare a marker-ului molecular s-a constatat prezența unei singure benzi ceea ce demonstrează puritatea lizozimului testat. Calculul maselor moleculare a evidențiat că lizozimul obținut din albuș de la găini SPF, PC2 și CV este pur și prezintă aceeași masă moleculară (14,1 kDa). Rezultatele sunt prezentate în fig. 1, tabelul 1 și fig. 2.

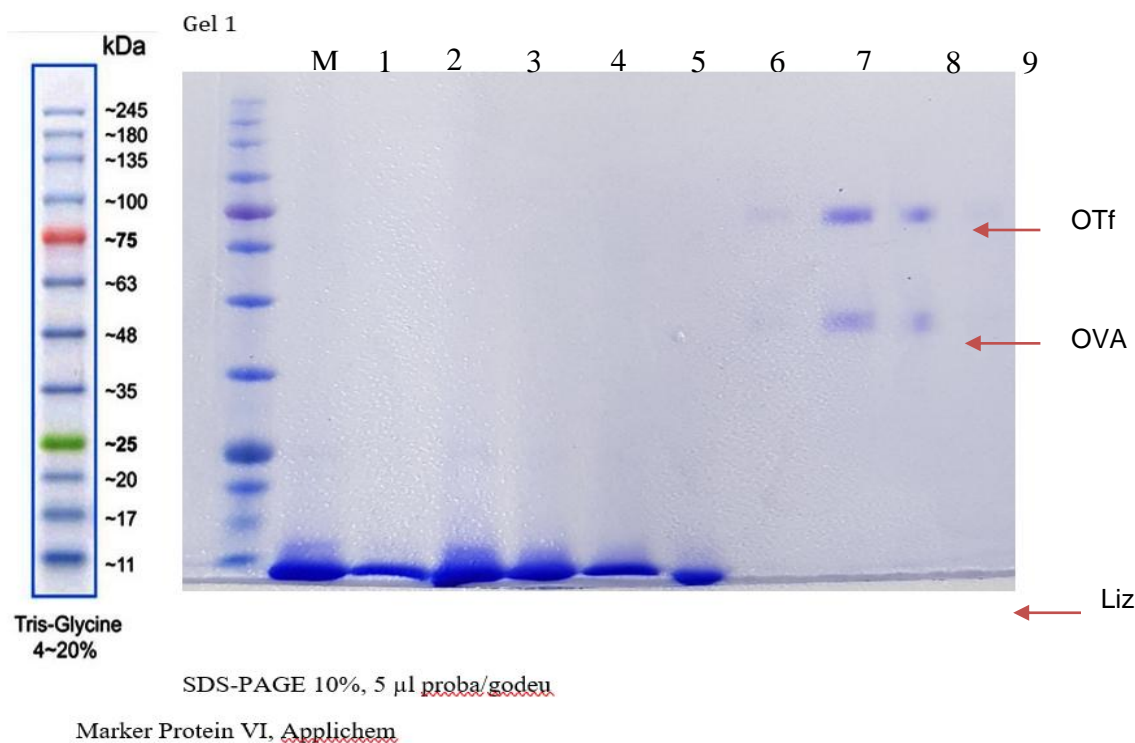


Fig. 1. SDS-PAGE- Testarea purității lizozimului (Liz) obținut prin cromatografie pe schimbători ioni (Amberlite FPC 3500) din albuș de ouă PC2, CV și SPF: M- marker proteine; 1- lizozim standard (20 mg/ml), diluția 1/20; 2- lizozim SPF (10 mg/ml), diluția 1/10; 3- lizozim PC2 seria I (10 mg/ml), diluția 1/10; 4- lizozim PC2 seria II (10 mg/ml), diluția 1/10; 5- lizozim PC2 seria III (10 mg/ml), diluția 1/10; 6- lizozim CV (10 mg/ml), diluția 1/10; 7,8,9- fracțiunile ovotransferină (OTf) și ovoalbumină (OVA) din albuș PC2 după separarea lizozimului.

Tabelul 1. Calculul maselor moleculare (M) ale lizozimului din albuș ouă PC2, CV și SPF

Gel 1	dp	Rf	Log M	Masa moleculară (M)	M (kDa)
1- lizozim standard 20 mg/ml	62	0.9841	4.150967	14157	14.15
2- lizozim SPF 10 mg/ml	62	0.9841	4.150967	14157	14.15
3- lizozim PC2 seria I 10 mg/ml	47	0.7460	4.404502	25381	25.38
	62	0.9841	4.150967	14157	14.15
4- lizozim PC2 seria II 10 mg/ml	62	0.9841	4.150967	14157	14.15
5- lizozim PC2 seria III 10 mg/ml	62	0.9841	4.150967	14157	14.15
6- lizozim CV 10 mg/ml	62	0.9841	4.150967	14157	14.15
7- OTf	20	0.3175	4.860866	72588	72.58
OVA	33	0.5238	4.641136	43766	43.76
8- OTf	20	0.3175	4.860866	72588	72.58
OVA	33	0.5238	4.641136	43766	43.76
9- OTf	20	0.3175	4.860866	72588	72.58
OVA	33	0.5238	4.641136	43766	43.76

După izolarea lizozimului din albuș au rămas fracțiunile majore: ovotransferina (M=72,58 kDa) și ovoalbumina (M=43,76 kDa). Acestea sunt prezente în fig. 1 și tabelul 1 (fracțiunile 7,8 și 9) și pot fi separate secvențial folosind tehnici de precipitare și tratament termic.

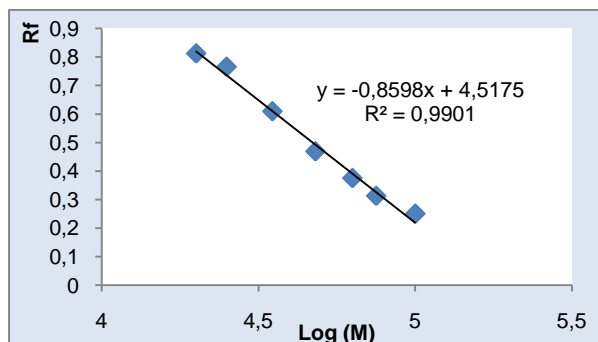


Fig. 2. Calculul maselor moleculare ale seriilor de lizozim SPF, PC2 și CV precum și a fracțiunilor

proteice rămase în albuș după izolarea lizozimului (OTf și OVA)

Prin testul IDGA s-a pus în evidență prezența lizozimului PC2, SPF și CV lucrat în diluții de la 1/2-1/32 comparativ cu lizozimul standard. În fig. 3 sunt prezentate rezultatele care au evidențiat diluțiile optime de lucru pentru lizozim PC2 de 1/4, iar pentru lizozim SPF și CV de 1/2

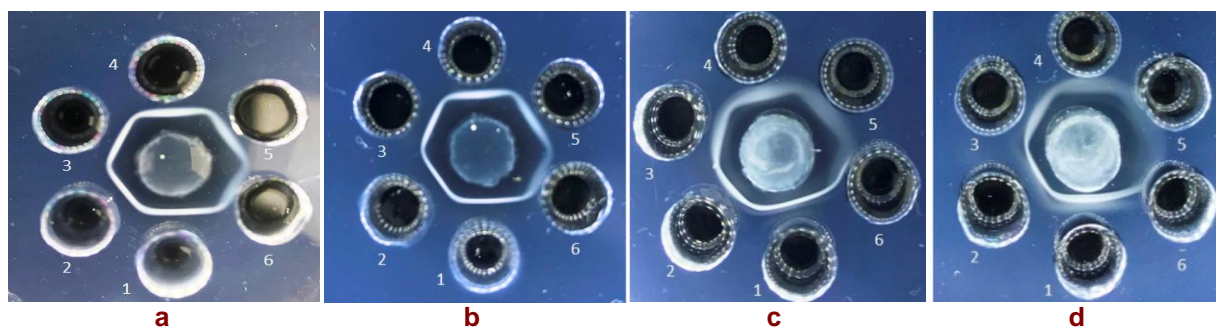


Fig. 3. Testul IDGA: (a)– lizozim standard; (b)– lizozim din albuș de ouă PC2; (c)– lizozim din albuș de ouă SPF, (d)– lizozim din albuș de ouă CV; godeul 1 – lizozim integral; godeurile 2-6 – lizozim în diluții de la 1/2 – 1/32; godeul central – ser anti-lizozim

Lizozimul PC2 s-a testat comparativ cu lizozimul standard prin testul IDGA.

Rezultatele indică identitatea dintre lizozimul standard (godeurile 3 și 5) și lizozimul PC2 (godeurile 2 și 6).

Testul s-a efectuat utilizând ser de iepure anti-lizozim. Linia de precipitare dintre cele două probe prezintă continuitate ceea ce demonstrează identitatea imunologică a acestora (fig. 4).

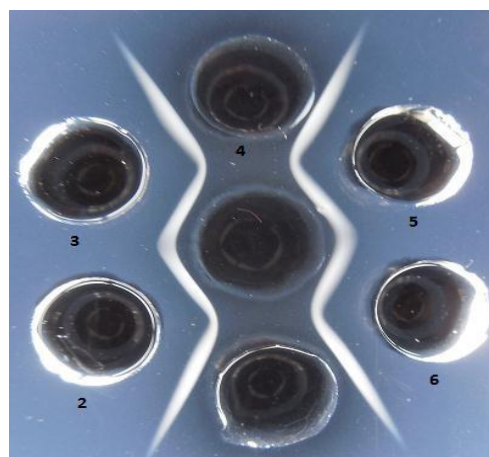


Fig. 4. Testul IDGA: stabilirea identității între lizozimul standard (godeurile 3 și 5) și lizozimul PC2 (godeurile 2 și 6); în godeurile 1,4 și central s-a repartizat ser de iepure anti-lizozim

Fig. 5a evidențiază aglutinarea cu aspect de flocoane dintre lizozimul PC2 și cultura de *Micrococcus lysodeikticus*. Aglutinarea dintre lizozimul PC2 și cultura de *Staphylococcus*

aureus a prezentat aspect granular (fig. 5b). Martorul negativ cu aspect omogen a fost reprezentat de cultura de *Micrococcus lysodeikticus* și soluția de NaCl 0,15M (fig. 5c).

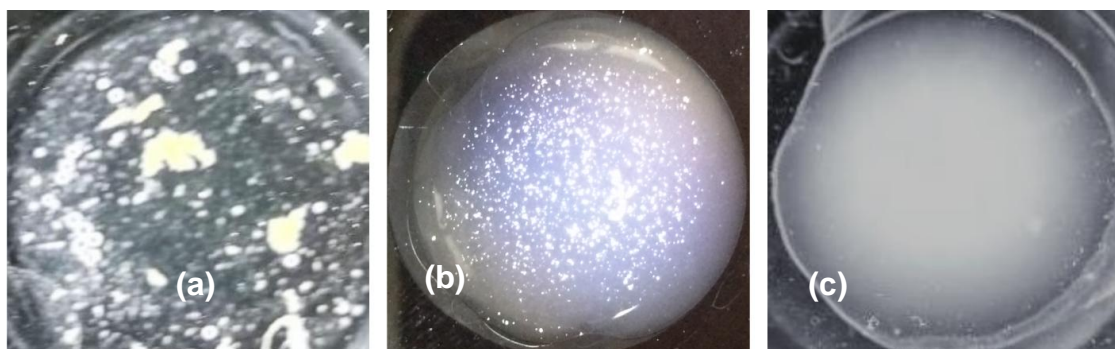


Fig. 5. Reacția de aglutinare rapidă pe lama (RAR): (a)- lizozim PC2 și cultură de *Micrococcus lysodeikticus* (reacție pozitivă, cu aspect de flocoane); (b)- lizozim PC2 și cultură de *Staphylococcus aureus* (reacție pozitivă cu aspect granular); (c)- cultura de *Micrococcus lysodeikticus* și soluție NaCl 0,15M (reacție negativă)

Aspectul culturii de *Micrococcus lysodeikticus* pe mediu agar cu sânge este redat în fig. 6.

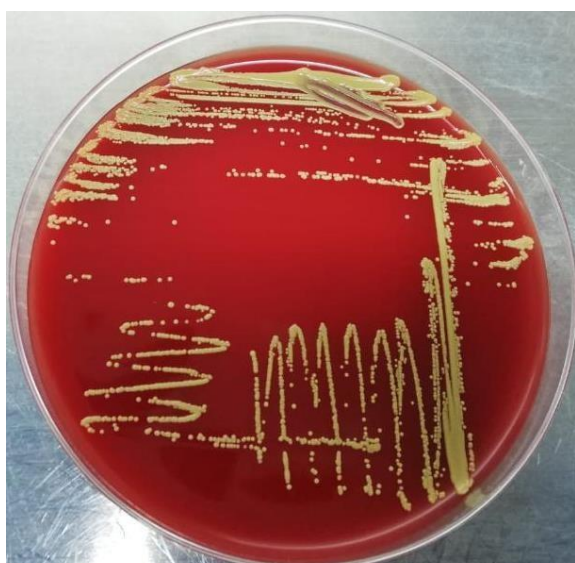


Fig. 6. Cultura de *Micrococcus lysodeikticus* de 24 ore pe mediu agar cu sânge

Activitatea aglutinantă a lizozimului PC2 a fost evidențiată față de bacterii Gram pozitive și Gram negative. Rezultatele prezentate au demonstrat că lizozimul aglutinează bacteriile Gram pozitive iar bacteriile Gram negative sunt parțial aglutinate (tabelul 2).

Concentrația lizozimului purificat s-a făcut prin metoda difuzimetrică a lizei în placă. Acțiunea litică a lizozimului asupra culturii de *Micrococcus lysodeikticus* este redată în fig. 7.

Tabelul 2. RAR- testarea activității antimicrobiene a lizozimului PC2, CV și SPF față de bacterii Gram pozitive și Gram negative

Specii bacteriene	Lizozim PC2	Lizozim CV	Lizozim SPF
Bacterii Gram pozitive			
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	+++	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	±	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	-	-
Bacterii Gram negative			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	±	±	-

Lizozimul PC2 liofilizat s-a testat în concentrațiile de 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml și 2,5 mg/ml obținându-se valori ale lizozimului de respectiv 60,5 mg/ml, 50,5 mg/ml, 37,0 mg/ml, 25,5 mg/ml.

Lizozimul provenind din albuș de ou de la două loturi de găini CV (lot I – n = 30; lot II - n=30) a prezentat concentrații medii de 12,5 mg/ml, respectiv 14,0 mg/ml (tabelul 3).

Valorile medii ale concentrației de lizozim SPF (lot I - n=30) au fost de 4,4 mg/ml și de 4,6 mg/ml pentru lizozim SPF (lot II - n=30). Se remarcă valori ridicate ale concentrației de lizozim PC2.

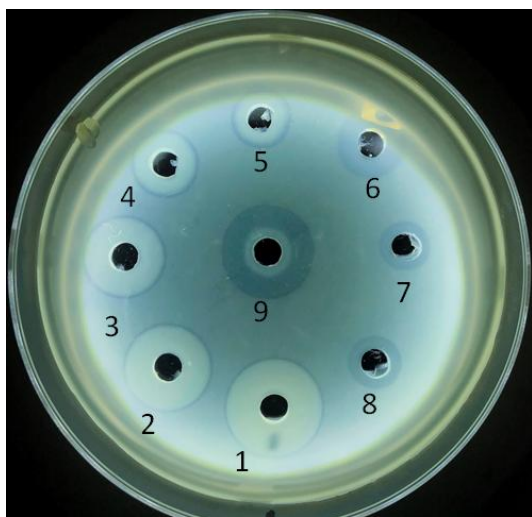


Figura 7. Dozarea lizozimului prin metoda difuzimetrică de determinare a lizei în placă Godeuri: 1- lizozim PC2 (20 mg/ml); 2- lizozim PC2 (10 mg/ml); 3- lizozim PC2 (5 mg/ml); 4- lizozim PC2 (2,5 mg/ml); 5- lizozim CV lot I; 6- lizozim CV lot II; 7- lizozim SPF lot I; 8- lizozim SPF lot II; 9- lizozim standard 20 mg/ml.

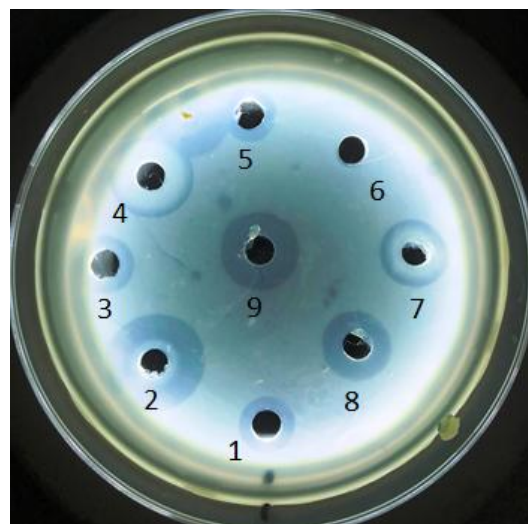


Fig. 8. Dozarea concentrației de lizozim PC2 din produse imunologic active prin metoda de determinare a lizei în placă / Godeuri: 1- Emulsie cu lizozim lot I; 2- Pulbere din albuș; 3- Emulsie cu lizozim lot II; 4- Gel cu lizozim; 5- Lizozim SPF; 6- Soluție NaCl 0,15M; 7- Soluție de proteine din ouă PC2 lot 32; 8- Soluție de proteine din ouă PC2 lot 33; 9- Lizozim PC2

În fig. 8 sunt prezentate valorile medii ($\bar{x} \pm ds$) ale diametrelor zonelor de liză (mm) și unitățile litice mg/ml ($\bar{x} \pm ds$) ale lizozimului PC2 din unele produse imunologic active care au în compoziție numai lizozim (gel, emulsie) și proteine din ouă hiperimune PC2 (soluție, pulbere).

Diametrul zonelor de liză (valori medii) a variat în funcție de cantitatea de lizozim adăugată în formula de preparare a produsului astfel: gel cu lizozim $\bar{x} = 16,6 \pm 0,27$ mm și $55,5 \pm 0,31$ mg/ml unități litice; soluție de proteine din ouă hiperimune PC2 $\bar{x} = 14,5 \pm 0,34$ mm și $50,0 \pm 0,70$ mg/ml unități litice; emulsie cu lizozim $\bar{x} = 13,9 \pm 0,37$ mm și $49,0 \pm 0,34$ mg/ml unități litice; pulbere din albuș $\bar{x} = 17,7 \pm 0,54$ mm și $60,5 \pm 0,84$ mg/ml unități litice.

Tabel 3. Testarea concentrației de lizozim PC2 din produse imunologic active prin metoda de determinare a lizei în placă

Preparate	n loturi	Diametrul zonei de liză (mm) $\bar{x} \pm ds$	Unități litice (mg/ml) $\bar{x} \pm ds$
Gel cu lizozim	5	16,6±0,27	55,5±0,31
Soluție de proteine din ouă hiperimune PC2	33	14,5±0,34	50,0±0,70
Emulsie cu lizozim	4	13,9±0,37	49,0±0,34
Pulbere din albuș	6	17,7±0,54	60,5±0,84

Rezultatele obținute demonstrează ca lizozimul poate fi izolat din albuș de ou, prin cromatografie pe schimbători de ioni utilizând Amberlite FPC 3500. Rezultatele prezentate sunt în acord cu date din literatură privind purificarea și caracterizarea lizozimului din albuș de găină [1, 4, 9].

Lizozimul PC2 purificat are capacitatea de a liza membrana celulară a unor bacterii Gram pozitive datorită stratului de peptidoglican (substrat pentru lizozim). Bacteriile Gram negative sunt mai puțin susceptibile la acțiunea bacteriolitică a acestei enzime deoarece au o structură mai complexă a peretelui celular [8].

Datorită proprietăților antimicrobiene ale lizozimului, acesta poate fi folosit în industria alimentară (pentru conservarea carcaselor, brânzeturilor, vinului), în industria farmaceutică (lizozimul fiind inclus în diverse preparate terapeutice) și în medicină (sub formă de aerosoli, profilactic pentru tratarea cariilor dentare, pentru protecția și repararea unor leziuni distrofice și inflamatorii ale pielii și țesuturilor moi) [5, 7].

3. CONCLUZII

Lizozimul reprezintă un component biologic activ al albușului de ou hiperimun PC2

ce poate fi obținut în cantități apreciabile și purificat prin tehnici cromatografice. Specificitatea lizozimului PC2 constă în faptul că reacționează cu epitopii antigenelor utilizate la imunizarea găinilor. Acesta are un rol important în apărare fiind considerat parte a sistemului imunitar.

Lizozimul scindează componentul peptoglican al peretelui celular bacterian, care pierzându-și integritatea determină moartea celulei. În plus, produsele de hidroliză sunt capabile de a spori secreția de imunoglobuline, de activare a macrofagelor și de eliminare rapidă a bacteriilor patogene.

Aceste date indică faptul că lizozimul poate fi o alternativă viabilă la antibiotice putând fi adăugat în hrana animalelor (Oliver și col., 2015). Datorită proprietăților sale, lizozimul PC2 poate fi utilizat în industria alimentară pentru prelungirea valabilității produselor, cât și în aplicații biomedicale ca preparat cu potențial imunoterapeutic.

Rezultatele acestei cercetări ar putea fi considerate de referință pentru alte studii viitoare.

4. MULȚUMIRI

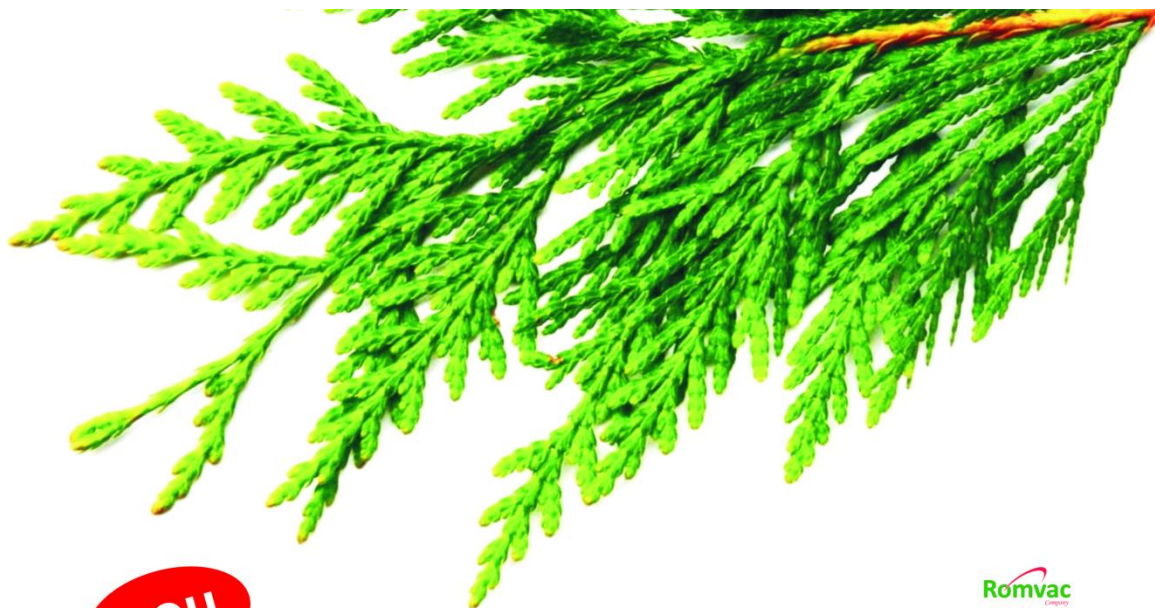
Lucrarea a fost realizată prin proiectul POC-G, Cod SMIS: 105631, ID: P_40_197, Grant nr. 52/2016, obținut de către Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș”, București, Componentă de proiect nr. 673/2019 Romvac Company S.A.

Bibliografie

6. **Abeyrathne, E.D.N.S., Lee, H.Y., Ahn D.U.** (2014). Sequential separation of lysozyme, ovomucin, ovotransferrin and ovoalbumin from egg white, *Poult. Sci.* **93** [4], 1001-1009.
7. **Al Awwaly, K. U., Manab A., Manik Eirry Sawitri, Eny Sri Widaystuti, Yuny Susanti Haniyah** (2016). Hen Egg White Lysozyme Extraction Using SiO₂: Effect of pH and Mineral on Antimicrobial Activity, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **5** [3], 432-436.
8. **Chiurciu Viorica, I.V. Pătrașcu, C. Chiruciu, Georgiana Topilescu.** Specific Chicken Immunoglobulins (IgY) for

Prevention and Treatment and Human Bacterial Infections. European Biotechnology Congress Lecce 2015.

9. **Gemili S., E.S., Umdu, Nilgün Yaprak, Fatma Işık Üstok, F.Y.G., Yener, Çiğdem Mecitoğlu Güçbilmez, Sacide Alsoy Altinkaya, A., Yemenicioğlu** (2007). Partial Purification of Hen Egg White Lysozyme by Ethanol Precipitation Method and Determination of the Thermal Stability of Its Lyophilized Form. *Turk J Agric For*, **31**, 125-134.
 10. **Leśnierowski, G., Renata Cegielska-Radziejewska.** (2012). Potential possibilities of production, modification and practical application of lysozyme, *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **11** [3], 223-230.
 11. **Lu J., Y., Wan, Z., Cui** (2005). Fractionation of Lysozyme and Chicken Egg Albumin Using Ultrafiltration with 30-kDa Commercial Membranes. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **44**, 7610-7616.
 12. **Rainer Huopalahti, Rosina López-Fandiño, Marc Anton, Rüdiger Schade** (2007). Bioactive Egg Compounds. Egg white compounds, Lysozyme, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
 13. **Ramanauskiene Kristina, Asta Marija Inkeniene, A., Savickas, Ruta Masteikova, V., Brusokas** (2009) Analysis of the antimicrobial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion systems. *Acta Pol. Pharm.*, **66** (6), 681-688.
 14. **Shahmohammadi A.** (2018). Lysozyme separation from chicken egg white: a review. *Eur. Food Res. Technol.*, **244** (4), 577-593.
 15. **Supeanu Teodora., Mădălina Tablică, Cristina Urducea., Ioana Alina Dimulescu., Lucica Sima, Viorica Chiurciu., Mariana Oporanu, C. Chiurciu** (2019). *Hiperimmune egg: Preparation, characterization and alternative imunoterapeuthic activity.* *Vet. Drug*, **13** [1], 84-93.
- Susanto, E., Rosyidi, D., Lilik Eka Radiati, Manab, A.** (2014). Improved antibacterial spectrum of hen egg white lysozyme with thermal modified, *RRBS*, **8** [11], 437-442



nou

Romvac
Company

PapilRom

gel contra papilomatozei



Pentru toate speciile de animale;

Conține ulei de ricin, tinctură de rostopască, tinctură de thuja, acid salicilic, natrosol, apă deionizată;

În funcție de tipul viral care produce leziunile

ajută la desicarea și dispariția papiloamelor



Romvac
TRADITIE ȘI INOVAȚIE ÎN MEDICINĂ

șos. Centurii, nr.7, Voluntari,
jud. Ilfov; Tel.: 021 350 31 09
romvac@romvac.ro
www.romvac.ro

Observații privind acupunctura ca metodă complementară pentru managementul terapeutic în afecțiuni ale discului intervertebral la câini

Insights on acupuncture as a complementary method for therapeutic management of intervertebral disc diseases in dogs

Liliana Cărpinișan¹, G. Radbea², Domnica Bejinaru¹, Alina Ghișe¹, A. Stancu¹,
Petronela M. Roșu¹, Denisa Sorescu²

¹Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

²SC Sal-Vet SRL

³Facultatea de Medicină Veterinară București

lcarpinisan@yahoo.com

Cuvinte cheie: *câine, boala discului intervertebral, acupunctură*

Key words: *dog, intervertebral disk disease, acupuncture*

Rezumat

Boala discului intervertebral (BDIV) este un termen larg, ce implică degenerarea structurilor discului intervertebral și hernierea ulterioară a materialului discului în canalul vertebral, dar și boala neurologică clinică datorată herniei de disc. Sindromul de compresiune al măduvei spinării se soldează cu manifestări ce pot varia de la hiperestezie locală până la paralizia trenului posterior sau/și disfuncție genito-urinară. Dependent de tabloul clinic și de localizarea afecțiunii, abordarea terapeutică variază de la tratamentul de tip conservator până la cel chirurgical. De cele mai multe ori medicina clasică nu este suficientă pentru normalizarea pacientului, motiv pentru care se recomandă și metode alternative, printre care și acupunctura (AP). În urma efectuării ședințelor de acupunctură la 6 câini cu hemilaminectomie sau laminectomie consecutiv bolii degenerative a discului intervertebral (Hansen I; Hansen II) efectele observate au fost de la ne semnificative până la recuperarea motricității, dependent de gradul de afectare a măduvei și de implicarea proprietarilor în recuperarea post-operatorie. Rezultatele s-au evidențiat, în general, după câteva ședințe de acupunctură și au fost influențate de caracteristicile fiecărui pacient.

Abstract

Intervertebral disc disease (IVDD) is a broad term, involving the degeneration of intervertebral disc structures and subsequent herniation of disc material in the spinal canal, but also clinical neurological disease due to disc herniation. Spinal cord compression syndrome results in symptoms that can range from local hyperesthesia to rear limbs paralysis and / or genitourinary dysfunction. Depending on the clinical signs and the location of condition, the therapeutic approach varies from conservative to surgical. Classical medicine is often not enough to normalize the patient, which is why alternative methods are recommended, including acupuncture (AP). Following acupuncture in 6 dogs that underwent hemilaminectomy or laminectomy consecutive of thoracolumbar IVDD (Hansen I; Hansen II) the observed effects ranged from insignificant to motor recovery, depending on the degree of spinal cord damage and the involvement of the owners in the post-surgery recovery. The results were generally evident after a few acupuncture sessions and were influenced by the characteristics of each patient.

Introducere

Boala discului intervertebral (BDIV) este un termen larg, ce implică degenerarea structurilor discului intervertebral și hernierea ulterioară a materialului discului în canalul vertebral, dar și boala neurologică clinică datorată herniei de disc (17, 20). BDIV este cea mai frecventă cauză a mielopatiei

compresive la câini, afectând toate rasele și vârstele (9).

Cele mai predispușe rase sunt cele condrodistrofice (2, 9, 21) la care apare cu incidență ridicată între trei și șase ani. 85% din afecțiunile discului intervertebral sunt localizate la nivelul T11-T12 și L2-L3, iar 50% sunt între T12-T13 și T13-L1.

La rasele de talie mare cea mai mare incidență este la nivelul L1-L2 (14, 22).

Extruzia discului intervertebral (Hansen tip I) sau protruzia acestuia (Hansen tip II) duc la comprimarea măduvei spinării (5), cu manifestări ce pot varia de la hiperestezie locală sau modificări de comportament până la durere în zona toraco-lombară, deficit somatosenzorial, paralizia trenului posterior sau/și disfuncție genito-urinară (22).

Diagnosticul BDIV se bazează pe examenul neurologic, asociat sau nu cu examene complementare: mielografia, tomografia computerizată (CT) și examenul de rezonanță magnetică nucleară (MRI) (2, 20).

Dependent de tabloul clinic și de localizarea afecțiunii, abordarea terapeutică variază, bazându-se foarte mult pe cunoștințele clinice ale medicului veterinar. În mod frecvent, tratamentul nechirurgical al BDIV este repaosul în cușcă timp de 4 până la 6 săptămâni (9).

Tratamentul chirurgical poate fi profilactic (fenestrația) sau terapeutic (tehnica șanțului ventral, hemilaminectomia și laminectomia) (7, 25).

Intervenția chirurgicală are 90% succes în formele acute ale afecțiunii, dacă pacienții prezintă sensibilitate profundă.

În majoritatea cazurilor în care intervenția se realizează după săptămâni până la luni de la debutul semnelor clinice, câinii se recuperează parțial, din cauza efectelor compresiei medulare cronice (31).

Colaborarea proprietarilor este esențială pentru reușită, dacă aceștia sunt clar instruiți și informați cu privire la riscurile nerespectării instrucțiunilor

De asemenea, proprietarii trebuie să monitorizeze în permanență pacientul pentru disurie și semne neurologice (9).

De cele mai multe ori medicina clasică nu este suficientă pentru normalizarea pacientului și de aceea se recomandă un ansamblu de metode alternative, printre care și acupunctură (AP) (13).

Acupunctura este o metodă medicală microtraumatică, cu rol în stimularea țesuturilor vii.

Excitarea, cu ajutorul acelor de acupunctură, a unor puncte cutanate cu rezistență electrică scăzută, provoacă

modificări sanogenetice în organism, prin stimularea propriilor mecanisme adaptiv-homeostatice (6, 11).

Studii recente au confirmat faptul că meridianele și acupunctele au proprietăți electrice, termice, acustice, optice, magnetice și mioelectrice diferite față de cele ale zonelor nonacupunctură (15).

AP poate fi utilă în condiții patologice variate (29), dar efectele ei sunt urmărite mai ales în afecțiuni ostearticulare și neuromusculare, pentru managementul durerii (4).

De asemenea, s-a demonstrat că AP este o metodă de succes în tratarea problemelor neurologice ale animalelor de companie, cu o eficacitate clinică semnificativă în tratamentul bolilor neurologice, în special a bolilor neurodegenerative.

Prin introducerea acului fin de acupunctură în anumite puncte, prin răsucire sau direct, se stimulează nervii periferici și se protejează țesuturile neuronale prin creșterea expresiei factorilor neurotrofici (3, 23).

Deși AP este folosită ca tratament complementar de mulți ani (12, 13) efectele benefice ale acesteia încă sunt controversate (12, 19).

Având în vedere ipoteza că AP este eficientă în ceea ce privește îmbunătățirea funcției neurologice și recuperarea funcției motorii la câini cu afecțiuni ale măduvei spinării, prin acest studiu ne-am propus să aducem o contribuție la fundamentarea utilității acupuncturii ca terapie alternativă.

1. Material si Metodă

Studiul a fost realizat la o clinică veterinară din Timișoara, România, pe 6 câini cu probleme locomotorii. Câinii au avut vârste cuprinse între 2 și 13 ani și au aparținut raselor Beagle, Shih-tzu și metis (Tabelul 1).

Examenul clinic /neurologic al pacienților a evidențiat pareză sau paraplegie, cu reflexe slabe sau abolite, câinii având grade diferite de disfuncție neurologică (Tabelul 2), asociate sau nu cu incontinență urinară sau/și fecală.

Tabelul 1

Repartizarea pacienților în funcție de caracteristicile individuale, localizarea afecțiunii și metoda chirurgicală

Nr. crt.	Rasă	Vârstă (ani)	Sex	Greutate (Kg)	Localizare	Tip afecțiune disc intervertebral	Terapie chirurgicală
1	Metis	9,0	Mascul castrat	17,3	T13-L1	Hansen tip II	Hemilaminectomie
2	Beagle	8,0	Mascul necastrat	16,5	L2-L3, L4-L5	Hansen tip I	Hemilaminectomie
3	Metis	6,0	Mascul castrat	10,0	T12-13	Hansen tip II	Hemilaminectomie
4	Shih-tzu	2,3	Mascul necastrat	7,2	T13-L1	Hansen tip I	Laminectomie
5	Metis	5,0	Femelă castrată	5,0	T12-T13	Hansen tip I	Laminectomie
6	Metis	13,0	Femelă castrată	8,8	L7-S1	Hansen tip II	Tratament conservator

Tabelul 2

Clasificarea pacienților în funcție de examenul neurologic

Grad disfuncție*	Manifestare clinică	Pacient
1	Durere	-
2	Parapareză - capabil de deplasare	1,
3	Parapareză - incapabil de deplasare	2, 4
4	Paraplegie	3
5	Paraplegie cu pierderea sensibilității profunde	5, 6

* după Sharp, 2005 (22)

În urma investigațiilor imagistice Rx și RMN sau CT, s-a stabilit diagnosticul și s-a ales conduita terapeutică.

Astfel, pentru 5 pacienți s-a decis abordarea chirurgicală prin hemilaminectomie / laminectomie (13) și pentru unul s-a adoptat tratamentul conservator (Tabelul 1).

Postoperator, s-au administrat analgezice (Metamizol / Buprenorfină) și antibiotic (Amoxicilină / Acid clavulanic), pe o perioadă de 3-7 zile, după care pacienții nu au mai primit nici un tratament medicamentos.

Complementar, s-a recomandat AP, ca terapie de recuperare și paliativă.

Pentru fiecare pacient a fost întocmită fișă de evaluare specifică Medicinii Tradiționale Chineze (MTC) și s-a identificat "țiparul" afecțiunii (*Bian Zheng*).

La examinarea specifică MTC s-a apreciat: starea generală a animalului, limba (culoare, depozit, umiditate), pulsul (profundime, viteză, caracteristici) și urechile (temperatură). De asemenea, s-au consemnat și alte atribute specifice, cum ar fi: personalitatea, preferințe, boli existente, sensibilitatea la punctele "reper" (*Back Shu* și *Front Mu*) etc. (28).

După stabilirea "țiparului" de boală, s-a elaborat strategia de tratament și s-au ales punctele de AP.

Durata ședințelor de AP a fost cuprinsă între 15-30 minute, cu o frecvență de aproximativ una pe săptămână.

Acele utilizate au fost ace de tip chinezesc, cu mâner de argint, cu dimensiuni variabile, în funcție de talia animalului.

Acele au fost sterile și de unică folosință, conform normelor europene 93 /42 /EEC.

Evoluția fiecărui pacient a fost apreciată atât din punct de vedere al medicinei clasice cât și din punct de vedere al MTC, la fiecare ședință de acupunctură.

2.Rezultate și discuții

În funcție de caracteristicile fiecărui pacient în parte, abordarea terapeutică a variat.

Astfel, fiecare pacient a beneficiat de ședințe de acupunctură pe perioade diferite de timp (Tabelul 3), cu puncte de AP selectate personalizat.

Rezultatele observate au fost de la ineficiență până la recuperare motorie.

Tabelul 3

Repartizarea pacienților în funcție de timp și numărul de ședințe de acupunctură efectuate

Pacient	Grad disfuncție	Număr ședințe acupunctură	Interval de timp (zile)
1	2	4	20
2	3	9	42
3	4	5	37
4	3	8	37
5	5	6	37
6	5	5	20

Pacientul 1 a avut în antecedent multiple fracturi (humerus, bazin, vertebra L6) în urma

unui accident rutier, precum și uretrotomie, consecutiv prezenței de calculi ureterali.

În urma unei extruzii discale bruște la nivelul T13-L1 (Hansen tip II) s-a intervenit chirurgical.

Acest pacient s-a prezentat cu deficit neurologic de gradul 1 și cu blocaj urinar.

După doar 2 ședințe de acupunctură s-a reluat micțiunea și mersul, funcțiile îmbunătățindu-se continuu pe parcursul a 20 de zile de terapie.

Pacientul 2 (Figura 1) a prezentat compresiune medulară la nivelul L2-L3, consecutiv căreia s-a intervenit chirurgical prin hemilaminectomie.

Postoperator s-a recuperat foarte bine, deplasându-se independent după 3 zile de la intervenție. La o lună postoperator a devenit paraplegic, consecutiv unei sărituri.

În urma examenului RMN a fost identificată protruzie discală în spațiul L4-L5 (Hansen tip I).

Datorită perioadei foarte scurte de la ultima operație și a riscului de destabilizare a coloanei vertebrale, s-a recomandat AP, o nouă intervenție chirurgicală fiind exclusă. În urma a 9 ședințe de AP (42 zile) pacientul s-a recuperat motor (mers spinal), fiind capabil de o viață normală.



Fig. 1. Acupunctură pe meridianele Vezică și Vasul Guvernator la pacientul 2.

Pacientul 3 a fost operat de extruzie T12-T13 (Figura 2) în anul 2018. Postoperator s-a recuperat foarte bine dar fenomenul a recidivat după un an, efectuându-se o nouă intervenție.

Postoperator a beneficiat de ozonoterapie. În decembrie 2019, pentru a

treia oară a prezentat paraplegie, deficit proprioceptiv și incontinență urinară și fecală.

De această dată nu s-a mai intervenit chirurgical, datorită riscurilor crescute de destabilizare ale coloanei vertebrale, dar s-a recomandat AP.

În urma a 5 ședințe, asociate cu manopere de recuperare neuromusculară (masaj, exerciții de recuperare) nu s-a observat îmbunătățirea stării pacientului.

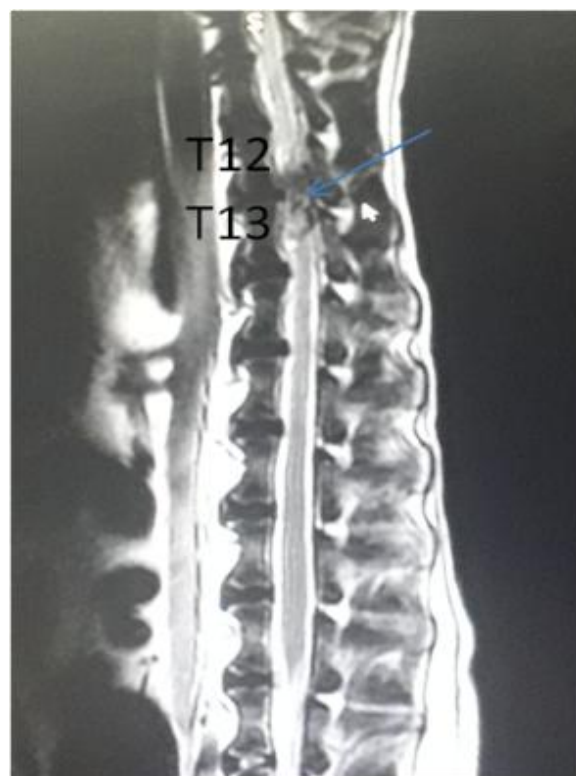


Fig. 2. Imagine RMN cu evidențierea extruziei discale la nivelul T12-T13 (săgeata) la pacientul 3.

Pacientul 4 a suferit laminectomie consecutiv protruziei discului intervertebral T13-L1. Postoperator, amiotrofia asociată cu laxitatea ligamentară cronică au dus la acutizarea disfuncției locomotorii.

Acesta a prezentat incontinență urinară și fecală. Medicul veterinar a diagnosticat displazie rotuliană genetică bilaterală și a recomandat masaj, exerciții de recuperare neuromusculară și AP, care au debutat la două luni postoperator.

Pe parcursul a 6 ședințe de acupunctură (50 zile) și exerciții recuperare la domiciliu, starea pacientului s-a ameliorat progresiv.

Pacientul s-a ridicat singur, a alergat ajutându-se de membrele anterioare, timp în care a utilizat trenul posterior pentru un interval scurt de timp.

Pacientul încă prezenta incontinență urinară și fecală.

La aproape 2 luni de la începerea terapiei complementare starea pacientului s-a deteriorat brusc (paraplegie) în timp ce pacientul era în îngrijirea unei persoane străine, care nu era la curent cu manoperele de manipulare specifice.

Examenul CT a evidențiat protruzie discală tip 1 cu lateralizare în partea dreaptă, în spațiile intervertebrale T11-T12 și T12-T13, dar și mineralizări discale multiple în segmentul toraco-lombar.

După efectuarea CT-ului pacientul a decedat în urma unui stop cardio-respirator.

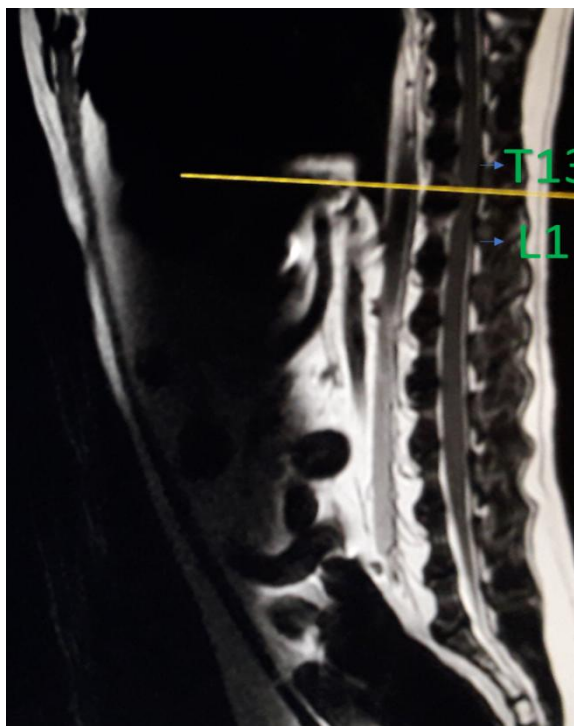


Fig. 3. Imagine RMN cu evidențierea protruziei discale la nivelul T13-L1 (săgeata) la pacientul 4.

Pacientul 5 a fost adus la cabinet pentru laminectomie, în urma unei protruzii pe segmentul T12 - T13.

La 2 luni postoperator pacientul încă prezenta paraplegie cu incontinență urinară și fecală.

S-a recomandat terapie prin AP, masaj și gimnastică de recuperare.

După 4 ședințe, ameliorarea observată a fost apariția sensibilității la introducerea acelor în punctele Liu Feng.

Datorită nesesizării progresului, proprietarul a decis întreruperea terapiei.

Acesta a revenit după 3 săptămâni, deoarece a observat că pacientul adopta poziția șezând și părea dornic să se deplaseze, chiar dacă era încă paraplegic.

După alte 2 ședințe, proprietarul nu a mai dorit continuarea terapiei, deși la poziționarea în poziție patrupodală pacientul își menținea poziția și, susținut, făcea câțiva pași.

Acesta a afirmat că nu aplică procedurile de recuperare recomandate și că preferă căruciorul ajutător.

Pacientul 6 a fost adus la veterinar cu gradul 5 de disfuncție neurologică, cu incontinență urinară și fecală. La examenul imagistic s-a evidențiat protruzie L7-S1 cu prezența de osteofite la nivelul vertebrei T12.

După o săptămână de terapie medicamentoasă, cu ușoare semne de recuperare, simptomele au recidivat brusc. Datorită vârstei pacientului (13 ani), intervenția chirurgicală ar fi fost riscantă, astfel că a fost recomandată AP.

Pe o perioadă de 20 de zile, după 5 ședințe de acupunctură, nu s-a observat nici o modificare față de situația anterioară. La o lună postoperator a fost luată decizia eutanasierii, deoarece starea pacientei s-a degradat în mod evident.

Din punct de vedere MTC, pacienții au fost diagnosticați cu sindrom *Bi/Wei*, cu tipare de tip *Spinal Cord Qi/ Blood stagnation*, *Kidney Qi/Yang Deficiency*, *Kidney Yin* și *Qi/Yang Deficiency* (26, 27).

Punctele de AP utilizate au fost alese în funcție de diagnostic și conform principiilor MTC (28), urmărindu-se remediarea "stagnării" și a "deficitului".

Astfel, cel mai frecvent s-au utilizat: GV 20, GV 3/4, Bai-hui, BL 23, SP 6, KID 3/6/7/10, dar și BL 11/20/21/22, SP 9, ST 40/36, GB 34, Hua-tuo-jia-ji, Liu Feng, LIV 3, LI 4.

Având în vedere că AP este o metodă de terapie care se aplică personalizat, unicitatea pacientului și istoricul acestuia sunt

determinante în alegerea protocolului terapeutic și, bineînțeles, în obținerea rezultatelor.

S-a observat că, pacientul 1, care a avut grad redus de disfuncție neurologică, s-a recuperat mai rapid (20 zile) și după doar două ședințe de acupunctură.

De altfel, literatura de specialitate descrie o rată de îmbunătățire de 90% în cazul discopatiilor de gradul I și II și scăderea rezultatelor acupuncturii proporțional cu severitatea leziunii medulare (13).

Pacienții cu gradul 3 de disfuncție neurologică au manifestat semne de recuperare între 37-42 zile. În formele mai avansate (4 și 5), pacienții nu s-au recuperat.

Un rol important în evoluția pacientului l-a avut prezența afecțiunilor asociate ale aparatului locomotor.

Astfel, pacientul 4, diagnosticat cu laxitate ligamentară și displazie de rotulă, a avut nevoie de mai mult timp pentru recuperarea funcției motorii comparativ cu pacienții 1 și 2.

Raportat la faptul că pacienții 2, 3 și 4 s-au prezentat cu recidivă, evoluția diferită a acestora poate fi pusă doar pe seama caracteristicilor individuale, aceștia având vârste diferite și beneficiind de un număr diferit de ședințe AP.

S-a observat că efectele vizibile ale acupuncturii au apărut, în general, după câteva ședințe, efectul acupuncturii fiind cumulativ, după cum se menționează și în literatura de specialitate (18).

Unele studii în domeniu susțin că AP îmbunătățește calitatea vieții la câinii care suferă de boli neurologice și musculo-scheletale (10, 14).

Activarea unor mecanisme locale și sistemice consecutiv AP este atribuită eliberării de neurotransmițători ca: endorfine, encefaline, dinorfine, serotonină, norepinefrină, dopamină și acetilcolină.

De asemenea, se are în vedere și posibilitatea implicării mecanismelor de semnalizare la nivel celular, a modulării receptorului N-metil-D-aspartat, a reducerii hiperalgeziei și alodiniei la pacienții care suferă de dureri cronice și neuropatice (8, 16, 30).

AP reglează procesele inflamatorii și factorii de creștere prin intensificarea circulației sanguine în zonele afectate (16).

Totodată, AP poate contribui la recuperare în caz de deficiențe funcționale consecutive afectării creierului, prin stimularea sau/și facilitarea proliferării/diferențierii celulelor stem neurale (23).

Nuno, 2017, afirmă că AP, singură sau în combinație cu analgezice sau alte adjuvante analgezice, este un tratament conservator relevant pentru ameliorarea durerii și îmbunătățirea calității vieții la câinii cu boli neurologice și / sau musculo-scheletale (24).

În studiul de față nu au fost urmărite efectele de tip analgezic, deoarece majoritatea pacienților au fost aduși pentru acupunctură în stadiul în care nu mai prezentau dureri mari.

Oricum, aceștia au beneficiat de toate efectele atribuite AP (29).

Un aspect ce trebuie subliniat este rolul proprietarului în recuperarea pacientului, după cum afirmă și alți autori (9).

Astfel, la pacientul 5, deși s-au observat semne de progres, lipsa de implicare și nerăbdarea proprietarilor a limitat evoluția acestuia.

De asemenea, nesupravegherea strictă a pacienților de către proprietari a dus la recidive ale afecțiunii discale (pacientul 2), uneori cu efecte ireversibile (pacientul 4).

În acord cu Griffin, 2009, se poate spune că, în pofida multiplelor studii realizate până în prezent, eficacitatea multor metode comune de terapie rămâne încă necunoscută (9).

3. Concluzii

În urma efectuării sedințelor de acupunctură la 6 câini cu hemilaminectomie sau laminectomie consecutiv bolii degenerative a discului intervertebral (Hansen I; Hansen II) efectele observate au fost de la nesemnificative până la recuperarea motricității, dependent de gradul de afectare a măduvei și de implicarea proprietarilor în recuperarea post-operatorie.

Rezultatele s-au evidențiat, în general, după câteva ședințe de acupunctură și au fost influențate de caracteristicile fiecărui pacient.

Bibliografie

1. **Bibeovski, J.D., Daye, R.M., Henrickson, T.D., Axlund, T.W.** (2013). A prospective evaluation of CT in acutely paraparetic chondrodystrophic dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.*, 49(6):363-369.
2. **Brisson, B.A.** (2010). Intervertebral disc disease in dogs. *Vet. Clin. N. Am., Small Anim. Pract.*, 40(5):829-258.
3. **Burk, R., Feeney, D.** (2012). The spine. În: Small animal radiology and ultrasonography, A diagnostic atlas and text, 3rd ed., Ed. Saunders Elsevier, Missouri.
4. **Cantwell, S.L.** (2010). Traditional Chinese Veterinary Medicine: The Mechanism and Management of Acupuncture for Chronic Pain, *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(1):53-58.
5. **Cherrone, K.L., Dewey, C.W., Coates, J.R., Bergman, R.L.** (2004). A retrospective comparison of cervical intervertebral disk disease in nonchondrodystrophic large dogs versus small dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 40(4):316-320.
6. **Dumitrescu, E., Cristina, R., T.** (2015). Elemente de terapie alternativă și complementară în medicina veterinară, Ed. Waldpress, Timișoara.
7. **Fingeroth, J.M., Thomas, W.B.** (2015). Advances in intervertebral disc disease in dogs and cats. Ed. Blackwell, Londra.
8. **Fry, L.M, Neary, S., Sharrock, J., Rychel, J.K.** (2014). Acupuncture for analgesia in veterinary medicine. *Top Companion Anim Med*, 29:35–42.
9. **Griffin, J.F. 4th, Levine, J., Kerwin, S.** (2009). Canine thoracolumbar intervertebral disk disease: pathophysiology, neurologic examination and emergency medical therapy. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, 31(3):E1-E14.
10. **Hayashi, A.M, Matera, J.M, Pinto, A.C.** (2007). Evaluation of electroacupuncture treatment for thoracolumbar intervertebral disk disease in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 231:913–918.
11. **Hulea, C.I., Cristina, R.T.** (2011). Elemente introductive de acupunctură veterinară, *Medicamentul veterinar*, 5 (2), 40-51.
12. **Janssens, L.A.** (1985) The treatment of canine cervical disc disease by means of acupuncture: A review of 32 cases, *Journal of Small Animal Practice*, 26(4):203-212.
13. **Joaquim, J.G.F.** (2009). Acupuncture for Treatment of Intervertebral Disc Disease, World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings.
14. **Joaquim, J.G.F., Brondani, J.T., Luna, S.P.L., Torelli, S.R., Rahal, C.R., Freitas, F.P.** (2010). Comparison of decompressive surgery, electroacupuncture, and decompressive surgery followed by electroacupuncture for the treatment of dogs with intervertebral disk disease with long-standing severe neuro-logic deficits. *J Am Vet Med Assoc*, 236:1225–1229.
15. **Li, J., Wang, Q., Liang, H., Dong, H., Li, Y., Yu Ng, E.H., Wu, X.** (2012). Biophysical Characteristics of Meridians and Acupoints: A Systematic Review, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012.
16. **Park, S.I., Sunwoo, Y.Y., Jung, Y.J., Chang, W.C., Park, M.S., Chung, Y.A., Maeng, L.S., Han, Y.M., Shin, H.S., Lee, J., Lee, S.H.** (2012). Therapeutic Effects of Acupuncture through Enhancement of Functional Angiogenesis and Granulogenesis in Rat Wound Healing. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012:464586.
17. **Platt, S. R.** (2008). Disorders of the Spinal Cord, In Handbook of Small Animal Practice (Fifth Edition), Ed. Rhea V. Morgan, W.B. Saunders.
18. **Roynard, P., Frank, L., Xie, H., Fowler, M.** (2018). Acupuncture for Small Animal Neurologic Disorders, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 48(1), 201-219.
19. **Scavelli, T.D, Schoen, A.** (1989). Problems and complications associated with the nonsurgical management of intervertebral disc disease. *Probl Vet Med*,1(3):402-414.
20. **Schmied, O., Golini, L., Steffen, F.** (2011). Effectiveness of cervical hemilaminectomy in canine Hansen type I and type II disc disease: a retrospective study. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 47(5):342-350.
21. **Schwab, M.L., Ferrarin, D.A., Ripplinger, A., Herculano, L.F.S., Colvero, A.C.T.,**

- Wrzesinski, M. R., Rauber, J. da S., Moro, S. S., Aiello, G., Mazzanti, A.** (2020). Ventral slot in the clinical recovery of dogs with lateralized compression as a result of cervical intervertebral disc disease - 20 cases (2008-2018). *Ciência Rural*, 50, 8.
- 22. Sharp, N.J., Wheeler, S.J.** (2005). Small animal spinal disorders: diagnosis and surgery. 2nd ed., Elsevier Mosby, Edinburgh.
- 23. Shin, H.K., Lee, S.W., Choi, B.,T.** (2017). Modulation of neurogenesis via neurotrophic factors in acupuncture treatments for neurological diseases, *Biochemical Pharmacol*, 141, 132–142.
- 24. Silva, N.E.O.F., Luna, S.P.L., Joaquim, J.G.F., Coutinho, H.D., Possebon, F.S.** (2017). Effect of acupuncture on pain and quality of life in canine neurological and musculoskeletal diseases. *Can Vet J*, 58:941–951.
- 25. Slatter, D.H.** (2003). Textbook of small animal surgery, Vol. 1, Ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- 26. Xie, H.** (2015). Acupuncture for Osteoarthritis and Pain Management, World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings.
- 27. Xie, H., Preast, V.** (2007). Xie's Veterinary Acupuncture, Blackwell Publishing.
- 28. Xie, H., Preast, V.** (2013). Traditional Chinese Veterinary Medicine Fundamental Principles. 2nd Ed., Chi Institute of Chinese Medicine Publishing, Reddick, Florida.
- 29. Xie, H., Wedemeyer, L.** (2012). The Validity of Acupuncture in Veterinary Medicine, *AJTCVM*, 7:1, 35-43.
- 30. Zhao, Z.Q.** (2008). Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. *Prog Neurobiol*, 85:355–375.
- 31. *****<https://www.vscvets.com/surgery/neurology-conditions/intervertebral-disc-disease-ivdd>



nou

LevoRom

20%

pulbere hidrosolubilă

cu levamisol clorhidrat, 200 mg/g

pentru porumbei și pești de acvariu



INDICAȚII

Produsul este indicat în **tratamentul infestațiilor cu nematode** în diferite stadii adulte și larvare parazitare, cu localizare internă la nivelul **pulmonilor și a tractusului gastrointestinal**.

Se administrează la porumbei voiajori și de ornament, în tratamentul infestațiilor cu ***Ascaridia columbae*, *Capillaria spp.* și *Syngamus trachea***.

Se administrează la peștii de acvariu în tratamentul infestațiilor cu ***Capillaria spp.*, *Camallanus spp.* și *Oxyuris spp.***



șos. Centurii, nr.7, Voluntari,
jud. Ilfov; Tel.: 021 350 31 09
romvac@romvac.ro
www.romvac.ro