
TEZĂ DE DOCTORAT

**Prevalența și caracterizarea
bacteriilor din genul *Clostridium* la
animale destinate abatorizării-
antibiorezistență pe lanț alimentar**
(REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand **Corina Bereș**

Conducător de doctorat **Prof. Univ. Dr. Marian Mihaiu**



I. INTRODUCERE

În ultimele decenii, preocuparea pentru sănătatea publică și siguranța alimentară a devenit din ce în ce mai prominentă în contextul creșterii globalizării și al schimbărilor în practicile agricole și alimentare. În acest cadru, bacteriile *Clostridium difficile* și *Clostridium perfringens*, două organisme anaerobe cu potențial patogenic semnificativ, au atras atenția comunității științifice și a autorităților de sănătate publică din întreaga lume.

Aceste bacterii sunt asociate cu diverse afecțiuni gastrointestinale și au fost identificate în diverse medii și surse biologice, inclusiv în tractul gastrointestinal al oamenilor și animalelor. Cu toate acestea, în ciuda importanței lor în sănătatea umană și animală, înțelegerea profundă a prevalenței, a caracteristicilor moleculare și a impactului asupra sănătății publice și a industriei alimentare rămâne încă incompletă.

În această teză, ne propunem să explorăm și să investigăm prevalența, virulența și caracteristicile de rezistență la antibiotice ale bacteriilor *Clostridium difficile* și *Clostridium perfringens* în populațiile de animale din România, cu accent pe bovine, suine și puii broiler. Prin utilizarea unui cadru metodologic riguros și a unor tehnici avansate de analiză moleculară, ne propunem să aducem lumină asupra dinamicii acestor bacterii în mediul agricol și să contribuim la dezvoltarea unor strategii eficiente de control și prevenție a infecțiilor asociate.

De asemenea, ne propunem să evaluăm potențialul de transmitere zoonotică a acestor bacterii și să identificăm riscurile asociate pentru sănătatea umană și animală. Prin promovarea unei abordări One Health, care recunoaște interconectarea sănătății umane, animale și a mediului, ne propunem să oferim o perspectivă integrată și holistică asupra problemelor legate de *Clostridium difficile* și *perfringens* și să contribuim la dezvoltarea unor strategii de control și prevenție bazate pe dovezi științifice solide.

Această teză reprezintă un prim pas în direcția unei mai bune înțelegeri a dinamicii infecțiilor cu *Clostridium difficile* și *perfringens* în mediul agricol din România și are potențialul de a avea un impact semnificativ asupra sănătății publice și a industriei alimentare. Prin cercetare și colaborare, sperăm să contribuim la promovarea sănătății și siguranței populației și la dezvoltarea unor practici agricole și alimentare durabile și responsabile.

II. STRUCTURA TEZEI

Teza intitulată **“Prevalența și caracterizarea bacteriilor din genul *Clostridium* testate la diferite specii de animale furnizoare de carne”** are în structura acesteia două părți principale, “Stadiul actual al cunoașterii”, respectiv “Contribuția personală”. Prima parte are în componență 24 de pagini (Capitolul 1 și Capitolul 2) și reprezintă 21% din totalul celor două părți. Partea a doua a tezei este compusă din ipoteza de lucru, obiectivele cercetării, 6 capitole (capitolele 3, 4, 5, 6, 7, 8) și bibliografia. Aceasta are în structură 88 de pagini și reprezintă 79% din totalul celor două părți.

III. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prima parte a tezei este structurată în două capitole:

Capitolul 1 cuprinde informații generale despre *C. difficile* (taxonomie, ciclul biologic, factori de virulență, clasificarea tulpinilor și prevalența pe specii), metode de izolare și identificare și

antibiorezistență. Sunt de asemenea prezentate date despre infecția cu *C. difficile* dobândită în comunitate și *C. difficile* pe lanțul alimentar.

Capitolul 2 cuprinde prezintă date generale despre *C. perfringens* (taxonomie, ciclul biologic, factori de virulență, mecanismul patologic al toxinelor), metode de izolare și identificare și aspecte ale implicației toxinetipului F pentru sănătatea umană.

IV. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru: *Clostridium perfringens* și *Clostridium difficile*, două bacterii anaerobe cu potențial patogenic semnificativ, sunt prezente în mediile de creștere ale animalelor de abator din România, inclusiv la bovine, suine și păsări. Bacteriile pot să contamineze de asemenea și carnea și produsele din carne dar și mediul de lucru și mediul casnic al oamenilor. Această observație sugerează posibilitatea transmiterii acestor bacterii de la animale la oameni (potențial zoonotic), ridicând preocupări semnificative legate de sănătatea publică.

Se consideră că aceste bacterii prezintă o rezistență variată la antibiotice, iar acest aspect poate influența tratamentul infecțiilor asociate. Astfel, investigarea prevalenței și caracteristicilor moleculare ale acestor bacterii, precum și determinarea profilului lor de rezistență la antibiotice, poate aduce lumină asupra dinamicii infecțiilor asociate și poate contribui la gestionarea și tratamentul adecvat al acestora.

Obiectivele tezei:

1. Investigarea prevalenței și caracteristicilor bacteriilor *Clostridium difficile* și *Clostridium perfringens* în populațiile de animale din România, vizând principalele specii furnizoare de carne.
2. Caracterizarea moleculară a tulpinilor izolate, determinarea gradului și a genelor de rezistență la antibiotice și a factorilor de virulență, pentru înțelegerea mecanismelor de patogenitate și a profilurilor de rezistență la antibiotice.
3. Evaluarea potențialului de transmitere zoonotică a acestor bacterii și promovarea abordării One Health prin recunoașterea interconectării sănătății umane, animale și a mediului în contextul infecțiilor cu *Clostridium difficile* și *perfringens*.
4. Compararea rezultatelor obținute în cadrul studiilor cu alte studii similare pentru a evalua tendințele și variațiile în prevalența și caracteristicile *Clostridium* în diferite medii și regiuni geografice și evaluarea potențialului de transmitere zoonotică a acestor bacterii și identificarea riscurilor asociate pentru sănătatea umană și animal

Capitolul 3 intitulat „Prevalența, caracterizarea și antibiorezistența bacteriilor din genul *Clostridium difficile* izolată de la bovine și suine (Studiul 1) ” a avut ca și obiective:

1. Investigarea prevalenței bacteriei *Clostridium difficile* din fecalele bovinelor și suinelor aparținând diferitelor categorii de vârstă. Aceasta va oferi o perspectivă asupra răspândirii bacteriei în rândul animalelor de abator și a celor tinere în special.
2. Determinarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor izolate, furnizând informații utile despre posibila rezistență la antibiotice și luând în considerare impactul asupra tratamentului și controlului infecțiilor.
3. Evaluarea prezenței determinantilor rezistenței antimicrobiene și identificarea genelor de rezistență la antibiotice (cum ar fi tetM, tetW, ermB) pentru a obține o înțelegere mai detaliată a

mecanismelor de rezistență în tulpinile de *Clostridium difficile*.

În ceea ce privește **rezultatele** studiului, în total, au fost izolate 24 (12,5%) tulpini de *C. difficile* din cele 192 de eșantioane analizate, cu cea mai mare rată de izolare pozitivă în probele de fecale colectate de la purcei (25%). În ceea ce privește profilurile genelor de virulență, majoritatea izolatelor recuperate în acest studiu s-au dovedit a fi toxigene (10% dintre izolatele de la purcei purtau genele *tcdA*, *tcdB* și *cdtA/B*, în timp ce 85% erau pozitive doar pentru *tcdA* și *tcdB*). Printre izolatele detectate în probele de fecale colectate de la vițeii de carne, unul dintre ele purta genele *tcdA* și *tcdB*. Prin urmare, profilul predominant în acest studiu a fost *C. difficile tcdA+tcdB+*.

Toate izolatele de *C. difficile* recuperate în acest studiu s-au dovedit a fi susceptibile la vancomicină, cu excepția unui izolat din fecalele bovinelor care a manifestat rezistență la metronidazol. O proporție semnificativă dintre izolatele de la porci (50%) au arătat rezistență la levofloxacină, un tip de fluorochinolonă de generația a treia. Este interesant să observăm că 60% dintre izolatele recuperate din probele de fecale ale purceilor au prezentat, de asemenea, rezistență la tetraciclină, iar 35% dintre acestea au avut și gena *tetW*. Au fost identificate patru izolate provenite de la porci care au prezentat rezistență la eritromicină, iar dintre acestea, două au inclus și gena *erm (B)*. Din cele 24 de tulpini de *C. difficile* izolate de la purcei, vițeii și bovine adulte, 4 (20%) dintre acestea (care provin din cele 20 de izolate de la purcei), s-au dovedit a fi rezistente la 3 dintre antibioticele luate înspre analiză (tetraciclină, eritromicină și levofloxacină). Patru dintre tulpinile provenite de la purcei au prezentat rezistență la două dintre antibiotice (tetraciclină și levofloxacină), o tulpină izolată de la bovine a prezentat rezistență la levofloxacină și metronidazol, iar o tulpină izolată de la viței a prezentat rezistență la tetraciclină și levofloxacină. Dintre tulpinile izolate de la purcei, șase au prezentat rezistență la un singur antibiotic (majoritatea la tetraciclină și două dintre ele la levofloxacină), iar șase tulpini din cele 20 izolate de la purcei și două din cele 3 izolate de la viței au fost sensibile la antibioticele folosite în studiu. Aproape toate izolatele identificate în probele fecale prelevate de la purcei (cu excepția unui singur caz), precum și un izolat de la un vițel de carne, care au prezentat rezistență la antimicrobienele testate în studiu, au fost de asemenea toxigene.

Capitolul 4 denumit „**Prevalența, caracterizarea și antibioretistența bacteriilor din genul *Clostridium perfringens* izolată de la bovine și suine (Studiul 2)**”, a avut ca și **obiective**:

1. Investigarea prevalenței bacteriei *Clostridium perfringens* în fecalele bovinelor și suinelor din diferite categorii de vârstă.
2. Determinarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor izolate de la aceste animale.
3. Evaluarea prezenței determinantilor de rezistență la antimicrobiene în izolatele de *Clostridium perfringens*.

Rezultatele au arătat că au fost obținute 14 (14%) izolate de *Clostridium perfringens* din cele 100 de mostre analizate, majoritatea fiind identificate în probele de fecale recolectate de la porci (12 izolări). Toate izolatele de *Clostridium perfringens* recuperate în cadrul studiului nostru au demonstrat a fi susceptibile la vancomicină, rifampicină și lincomicină. O parte semnificativă dintre izolate au prezentat rezistență la tetraciclină (71,4%), penicilină (64,2%), eritromicină (42,8%) și enrofloxacină (35,7%). În contextul României, există în prezent foarte puține date disponibile cu privire la prevalența *Clostridium perfringens* izolate din surse animale.

Capitolul 5 cu titlul „**Prevalența și caracterizarea bacteriilor din genul *Clostridium* izolate de la puii Broiler (Studiul 3)**” a avut ca și **obiective**:

1. Determinarea prevalenței *C. difficile* în probele de fecale și din conținutul cecumului la puii broiler.
2. Investigarea profilurilor genelor de toxine (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA* și *cdtB*) ale tulpinilor de *C. difficile* izolate.
3. Compararea rezultatelor obținute cu alte studii similare, pentru a evalua variabilitatea și tendințele în prevalența și distribuția *C. difficile* la puii broiler.
4. Analiza potențialelor consecințe asupra

sănătății publice și a riscului de transmitere zoonotică în cazul detectării *C. difficile* la puii broiler.

Prin îndeplinirea acestor obiective, studiul și-a propus să aducă o contribuție importantă la înțelegerea ecologiei și impactului bacteriei *C. difficile* în mediul aviar, precum și la identificarea posibilelor căi de prevenire și control al infecțiilor cu această bacterie în sectorul avicol.

Rezultatele studiului au fost următoarele: s-a observat o rată de prevalență de 15%, procentul de izolare a *C. difficile* din probele de fecale fiind de 25% și de 5% din probele cecale. Profilul genelor de toxine a arătat că toate cele șase izolate au fost pozitive pentru genele de toxine tcdA și tcdB, care sunt asociate cu producția de toxine A și B. Cu toate acestea, niciunul dintre izolate nu a fost pozitiv pentru genele de toxine binare cdtA/B.

Capitolul 6 se numește „**Cercetări efectuate asupra germenilor din specia *Clostridium perfringens* la puii broiler (Studiul 4)**”, având ca și obiectiv:

1. Investigarea prevalenței bacteriei *Clostridium perfringens* în probele de fecale și conținut intestinal prelevate de la puii broiler.

2. Izolarea și identificarea tulpinilor de *Clostridium perfringens* utilizând mediile de cultură adecvate și tehnici de laborator standardizate.

3. Caracterizarea moleculară a izolatelor de *C. perfringens*, inclusiv identificarea toxinotipului și a profilului de rezistență la antibiotice.

4. Compararea rezultatelor obținute cu alte studii similare pentru a evalua variațiile în prevalența și caracteristicile *C. perfringens* în industria avicolă.

5. Analiza impactului potențial al contaminării cu *C. perfringens* în industria avicolă asupra sănătății publice și a riscului de toxiinfecții alimentare la om.

6. Sugerarea unor strategii de management și control pentru prevenirea și reducerea contaminării cu *C. perfringens* în fermele de pui broiler și în procesul de abatorizare, inclusiv promovarea practicilor de igienă și monitorizarea rezistenței la antibiotice în tulpinile izolate.

Prin atingerea acestor obiective, studiul își propune să aducă o contribuție semnificativă la înțelegerea epidemiologiei și impactului bacteriei *Clostridium perfringens* în industria avicolă din România și la dezvoltarea unor strategii eficiente de prevenire și control a contaminării și a bolilor asociate.

Rezultatele cercetării au fost următoarele: În urma utilizării tehnicii de izolare a *C. perfringens* din probele de fecale și din cele de conținut intestinal de la puii broiler, am obținut un rezultat negativ. De-a lungul timpului, diferite cercetări și-au propus obiective asemănătoare cu cele ale noastre, iar ratele de izolare a *C. perfringens* au fost destul de diversificate, nu doar de la nivelul fecalelor și a conținutului intestinal, cât și din carne și produse din carne.

Capitolul 7 include **concluziile generale și recomandările**. Concluziile generale sunt următoarele:

1. Studiile au relevat o prevalență semnificativă a bacteriei *Clostridium difficile* în probele de fecale recolectate de la bovine, porci și pui broiler, cu o incidență mai mare la purcei și pui broiler. *Clostridium perfringens* a fost de asemenea identificat în majoritatea probelor de fecale de la porci. Aceste constatări subliniază importanța monitorizării atente a acestor bacterii în populațiile de animale destinate consumului uman, având în vedere potențialul lor impact asupra sănătății publice.

2. O proporție semnificativă dintre izolatele de *C. difficile* și *C. perfringens* s-au dovedit a fi toxigene, purtând gene asociate cu producerea de toxine (tcdA, tcdB pentru *C. difficile* și cpa pentru *C. perfringens*). Acest lucru evidențiază riscul de infecții mediate de toxine și necesitatea unor măsuri de supraveghere și control riguroase pentru a preveni răspândirea acestor tulpini virulente

3. Testele de sensibilitate la antibiotice au indicat grade variate de rezistență la antibiotice, cu o rezistență semnificativă la tetraciclină și levofloxacină în cazul izolatelor de *C. difficile* și *C. perfringens* provenite de la purcei și porci. Identificarea genelor de rezistență, cum ar fi tetW și ermB, furnizează informații valoroase despre baza genetică a rezistenței și subliniază importanța utilizării prudente a

antibioticelor în medicina veterinară și umană pentru a minimiza riscul de selecție a tulpinilor multirezistente.

4. Studiile contribuie cu date valoroase la perspectiva One Health, evidențiind interconectarea sănătății umane, animale și a mediului. Răspândirea bacteriilor *Clostridium* între animale și oameni sugerează necesitatea unei abordări integrate pentru monitorizarea și gestionarea infecțiilor, luând în considerare potențiala transmitere zoonotică.

5. Rezultatele subliniază importanța implementării măsurilor de control și prevenire în industria alimentară pentru a reduce riscul de răspândire a acestor bacterii și de apariție a toxiinfecțiilor alimentare.

Recomandările:

Implementarea măsurilor de supraveghere și control: Este important să se dezvolte și să se implementeze programe eficiente de supraveghere a *Clostridium difficile* și *perfringens* în populațiile de animale de fermă, în special la cele furnizoare de carne. Aceste programe ar trebui să includă monitorizarea regulată a prevalenței, virulenței și profilurilor de rezistență la antibiotice.

Promovarea practicilor responsabile de utilizare a antibioticelor: Pentru a reduce riscul de selecție a tulpinilor rezistente la antibiotice, este esențială promovarea și implementarea practicilor responsabile de utilizare a antibioticelor în medicina veterinară și în industria alimentară. Acest lucru ar putea include ghiduri pentru prescrierea judicioasă a antibioticelor și monitorizarea rezistenței la nivel local și regional.

Educația și conștientizarea: Este important să se ofere educație și conștientizare atât profesioniștilor din domeniul sănătății animalelor, cât și fermierilor și lucrătorilor din industria alimentară cu privire la riscurile asociate cu infecțiile cu *Clostridium difficile* și *perfringens*. Informațiile ar trebui să includă măsuri de prevenție, cum ar fi igiena adecvată și manipularea corectă a alimentelor.

Investiții în cercetare suplimentară: Este necesară continuarea și extinderea cercetării în domeniul ecologiei, epidemiologiei și impactului asupra sănătății publice a acestor bacterii. Investițiile în cercetarea suplimentară ar putea contribui la dezvoltarea unor strategii mai eficiente de control și prevenție a infecțiilor cu *Clostridium difficile* și *perfringens*.

Promovarea abordării One Health: Colaborarea între diferitele sectoare, inclusiv sănătatea umană, sănătatea animalelor și protecția mediului, este crucială pentru abordarea complexă a problemelor legate de *Clostridium difficile* și *perfringens*. Promovarea abordării One Health ar putea facilita schimbul de informații și expertiză între diferitele domenii și ar putea duce la soluții mai eficiente și integrate.

Acest studiu reprezintă prima analiză a prevalenței *C. difficile* la animalele destinate abatorizării și consumului din țara noastră, furnizând astfel o bază pentru viitoarea supraveghere a rezistenței antimicrobiene a *C. difficile* la animalele din sectorul alimentar, la produsele alimentare și în mediul înconjurător din România. Pentru a evalua posibila lor contribuție ca sursă de tulpini rezistente de *C. difficile* și ca rezervor de determinanți de rezistență antimicrobiană, este necesar să se efectueze un studiu ulterior, mai complex, care să includă și izolatele umane de *C. difficile*.

Lacune în cercetare și direcții viitoare: Deși studiile oferă informații esențiale despre prevalența și caracteristicile bacteriilor *Clostridium* în probele animale, sunt necesare cercetări suplimentare pentru a elucida rutele specifice de transmitere și rezervoarele acestor tulpini. Explorarea prevalenței și profilurilor de rezistență în lanțul de aprovizionare alimentară ar contribui la o înțelegere mai cuprinzătoare a impactului asupra sănătății publice. Este esențială continuarea cercetărilor pentru dezvoltarea unor strategii eficiente de control și prevenire a contaminării și a bolilor asociate în industria avicolă și cea a cărnii de porc.

Implicații practice: Pentru medicii veterinari și specialiștii în sănătate publică: Aceste descoperiri oferă o perspectivă utilă în gestionarea infecțiilor cu *Clostridium spp.* și subliniază necesitatea eforturilor continue pentru prevenirea și controlul răspândirii acestor bacterii în lanțul alimentar. **Pentru industria alimentară:** Implementarea măsurilor stricte de control și igienă în toate etapele lanțului de

producție și procesare a cărnii este crucială pentru a minimiza riscul de contaminare și de apariție a infecțiilor zoonotice.

Capitolul 8 promovează originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei.

Cercetarea este originală în integralitatea ei și se bazează pe un cadru metodologic și pe experimente specifice proprii, iar principalele contribuții inovatoare sunt următoarele:

1. Explorarea prevalenței și virulenței *Clostridium difficile* și *perfringens*: Una dintre principalele contribuții ale tezei constă în investigarea prevalenței, virulenței și caracteristicilor de rezistență la antibiotice ale bacteriilor *Clostridium difficile* și *perfringens* în rândul bovinelor, porcilor și a puilor broiler. Această cercetare aduce date valoroase despre distribuția acestor bacterii în populațiile de animale, precum și despre riscurile asociate pentru sănătatea umană și animală.

2. Caracterizarea genomică a tulpinilor de *Clostridium difficile*: Teza contribuie la caracterizarea genomică a tulpinilor de *Clostridium difficile* izolate din probele de fecale și conținut cecal al animalelor de fermă. Această analiză genomică oferă o înțelegere mai profundă a diversității genetice a bacteriei și a potențialelor mecanisme de virulență și rezistență la antibiotice.

3. Evaluarea riscului de transmitere zoonotică: Prin investigarea prezenței și caracteristicilor bacteriilor *Clostridium difficile* și *perfringens* în fecalele animalelor, teza abordează și riscul de transmitere zoonotică a acestor bacterii. Această evaluare a riscului este crucială pentru înțelegerea interconectării sănătății umane, animale și a mediului în contextul infecțiilor cu bacterii patogene.

4. Identificarea genelor de rezistență la antibiotice: Prin identificarea genelor de rezistență la antibiotice în tulpinile de *Clostridium difficile* și *perfringens*, teza aduce contribuții importante la înțelegerea mecanismelor moleculare implicate în rezistența la antibiotice în aceste bacterii. Aceste informații pot fi utile pentru dezvoltarea unor strategii mai eficiente de control și prevenție a infecțiilor asociate.

5. Promovarea abordării One Health: Prin evidențierea interconectării sănătății umane, animale și a mediului în contextul infecțiilor cu *Clostridium difficile* și *perfringens*, teza promovează abordarea One Health. Această abordare integrată este esențială pentru gestionarea eficientă a problemelor de sănătate publică și a riscurilor asociate cu aceste bacterii.

6. Recunoaștere internațională: La nivel internațional, teza contribuie la îmbunătățirea cunoștințelor în domeniu, datorită publicării rezultatelor cercetărilor în reviste de prestigiu cu factor mare de impact, consolidând astfel importanța și relevanța studiilor în domeniul sănătății animale și publice.