

REZUMAT

CERCETĂRI PRIVIND INFRAPOPULAȚIA DE CIATHOSTOMINE LA CABALINELE DIN BANAT

Prezenta teză conține cuprinsul-redactat în limba română și engleză, lista cu abrevierile și simbolurile folosite în teză, rezumatul tezei, de asemenea în limba română și engleză, cele două părți ale tezei, bibliografia-prezentată la sfârșitul celei de a doua părți, urmată de lista lucrărilor științifice publicate de către doctorand.

Lucrarea este structurată în două părți: prima intitulată - **Introducerea** și a doua - **Conținutul**.

A doua parte este structurată în patru părți principale:

- I. Stadiul actual al cunoașterii.**
- II. Cercetări proprii.**
- III. Concluzii generale și recomandări.**
- IV. Elemente de originalitate.**

Stadiul actual al cunoașterii este extins pe 34 pagini.

Cercetările proprii sunt extinse pe 71 pagini.

Numărul tabelor este 49.

Numărul figurilor este 73.

Bibliografia cuprinde 197 de titluri (articole, cărți, teze de doctorat, referate și website-uri).

În **Introducere** sunt prezentate motivația alegerii temei de cercetare, importanța și actualitatea temei alese, o scurtă prezentare a conținutului și obiectivele științifice propuse cercetării.

I. Stadiul actual al cunoașterii este structurat în două capitole:

- 1. Etiologie și epidemiologie în ciathostominoză.**
- 2. Diagnosticul și controlul parazitologic în ciathostominoză.**

În **primul capitol** sunt actualizate informațiile cu privire la generalitățile și morfologia acestei parazitoze. De asemenea este prezentată cea mai recentă încadrare/clasificare taxonomică a ciathostominelor, fiind urmată de prezentarea genurilor (elemente de morfologie specifică a paraziților adulți, localizarea acestora în intestinul gros, gazde și distribuție geografică) din subfamilia *Cyathostominae* identificate în Europa. Informații noi au fost aduse și pentru identificarea larvelor de ciathostomine, a ciclului biologic. Datele epidemiologice, reprezentate de prevalența, sursele și căile de infestație, potențialul biotic, factorii favorizanți, dar și fenomenul de chimiorezistență, sunt prezentate în continuarea etiologiei. În cadrul chimiorezistenței sunt prezentate metode de actualitate *in vivo*, dar și *in vitro*, de detectare a rezistenței față de antiparazitare.

În **al doilea capitol** sunt prezentate date privind diagnosticul în ciathostominoză (diagnosticul epizootologic, clinic, de laborator) și date privind controlul parazitologic (tratamentul, profilaxia).

II. Cercetările proprii sunt structurate în patru capitole:

- 3. Etiologia ciathostominelor din Vestul României.**
- 4. Eficacitatea substanțelor antiparazitare (fenbendazol 10% și ivermectină 2%) asupra populației de ciathostomine la cabalinele din județele Timiș și Arad.**
- 5. Cercetări experimentale privind chimiorezistența fenbendazolului și a ivermectinei, determinată pe baza perioadei de reapariție a ouălor de ciathostomine și strongilide la cabalinele din județele Timiș și Arad**
- 6. Identificarea chimiorezistenței față de benzimidazolic prin teste moleculare.**

Fiecare capitol este structurat în patru subcapitole:

- o Scop și obiective;
- o Materiale și metode;
- o Rezultate și discuții;
- o Concluzii.

În **capitolul 3**, a fost studiată etiologia și epidemiologia ciathostominelor din Banat. Este foarte important să identificăm existența acestei parazitoze a cabalinelor, ținând cont de importanța pe care a dobândit-o în ultimii ani. Acest lucru este datorat faptului că acești paraziți au dezvoltat chimiorezistență foarte ușor față de alți paraziți la antiparazitarele uzuale, în special cele din clasa benzimidazolicelor. Pentru a putea să prevenim această parazitoză este important să o diagnosticăm corect. Diagnosticul care confirmă boala îl reprezintă cel de laborator, prin identificarea paraziților adulți sau formele larvare ale acestora prin metode coprologice, metode ce au fost prezentate succint în primul capitol din „Stadiul actual al cunoașterii”.

Identificarea paraziților adulți nu este facilă, datorită numărului mare de specii (50 de specii) și al micilor diferențe morfologice dintre aceștia. Metoda aleasă în prezentul capitol este cea a deparazitării inițiale a cabalinelor și colectarea probelor de fecale, iar apoi identificarea ciathostominelor adulte din fecalele eliminate de cabaline.

Scopul acestui studiu a fost acela de a identifica speciile de ciathostomine, pentru a putea stabili diagnosticul de ciathostominoză și de a realiza un control parazitologic adecvat. Identificarea speciilor este foarte dificilă datorită similitudinii dintre ouăle de strongili migratori (subfamilia *Strongylinae*) și ouăle de ciathostomine.

Obiectivele prezentului studiu au fost următoarele: identificarea speciilor de ciathostomine și prevalența speciilor de ciathostomine la cabalinele din diferite sisteme de creștere (herghelii, gospodării private) din Vestul României.

Identificarea speciilor de ciathostomine adulte pe baza caracterelor morfologice, a fost realizată prin efectuarea deparazitărilor cabalinelor și colectarea fecalelor timp de 48 ore după deparazitare și apoi identificarea paraziților adulți din fecale, lucru uneori dificil datorat unei comunicări greoaie cu proprietarul/îngrijitorul cabalinelor, care nu este interesat să păstreze fecalele eliminate și, de asemenea, nu poate să înțeleagă patogenitatea acestor paraziți de dimensiuni mici.

O altă metodă de identificare a ciathostominelor este prin realizarea de culturi larvare, cu scopul obținerii larvelor de stadiu trei, infestante, care pot fi ușor identificate dacă aparțin strongililor din subfamilia *Strongylinae* sau din subfamilia *Cyathostominae*, pe baza numărului de celule intestinale, formei acestora și dimensiunilor larvei.

Au fost descrise zonele de recoltare a probelor din punct de vedere geo-climatic și anume județele Caraș-Severin, Timiș și Arad.

Studiul privind identificarea **ciathostominelor adulte** s-a desfășurat în perioada octombrie 2013-aprilie 2014 pe 47 caii din diferite orașe din județul Arad, aparținând gospodăriilor private. Caii aparțin raselor grele și semigrele și au vârsta cuprinsă între 1-21 ani. Caii au fost deparazitați cu fenbendazol 30%, cu o doză de 10 mg/kg greutate corporală. Ultima deparazitare a cailor a avut loc cu 3 luni înaintea începerii studiului. Metodele Willis și McMaster au fost utilizate pentru a observa dacă, calul este parazitat și nivelul infestării (ouă per gram de fecale-OPG). Probele de fecale ale cailor ce au avut un OPG<250 au fost excluși din studiu.

Pentru identificarea **formelor larvare ale ciathostominelor**, s-au realizat culturi larvare, în perioada decembrie 2013-martie 2017, au fost examinate 328 de probe de fecale, provenite de la cabaline din județele Caraș-Severin (64), Timiș (235 de probe) și Arad (29 probe).

Din județul Caraș-Severin au fost recoltate 64 de probe de fecale de la cabalinele din gospodăriile oamenilor din 4 localități: CS 1, CS 2, CS 3 și CS 4. Cabalinele au fost deparazitate o dată pe an sau o dată la doi ani cu fenbendazol. Ultima deparazitare a cabalinelor a fost cu 12 săptămâni înainte de începerea recoltării probelor de fecale. 31 de cai au fost deparazitați cu 12 săptămâni înainte de studiul. Caii luați în studiu au fost folosiți pentru tracțiune ușoară și grea (de povară). Vârsta cailor a fost cuprinsă între două luni-17 ani.

Din Timiș au fost recoltate 235 de probe de fecale de la cabalinele din herghelii private: TM 1, TM 2, TM 3, TM 4, TM 5, dar și din gospodării private. Caii au fost deparazitați cu produse pe bază de fenbendazol,

ivermectină, ivermectină și praziquantel, moxidectin și praziquantel. Ultima deparazitare administrată cabalinelor a fost cu 12 săptămâni înainte de începerea recoltării probelor de fecale. Caii au provenit din rase diferite: Ardenez, Nonius, Pursânge arab, Pursânge Englez, cai de povară și de sport. Vârsta lor a fost cuprinsă între 5 luni-28 ani.

Probele recoltate din județul Arad au fost din gospodăriile private ale oamenilor din localitățile AR 1 și AR 2. Produsele antiparazitare administrate cailor au fost pe bază de fenbendazol și ivermectină. La fel ca și la probele recoltate din județele Caraș-Severin și Timiș, ultima de parazitare a cailor a fost cu 12 săptămâni înaintea studiului cu excepția a trei probe. Caii erau de povară și de tracțiune ușoară, având vârsta cuprinsă între un an și 21 ani.

În urma studiului privind identificarea **paraziților adulți** au fost recoltați 3374 de ciathostomine adulte, de la 30 de cai. 842 de paraziți au fost supuși identificării pe baza structurilor anatomice ale extremității cefalice și posterioare ale paraziților. Din cei 842 de paraziți adulți: 426 de indivizi au fost identificați ca fiind *Cyathostomum catinatum*, 97-*Cyathostomum pateratum*, 71-*Cylicostephanus goldi*, 73-*Cylicostephanus longibursatus*, 109-*Cylicocyclus nassatus* și 66 de indivizi de *Petrovinema poculatum*.

OPG-ul a fost cuprins între 250 și 1000. Numărul de paraziți recoltați per cal a fost cuprins între 30 și 388 de paraziți. Toți strongilii recoltați au aparținut subfamiliei *Cyathostominae*, genurile: *Cyathostomum*, *Cylicostephanus*, *Cylicocyclus* și *Petrovinema*. Majoritatea ciathostominelor au fost eliminate în primele 24-36 de ore. În primele 24 de ore au fost eliminați 1503 paraziți, la 36 de ore 1190 paraziți, iar în ultimele 48 de ore 681 paraziți.

Prevalența ciathostominelor la cei 30 de cai examinați a fost de 80% pentru *Cyathostomum catinatum* (24/30), 53,33% *Cyathostomum pateratum* (16/30), 23,33% *Cylicostephanus goldi* (7/30), 66,66% *Cylicocyclus nassatus* (20/30), 60% *Cylicostephanus longibursatus* (18/30) și 20% *Petrovinema poculatum* (6/30).

Speciile identificate au fost caracterizate morfologic și au fost exemplificate prin atașarea fotografiilor originale.

Formele larvare și anume larvele infestante de stadiu trei, identificate în urma culturilor larvare au fost din subfamilia *Cyathostominae*, dar și din subfamilia *Strongylinae*. Tipurile de ciathostomine identificate sunt A, B, C, D, F și *Gyalocephalus capitatus*.

Tipurile de ciathostomine identificate au fost prezentate prin intermediul fotografiilor originale, unde s-a putut observa numărul celulelor intestinale, forma și aranjamentul acestora, iar dimensiunile larvelor au fost prezentate într-un tabel pentru cele trei județe.

Din totalul de 328 de probe de fecale recoltate de la cabalinele din județele Caraș-Severin, Timiș și Arad:

- s-au realizat culturi larvare din 214 probe (65,24%);
- 54 de probe de fecale (16,46%) au avut OPG mai mic de 50 și din acestea nu s-au realizat culturi larvare.
- 61 de probe (18,59%) din 328 au fost negative.

Prevalența parazitismului intestinal la cabalinele luate în studiu a fost de 81,40% (267/328).

Au fost alese pentru culturile larvare doar probele de fecale cu un grad mai ridicat de ouă per gram de fecale, cu o infestivitate mai mare, pentru a putea fi reprezentative pentru studiu.

Cyathostomum **Tip A** a fost identificat în 71,49% (153/214 probe), *Cyathostomum* **Tip B** 9,81% (21/214), *Cyathostomum* **Tip C** 42,52% (91/214), *Cyathostomum* **Tip D** 50,46% (108/214), *Cyathostomum* **Tip F** 9,81% (21/214), *Gyalocephalus capitatus* 3,73% (8/214).

În **județul Caraș-Severin** tipul A de ciathostomine a fost identificat în 42 din 64 probe (65,25%), tipul B 5/64 (7,81%), tipul C 22/64 (34,37%), tipul D 23/64 (35,93%) și tipul F 12/64 (18,75%). Au fost identificate și larve de *Strongylus vulgaris* 19/64 (29,68%), *Strongylus equinus* 12/64 (18,75%) și *Triodontophorus* spp. 4/64 (6,25%). Prevalența parazitismului a fost de 89,06% (57/64).

În **județul Timiș** au fost identificate ciathostomine din tipurile A 40,42% (95/235), B 6,38% (15/235), C 27,33% (64/235), D 30,63% (72/235), F 3,82% (9/235) și *Gyalocephalus capitatus* 3,40% (8/235), dar și *Strongylus vulgaris* 2,97% (7/235) și nematozi liberi 8,93% (21/235). În acest județ a fost înregistrată o prevalență a parazitismului de 77,87% (183/235).

În culturile larvare realizate în **județul Arad** au fost identificate ciathostomine din tipurile A în proporție de 55,17% (16/29), B 3,44% (1/29), C 17,24% (5/29), D 44,82% (13/29) și *Strongylus vulgaris* 6,89% (2/29),

Triodontophorus spp. 6,89% (2/29) și nematozi liberi 3,44% (1/29). Prevalența generală pentru județul Arad a fost de 93,10% (27/29).

În **capitolul 4**, este testată eficacitatea a două substanțe antiparazitare (fenbendazol și ivermectină) la cabalinele din județele Timiș și Arad, cu scopul de a observa dacă s-a instalat chimiorezistența la ciathostomine.

În acest studiu a fost utilizat testul FECRT (testul reducerii numărului de ouă din fecale) fiind denumit și „gold-standardul” pentru identificarea chimiorezistenței. Acest test are avantajul major că se poate realiza pentru orice substanță antiparazitară și nu este necesară prezența ouălor nedezvoltate de paraziți, sau a larvelor, rezultate prin culturi larvare.

Cauzele chimiorezistenței pot fi reprezentate de subdozarea substanței antiparazitare (frecvent greutatea corporală a cabalinelor este aproximată), deparazitările frecvente, folosirea aceleiași substanțe antiparazitare mai mulți ani consecutivi, chiar toată viața animalului. O altă cauză poate fi accesul facil al proprietarilor de cabaline la achiziționarea substantelor antiparazitare fără restricții, aceștia neluând în considerare fenomenul de chimiorezistență și administrând, de obicei, produsul convenabil din punct de vedere economic.

Scopul studiului a fost acela de a evalua eficacitatea a două substanțe antiparazitare, frecvent utilizate în Vestul României, în vederea determinării situației actuale a chimiorezistenței ciathostominelor la cabalinele din județele Timiș și Arad.

Studiul s-a desfășurat în perioada octombrie 2013-martie 2017, în mai multe localități ale județelor Timiș și Arad. Ecvinele luate în studiu, în număr de 303, au făcut parte atât din herghelii private, cât și din gospodăriile private, făcând parte din rasele ușoară, semigrea și grea, cu vârsta cuprinsă între șase luni și 28 de ani. Un criteriu important pentru selecția cabalinelor a fost acela ca animalele să nu fi fost deparazitate cu cel puțin 12 săptămâni înainte începerii studiului, urmat de buna comunicare și colaborare cu proprietarii animalelor.

Din județul Timiș au fost prelevate probe de fecale proaspete de la 150 cabaline (cinci localități), iar din județul Arad, 153 cabaline (patru localități). Metodele folosite pentru determinarea eficacității au fost McMaster și Willis. Formula de calcul a FECRT este, una simplă și necesită determinarea numărului de ouă per gram de fecale din ziua deparazitării (ziua zero) și din ziua a 14-a post deparazitare. Pentru realizarea tratamentului și al evaluării eficacității substanțelor antiparazitare, au fost selectate cabalinele ce au avut un număr de ouă per gram de fecale (OPG) mai mare sau egal cu 200. De asemenea, au fost realizate și culturi larvare pentru identificarea ciathostominelor și a strongililor migratori.

128 de cabaline au fost tratate cu **fenbendazol 10%** (Panacur[®] Intervet, pastă orală, 7,5mg/kg greutate corporală, timp de cinci zile consecutiv), iar 112 cabaline au fost tratate cu **ivermectină 2%** (Eqvamec P[®] Institutul Pasteur, pastă orală, 20mg/100 kg greutate corporală, o singură doză).

Se consideră că în cazul testului FECRT, chimiorezistența nu a fost instalată dacă substanțele antiparazitare au o eficacitate de peste 95% în cazul lactonelor macrociclice și peste 90% pentru benzimidazolice.

Din cei 303 cai luați în studiu:

- 240 cai au fost tratați, având un OPG \geq 200;
- 63 cai nu au fost tratați, fie pentru că au avut:
 - un OPG $<$ 200, (52 cai);
 - nu au fost identificate ouă de paraziți, în urma examenului coproparazitologic (11 cai).

Cei 240 de cai din județele Timiș și Arad au fost tratați cu fenbendazol 10% (128 cai) și ivermectină 2% (112 cai).

Prevalența parazitozelor întâlnită la cabalinele luate în studiu a fost de 96,36% (292/303), iar la 3,64% (11/303) cabaline nu au fost identificate ouă de paraziți în urma examenului coproparazitologic.

În ziua administrării tratamentului, au fost identificate larve de ciathostomine în toate probele din care au fost efectuate culturi larvare (240 probe de fecale), larve de *Strongylus vulgaris* în 106 probe de fecale din 240; în județul Timiș 27 probe de fecale din 110, iar în județul Arad, 79 probe de fecale din 130; larve de *Triodontophorus* în 50 de probe de fecale din 130, în județul Arad și larve de *Oesophagodontus* în 5 probe de fecale din 130, în județul Arad. În ziua 14 post tratament larvele de strongili din subfamilia *Strongylinae* nu au mai fost identificate, iar larvele de stadiu 3 din subfamilia *Cyathostominae*, care au supraviețuit tratamentului, au aparținut tipurilor A și D.

Ciathostominele din tipurile A și D, au prezentat o rezistență crescută față de antiparazitarele administrate, comparativ cu tipurile B, C, F și *Gyalocephalus*.

Cabalinele tratate cu fenbendazol 10% au fost în număr de 128, din care:

- 55 de cai din județul Timiș;
- 73 de cai din județul Arad.

Cele tratate cu ivermectină 2% au fost în număr de 112, din care;

- 55 de cai din județul Timiș;
- 57 de cai din județul Arad.

Valorile OPG-urilor inițiale au fost cuprinse între 200 și 5100. Valorile cele mai mari ale OPG-urilor au fost identificate la cabalinele din gospodăriile private.

Pentru loturile de cabaline la care s-au administrat **fenbendazol 10%**, la **nivel individual** s-a înregistrat atât că substanța antiparazitară este eficace (FECR peste 90%) la 116 cabaline, dar și prezența suspiciunii de chimiorezistență (FECR sub 90%) la 12 cabaline.

Valoarea FECRT pentru fenbendazol 10% la nivel de **grup/localitate** a fost cuprinsă între 96,82-100% pentru județul Timiș, iar pentru Arad între 94,75-100%, putând afirma că la nivel de grup fenbendazol 10% este eficace.

Pentru loturile de cabaline la care s-au administrat **ivermectină 2%**, s-a observat că atât la **nivel individual** cât și pe **loturi**, substanța antiparazitară a prezentat eficacitate (>95%).

Prezența suspiciunii de chimiorezistență pentru fenbendazol 10% a fost înregistrată la doi cai din TM 1 și TM 4 și la zece cai din AR 3 și AR 4. Valori mai scăzute ale eficacității ivermectinei 2% au fost identificate în localitățile TM 4 (96%) și AR 4 (97,42%).

În loturile de cabaline provenite din TM 4, AR 3 și AR 4, această situație se poate explica datorită numărului crescut de tratamente per an (5-6 tratamente/an), pe o perioadă îndelungată, pentru produsul pe bază de fenbendazol 10%.

Pentru cabalinele, ce prezintă ciathostomine cu suspiciune de chimiorezistență, este recomandat să se administreze un produs dintr-o altă clasă de antiparazitare, numărul tratamentelor să fie diminuat (2-3 tratamente/an) și realizat după ce au fost efectuate examene coproparazitologice. Utilizarea unei singure substanțe antiparazitare este indicată pe o perioadă de un an, apoi schimbarea acesteia cu o altă substanță dintr-o clasă diferită.

În **capitolul 5** a fost studiată instalarea chimiorezistenței, de această dată printr-o altă metodă și anume determinarea perioadei de reapariție a ouălor (ERP).

Scopul studiului a fost acela de a investiga prezența sau absența chimiorezistenței ciathostominelor la substanțele fenbendazol și ivermectină pe baza determinării ERP.

ERP este definită și ca intervalul de timp necesar dintre deparazitare și momentul în care OPG este cu 10% mai mare sau egal, față de OPG-ul din perioada anterioară deparazitării. Mai mulți cercetători consideră ca o reducere a acestei perioade trebuie privită ca un prim semn al instalării chimiorezistenței.

Studiul a fost efectuat pe un număr de 315 cabaline din județele Timiș și Arad, în perioada octombrie 2013-martie 2017. Probele de fecale din județul Timiș au fost recoltate de la 162 cabaline, iar din județul Arad 153 cabaline. Acestea au fost ținute atât pe pășune cât și la grajd, aspect important privind epidemiologia ciathostominelor. Vârsta cabalinelor a fost cuprinsă între șase luni și 28 ani, făcând parte din rasele: ușoară, grea și semigrea.

Probele de fecale au fost prelevate de la cai proveniți din herghelii private, cât și din gospodării private.

Cabalinele din herghelii au fost ținute pe pășune, dar și-n grajd; ielele cu mânjii au fost crescuți liberi, separat de armăsari, având acces pe pășune pe o perioadă mai mare de timp, în comparație cu armăsarii, care sunt crescuți în boxe individuale, iar accesul pe pășune este de scurtă durată.

Cabalinele din gospodăriile private au avut acces la pășune în lunile martie-noiembrie. În fiecare gospodărie privată numărul cailor a variat între doi și cinci cai.

Numărul locațiilor din:

- Timiș a fost șase (TM 1, TM 2, TM 3, TM 4, TM 5, TM 6);
- Arad au fost patru locații (AR 1, AR 2, AR 3, AR 4).

Cabalinele din herghelii au fost deparazitate de trei-șase/ori pe an, iar cei din gospodăriile private mult

mai rar, între o dată și două ori pe an; unele cabaline au fost deparazitate o dată la doi ani, atunci când animalul era bolnav, iar tratamentul simptomatic nu avea eficacitate. Un aspect important al studiului a fost acela că toate probele de fecale au fost prelevate de la cabaline ce nu au fost deparazitate cu cel puțin 12 săptămâni înaintea începerii studiului.

Cabalinele au fost tratate anterior studiului cu fenbendazol, produs utilizat frecvent datorită prețului avantajos și a ușoarei disponibilități pe piața farmaceutică, urmat de ivermectină, utilizat frecvent în perioada caldă (acționând și asupra paraziților externi), dar și înaintea scoaterii animalelor pe pășune, și pyrantel, utilizat rar. Din această cauză în studiu a fost investigată eficacitatea produselor pe bază de fenbendazol și ivermectină.

Substanțele antiparazitare administrate cabalinelor au fost: **fenbendazol 10%** (Panacur[®] Intervet, pastă orală, 7,5mg/kg greutate corporală, timp de cinci zile consecutiv), și **ivermectină 2%** (Eqvamec P[®] Institutul Pasteur, pastă orală, 20mg/100 kg greutate corporală, o singură doză).

Producătorii pastelor antiparazitare orale recomandă ca următorul tratament să fie realizat în cazul **fenbendazolului**, după șase-opt săptămâni, iar pentru **ivermectină** după 8-12 săptămâni.

Probele de fecale au fost recoltate din două în două săptămâni (zero săptămâni-opt săptămâni), astfel în zilele 14, 28, 42 și 56 pentru ambele substanțe antiparazitare, iar pentru ivermectină au fost recoltate probe și-n zilele 70 și 84 (săptămâna 10, respectiv 12). Aceste zile au fost selectate ținând cont de timpul de reparație al ouălor și al schemei de dozaj recomandată de producătorii produselor antiparazitare.

Metodele folosite în determinarea perioadei de reparație a ouălor au fost Willis, McMaster, dar și culturi larvare, pentru a putea diferenția ouăle morulate, în ciathostomine sau strongili.

Probele de fecale ce au avut un OPG mai mic de 200, au fost excluse din studiu, nu au fost deparazitate, tocmai pentru a reduce riscul apariției chimiorezistenței. În urma examenelor coproparazitologice au fost identificate ouă de strongili și de ascarizi.

Din totalul de **315 probe** de fecale recoltate de la cabalinele din cele două județe din Banat:

- **251 de probe** au înregistrat un $OPG \geq 200$, în ceea ce privește numărul de ouă de tip strongilid, fiind monitorizate în vederea evaluării ERP a celor două substanțe antiparazitare: fenbendazol și ivermectină;

- **64 de probe** au avut $OPG < 200$, fiind excluse din studiu și nedeparazitate.

În județul **Timiș** din 162 cabaline examinate coproparazitologic:

- **121 cabaline** au avut $OPG \geq 200$, fiind monitorizate în continuare pentru aflarea ERP;

- **41 cabaline** au avut OPG mai mic de 200, fiind excluse din studiu.

Astfel cele **121 cabaline** din județul Timiș au fost împărțite în două grupuri:

- un grup (**55 cabaline**) a fost tratat cu **fenbendazol**;

- al doilea grup (**66 cabaline**) a fost tratat cu **ivermectină**.

Cabalinele din acest județ au fost din rasele: ușoară, semigrea și grea. 81 de probe de fecale au fost recoltate de la cabaline ce au aparținut hergheliilor private, iar 40 probe din gospodăriile private

În județul **Arad** au fost examinate coproparazitologic 153 cabaline, din care:

- **130** au avut $OPG \geq 200$, fiind investigate în continuare pentru aflarea ERP;

- **23** au avut $OPG < 200$, fiind excluse din studiu.

Cele **130 de cabaline** din județul Arad au fost împărțite în două grupuri în funcție de substanța antiparazitară administrată:

- primul grup format din **73 cabaline**, a fost tratat cu **fenbendazol**;

- al doilea grup format din **57 cabaline**, a fost tratat cu **ivermectină**.

Cabalinele din acest județ au fost din rasele: ușoară, semigrea și grea. Toate probele de fecale au fost recoltate de la cabaline ce au aparținut gospodăriilor private.

În **județul Timiș**, în săptămâna 0, au fost identificate larve aparținând subfamiliei *Cyathostominae*, tipurile A, B, C, D și *Gyalocephalus*, prezente la cabalinele din toate locațiile, dar și subfamiliei *Strongylinae*, *Strongylus vulgaris*, prezente la cabalinele din două locații (TM 2 și TM 5).

În județul Timiș, la cabalinele deparazitate cu **fenbendazol** s-a observat că la trei iepe din rasa ușoară (TM 1, TM 4) probele de fecale au rămas pozitive pe întreaga durată a studiului, însă numărul de ouă de paraziți a fost redus de la 2000-2500 OPG la 200-250, pentru săptămânile 2-4, iar apoi crescând până la 1750-2350 în săptămâna 8. În săptămâna 8 toate cabalinele au înregistrat un OPG asemănător cu cel din săptămâna 0.

Pozitivarea probelor de fecale pentru cabalinele deparazitate cu **ivermectină** s-a înregistrat începând cu săptămâna 10, la 14 cai (200-450 OPG) din TM 4, atât femele cât și masculi din rasele ușoară și grea. În

săptămâna 12 numărul cailor crescând la 52 cai (TM 1, TM 2, TM 3, TM 4, TM 5) din 66 ce au prezentat un OPG \geq 200. Cele mai multe probe fiind din locația TM 4-32 cai.

ERP înregistrată în prezentul studiu este conformă cu cea prezentată de către producătorii pastelor orale: 6-8 săptămâni pentru fenbendazol și respectiv 8-12 săptămâni pentru ivermectină.

În **județul Arad**, larvele identificate din culturile de larve realizate inițial, au aparținut celor două subfamilii *Cyathostominae* și *Strongylinae*. Tipurile de ciathostomine identificate au fost: A, C, D, F, pentru toate locațiile din județul Arad, iar *Strongylus vulgaris*, *Triodontophorus* și *Oesophagodontus* au fost prezente la cabalinele din locațiile AR 1, AR 2, AR 3.

În județul Arad, 47 cai din 73 deparazitați cu **fenbendazol** au prezentat începând cu săptămâna 6, un OPG peste 200. În săptămâna 8, numărul de cai a crescut la 71. Cabalinele au fost atât din rasa ușoară, semigrea și grea.

Probele de fecale a 37 cai din 57 deparazitați cu **ivermectină**, au prezentat un OPG peste 200 în săptămâna 8. În săptămânile 10 și 12 numărul de probe de fecale crescând la 55, respectiv 56.

Toate cabalinele provin din gospodării private, ținute pe pășune pe perioada martie-noiembrie, lucru ce a facilitat infestarea cu paraziți.

Rezultatele obținute pentru județul Arad sunt similare cu cele din județul Timiș, ERP nesuferind nicio modificare, fiind pentru fenbendazol de șase-opt săptămâni și pentru ivermectină de 8-12 săptămâni, lucru ce denotă lipsa instalării chimiorezistenței.

În **capitolul 6**, chimiorezistența a fost determinată cu ajutorul reacției polimerazice în lanț (PCR) pentru benzimidazolice.

Scopul acestui studiu a fost acela de a evidenția chimiorezistența față de benzimidazolice, instalată la cabalinele din județul Timiș, prin efectuarea reacției polimerazice în lanț (PCR). Pentru realizarea acestui scop, larvele rezultate în urma culturilor larvare au fost recoltate și utilizate pentru extragerea ADN-ului, necesar PCR-ului.

La ciathostomine mecanismul apariției chimiorezistenței față de benzimidazolice implică mai mult de o singură mutație (TTC/TAC), astfel codonii 167 și 200 ale izotopului-I sunt considerați a fi importanți pentru chimiorezistență.

Probe de fecale de la cabaline (43) din județul Timiș au fost recoltate, pentru efectuarea studiului. Cabalinele au provenit din herghelii private (TM 1, TM 2), făcând parte din rasa ușoară (Cal Sport Unguresc, Cal Sport Românesc, Pur Sânge Englez, Pur Sânge Arab), unde s-au efectuat deparazitări pe bază de benzimidazolice în lunile și anii precedenți.

Din **TM 1** au fost recoltate 21 probe de fecale de la cabaline cu vârsta cuprinsă între 3-16 ani, iar raportul dintre masculi și femele a fost de 18/3.

Din **TM 2** au fost recoltate 22 probe de fecale de la cabaline cu vârsta cuprinsă între 6 luni-22 ani, raportul dintre masculi și femele a fost de 8/14.

Probele de fecale cu rezultate negative în urma examenelor coproparazitologice au fost eliminate din studiu (șase probe din TM 1 și trei din TM 2).

OPG-ul înregistrat pentru probele de fecale din TM 1 a fost cuprins între 50-550, iar din TM 2 între 150-1900.

Pentru extragerea ADN-ului din larve a fost folosit protocolul standard Isolate II Genomic DNA Kit. Larvele au fost recoltate din culturile larvare prin centrifugarea lichidului din culturi la 1500 rpm (rotații per minut) timp de trei minute.

Amplificarea ADN-ului se realizează prin reacția polimerazică în lanț (PCR) după von Samson-Himmelstjerna și col., (2002), Coles și col., (2006) modificată. Primerii folosiți în reacție sunt:

Reverse - CN30R (alele nespecific) cu secvența 5' AGC AGA GAG GGG AGC AAA GCC AGG 3'

Forward - CN24FS (alele specifice) cu secvența 5' GGT TGA AAA TAC AGA CGA GAC TTT 3'

- **CN25FR** (alele specifice) cu secvența 5' GGT TGA AAA TAC AGA CGA GAC TTA 3'

Comparația de primeri pentru identificarea strongililor **benzimidazol-rezistenți** este CN25FR/CN30R, iar pentru **benzimidazol-sensibili** este CN24FS/CN30R. Această metodă este folosită pentru identificarea a șapte specii de ciathostomine: *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicocyclus insigne*, *Cylicocyclus elongatus*, *Cylicocyclus radiatus*, *Cyathostomum pateratum*, *Cyathostomum catinatum* și *Cyathostomum coronatum*.

Această reacție PCR a fost realizată pentru a demonstra polimorfismul codonului 200 TTC/TAC în structura genei β -tubulinei ciathostominelor. Prin această reacție a fost demonstrat că larvele dintr-o populație benzimidazol rezistentă conțin plasmide TTC.

Probele cu ADN-ul extras din larvele obținute în urma centrifugării au fost numerotate de la 11-44, pentru o identificare și o asociere mai ușoară a probei de fecale provenită de la cabalinele din TM 1 și TM 2. Au fost realizate patru geluri de agaroză 2% pentru cele 34 probe cu ADN extras și amplificat.

În urma electroforezei au fost identificate cabaline care prezintă ciathostomine benzimidazol-sensibile, benzimidazol-rezistente, sau ambele.

Cabalinele care au prezentat ciathostomine cu gene:

- **benzimidazol-sensibile și rezistente** au fost în număr de 20 din 34 (**58,82%**),
- **benzimidazol-sensibile** 9 (**26,47%**)
- **benzimidazol-rezistente** trei (**8,82%**).

În două probe (29 și 34) ADN-ul nu a fost amplificat.

În **TM 1**, 13 probe din 19 (68,42%) au avut ciathostomine cu ambele gene, trei probe (15,78%) doar benzimidazol-sensibile și două probe (10,52%) benzimidazol-rezistente.

Situația chimiorezistenței în **TM 2** a fost următoarea: șapte probe din 15 (46,66%) au prezentat ambele gene, șase probe (40%) benzimidazol-sensibile și o singură probă (6,66%) pentru benzimidazol-rezistente.

SUMMARY

RESEARCHES REGARDING THE INFRAPOPULATION OF CYATHOSTOMINS IN HORSES FROM BANAT

The present thesis contains the following: Table of contents- written in Romanian and English, list of abbreviations and symbols used in thesis, the summary, also written in Romanian and English, the two main parts of the thesis and the references-presented at the end of the second part, followed by the list of scientific articles published by the PhD student.

The paper is structured into two parts. The first part is entitled **Introduction** and the second one- **Contents**. The second part is organized into four main chapters:

- I. The current status of knowledge.**
- II. Personal research.**
- III. General conclusions and recommendations.**
- IV. Originality elements.**

The first part is 34 pages long.

The second part is 71 pages long.

There are 49 tables and 73 figures.

There references comprise 197 titles (articles, books, doctoral theses, reports and websites).

The motivation for the choice of this research theme is found in the **Introduction**, as well as the importance and the actuality of the chosen theme and a short presentation of the content and scientific objectives proposed in this research.

I. The current status of knowledge is structured into two chapters:

- 1. Etiology and epidemiology in cyathostominosis.**
- 2. Diagnosis and parasitic control in cyathostominosis.**

The updated information regarding general aspects and the morphology of this parasite is found in the **first chapter**. The most recent taxonomic classification of cyathostomins is also present here, followed by the presentation of the genera (specific morphology elements of the adult parasites, their location in the large intestine, hosts and geographical distribution) belonging to the *Cyathostominae* subfamily, identified in Europe. Additionally, new information has been brought for the identification of cyathostomins larvae and regarding their biological cycle. The epidemiological data, represented by the prevalence, the sources and ways of infestation, the biotic potential, the favouring factors and the drug resistance are presented after the etiology. Actuality *in vivo* and *in vitro* methods for detecting the resistance to antiparasitic drugs are presented in the drug resistance section.

Data regarding the diagnosis in cyathostominosis (epizootiological, clinical and laboratory) and data regarding the parasitic control (treatment and prophylaxis) are presented in the **second chapter**.

II. The Individual research section is structured into four chapters:

- 3. Etiology of cyathostomins in Western Romania**
- 4. Efficacy of antiparasitic substances (fenbendazole 10% and ivermectin 2%) on the population of cyathostomins from the horses in the Timis and Arad Counties.**
- 5. Experimental research regarding drug resistance to fenbendazole and ivermectin, based on the egg reappearance period in cyathostomins and strongyles found in horses from Timis and Arad Counties.**
- 6. Identification of drug resistance to benzimidazole, using molecular assay.**

Each chapter is structured into 4 four chapters:

- o Aim and objectives.
- o Materials and methods.
- o Results and discussion.
- o Conclusions.

The etiology and epidemiology of cyathostomins in Banat is studied in **chapter 3**. It is of great importance to identify the existence of this horse parasitosis, taking into account the importance it has acquired in the past years. This is due to the fact that these parasites have developed drug resistance towards usual antiparasitic drugs especially towards benzimidazole very easily, compared to other parasites. In order to prevent this disease we must diagnose it correctly. The diagnosis that confirms the presence of this disease is the laboratory diagnosis. It helps identify the adult or larval stage parasites through coproscopic methods (methods that are briefly presented in the first chapter of the section “Current status of knowledge”).

The aim of this study was to identify the species of cyathostomins in order to put the diagnosis of cyathostominosis and to do an adequate parasitic control protocol. The identification of species is very difficult because of the similarities between migrating strongyle eggs (*Strongylinae* subfamily) and cyathostomin eggs.

The objectives of the present study were as follows: identification of cyathostomin species and establishing their prevalence in horses from various growth systems (studs, private houses) in western Romania.

The identification of the adult cyathostomin species based on their morphological characteristics has been done by deworming the horses and collecting the feces over a 48-hour period following the deworming procedure. The adult parasites from the feces were then identified, sometimes with difficulty caused by the lack of communication between us and the owner/caretaker of the horse who has no interest in keeping the eliminated feces and who cannot understand the pathogenicity of this small-sized parasite.

Another identification method used for cyathostomins is the larval cultures. The aim is to obtain stage three infesting larvae. Whether they belong to the *Strongylinae* subfamily or to the *Cyathostomine* subfamily can be easily established based on the number of intestinal cells and on the shape and size of the larvae.

The areas where the samples were collected from were described from a geo-climatic point of view and the Counties Caras-Severin, Timis and Arad represented them.

The study regarding the identification of adult cyathostomines took place in the period October 2013-April 2014 on 47 horses from different towns in the Arad County, belonging to private households. The light to draft horse breeds were aged 1 to 21 years. The horses were dewormed using 30% fenbendazole, in a 10mg/kg body weight dose. The last deworming of the horses took place 3 months before the initiation of the study. We used the Willis and McMaster methods to observe if the horses has parasites and to which level of infestation (eggs per gram of feces).The feces samples from horses which had an EPG<250 were excluded from the study.

In order to identify the larval forms of the cyathostomins, we made larval cultures in the period December 2013-March 2017 and were examined 328 feces samples from horses from the counties Caras-Severin (64), Timis (235) and Arad (29).

From Caras-Severin County we collected 64 feces samples from horses in people's households from 4 different locations: CS 1, CS 2, CS 3 and CS 4. The horses were dewormed once a year or once in two years with fenbendazole. The last deworming was done 12 weeks before we started collecting the feces samples. Thirty one horses were dewormed 12 weeks before the beginning of the study. The animals taken into study were animals used for light and heavy work. They were aged 2 months to 17 years.

From Timis County, we collected 235 samples from horses raised in private studs: TM 1, TM 2, TM 3, TM 4, TM 5 but also from horses belonging to private owners. The animals were dewormed with products based on fenbendazole, ivermectin, ivermectin and praziquantel, moxidectin and praziquantel. The last deworming was administered 12 weeks before we started collecting the feces samples. The horses were of various breeds: Ardennes, Nonius, Arabian Purebred, English Thoroughbred, sport horses and traction horses. They were aged 5 months to 28 years.

The samples collected from the Arad County belonged to private houses of people from locations AR 1 and AR 2. The antiparasitic products used in these horses were based on fenbendazole and ivermectin. Similar to the cases of the horses from Timis and Caras Severin County, the last deworming of the horses was done 12 weeks before the beginning of the study. The horses were light to draft breed horses, with ages between 1 year and 21 years.

Following the study for identification of **adult parasites**, 3374 adult cyathostomins were collected from 30 horses. 842 parasites were subjected to identification tests based on the anatomical structures of the cephalic and posterior extremities of the parasite. Out of 842 adult parasites: 426 individuals were identified as *Cyathostomum catinatum*, 97 as *Cyathostomum pateratum*, 71 as *Cylicostephanus goldi*, 73 as *Cylicostephanus longibursatus*, 109 as *Cylicocyclus nassatus* and 66 as *Petrovinema poculatum*.

The EPG was between 250 and 1000. The number of parasites collected per horse was between 30 and 388. All the collected strongyles belonged to the *Cyathostominae* subfamily, genera *Cyathostomum*, *Cylicostephanus*, *Cylicocyclus* and *Petrovinema*. The majority of cyathostomins were eliminated during the first 24-36 hours. In the first 24 hours, 1503 parasites were eliminated, 1190 parasites were eliminated after 36 hours and 681 parasites were eliminated during the last 48 hours.

The prevalence of cyathostomins in the 30 examined horses was 80% positive for *Cyathostomum catinatum* (24/30), 53.3% positive for *Cyathostomum pateratum* (16/30), 23.33% positive for *Cylicostephanus goldi* (7/30), 66.66% positive for *Cylicocyclus nassatus* (20/30), 60% positive for *Cylicostephanus longibursatus* (18/30) and 20% positive for *Petrovinema poculatum* (6/30).

The identified species were characterized morphologically. The original photographs were attached in order to exemplify.

The **larval stages**, specifically the infesting third stage larvae, identified through larval cultures belonged to the subfamily *Cyathostominae* but also to the subfamily *Strongylinae*. We have identified the A, B, C, D, and F cyathostomin types as well as the species *Gyalocephalus capitatus*.

The types of cyathostomins we identified were presented through the original pictures, where the number of intestinal cells, their shape and arrangement can be noticed as well as the sizes of the larvae. The latter parameter was presented in a table for all three counties.

On a total of 328 feces samples, collected from horses in the Caras-Severin, Timis and Arad Counties:

- We made larval cultures from 214 samples (65.24%)
- 54 feces samples (16.46%) had an EPG lower than 50 and we didn't proceed with larval cultures on them;
- 61 (18.59%) out of 328 samples were negative.

The prevalence of intestinal parasites in the horses taken into study was 81.40% (267/328).

For the larval cultures, we chose only the samples which had a higher FEC and thus higher infectivity and were more representative for the study.

Type A *Cyathostomum* was identified in 71.49% of the cases (153/214 samples), Type B *Cyathostomum* stood for 9.81% of the cases (21/214), *Cyathostomum* **Type C** for 42.52% (91/214), *Cyathostomum* **Type D** in 50.46% of cases (108/214), *Cyathostomum* **Type F** in 9.81% (21/214) and *Gyalocephalus capitatus* in 3.73% (8/214).

In **Caras Severin County**, Type A cyathostomins were identified in 42 out of 64 samples (65.25%), type B in 5/64 (7.81%), type C in 22/64 (34.37%), type D in 23/64 (35.93%) and type F in 12/64 (18.75%). Larvae belonging to the species *Strongylus vulgaris*-19/64 (29.68%), *Strongylus equinus*- 12/64 (18.75%) and *Triodontophorus* spp.-4/64 (6.25%) were also identified. The total prevalence of parasites was of 89.06% (57/64).

In **Timis County** we identified type A cyathostomins- 40.42% (95/235), B 6.38% (15/235), C 27.33% (64/235), D 30.63% (72/235), F 3.82% (9/235) and *Gyalocephalus capitatus* 3.40% (8/235), as well as *Strongylus vulgaris* 2.97% (7/235) and free nematodes 8.93% (21/235). In this county, we recorded a prevalence of 77.87% (183/235).

In the larval cultures from **Arad County**, we identified cyathostomins of the following types: A-55.17% (16/29), B 3.44% (1/29), C 17.24% (5/29), D 44.82% (13/29) and *Strongylus vulgaris* 6.89% (2/29), *Triodontophorus* spp. 6.89% (2/29) and free nematodes 3.44% (1/29). The general prevalence for the Arad County was 93.10% (27/29).

In **chapter 4**, the efficacy of two antiparasitic substances (fenbendazole and ivermectin) is tested on horses from Timis and Arad Counties, with the aim of observing if drug resistance installs in cyathostomins.

In this study we have used the FECRT test (fecal egg count reduction test) also known as the gold-standard for identification of drug resistance. This test has the major advantage of being applicable on any antiparasitic substance and the presence of underdeveloped parasite eggs or larvae is not necessary.

The causes of drug resistance may be underdoses of antiparasitic substances (frequently the weight of the horses is approximated), frequent dewormings, use of the same antiparasitic substance for several consecutive years even for a lifetime. Another cause may be the easy access of owners to antiparasitic substances, which they can acquire without restrictions. They do not take the matter of drug resistance into account and they continue to administer the most economically convenient substance.

The aim of this study was to evaluate the efficacy of two antiparasitic substances, frequently used in western Romania, in order to establish the status of drug resistance among cyathostomins from horses in Timis and Arad Counties.

The study was undertaken in the period October 2013-March 2017, in several locations in Timis and Arad Counties. The horses taken into study, 303, belonged to private studs or private households and belonged to light and draft breeds, aged 6 months to 28 years. An important criteria for the selection of horses was the deworming: the eligible animals shouldn't have been dewormed at least 12 weeks before the beginning of the study, followed by other criteria such as good communication with the owners.

From Timis county we collected fresh feces samples from 150 horses (5 locations) and from Arad we collected 153 samples (four locations). The methods that we used to determine the efficacy were McMaster and Willis. The calculation formula for the FECRT is a simple one and it needs the number of eggs/ gram of feces from the deworming day (day 0) and from the 14 th day post-deworming. To make the treatment and to evaluate the efficacy of the substances, we selected the horses which had a EPG higher or equal to 200. We also made larval cultures to identify cyathostomins and migrating strongyles.

128 horses were treated with **10% fenbendazole** (Panacur Intervet, oral paste, 7.5 mg/kg bodyweight, for 5 consecutive days) and 112 horses were treated with **2% ivermectin** (Eqvamec P, Pasteur Institute, oral paste, 20mg/100kg body weight, single dose).

For macrocyclic lactones, if the substances had an efficacy higher than 95% in the case of the FECRT, it is considered that there is no drug resistance. The same stands for benzimidazole if the efficacy is 90%.

Out of 303 horses taken into study:

- 240 were treated, having a EPG \geq 200;
- 63 horses weren't treated because they either had:
 - a EPG<200 (52 horses);
 - no parasites were identified following the coproscopic exams (11 horses).

The 240 horse from the counties Timis and Arad were treated with 10% fenbendazole (128 horses) and 2% ivermectin (112 horses).

The prevalence of the parasitosis in the horses taken into study was 96.36% (292/303) and in 3.64% (11/303) of horses, we haven't identified any parasite eggs following the coproscopic exams.

On the day of treatment, we identified cyathostomin larvae in all the samples from which we made larval cultures (240 feces samples). *Strongylus vulgaris* larvae were found in 106 feces samples-27 out of 110 in Timis and in Arad 79 were positive out of 130. *Triodontophorus* larvae were found in 50 samples out of 130 in Arad County and *Oesophagodontus* larvae were found in 5 samples out of 130. On day 14 post-treatment, the larvae of the *Strongylinae subfamily* could no longer be identified and the stage 3 larvae from the *Cyathostominae subfamily*, which have survived the treatment, belonged to subtypes A and D.

Cyathostomins from types A and D had higher resistance towards antiparasitic drugs, compared to types B, C and F and *Gyalocephalus*.

Out of 128 horses treated with 10% fenbendazole:

- 55 horses were from Timis County;
- 73 horses were from Arad County.

Out of 112 horses treated with 2% ivermectin:

- 55 horses were from Timis County;
- 57 horses were from Arad County.

The initial values of EPG ranged from 200 to 5100. The highest values of EPG were identified in horses from private households.

In the lots where **10% fenbendazole** was administered, it has been noticed at an **individual level** that the antiparasitic substance was efficient (FECR over 90% in 116 horses). However, in the case of 12 horses, there was a suspicion for drug resistance (FECR under 90%).

The values of FECRT at **group/location level**, for 10% fenbendazole, were comprised between 96.82%-100% in Timis County. In Arad County, the values ranged from 94.75%-100%, thus we may state that, in groups, 10% fenbendazole is efficient.

In the case of the lots treated with **2% ivermectin**, was noticed the efficiency (>95%) of the substance both in **groups** and **individuals**. The presence of suspicion regarding drug resistance to 10% fenbendazole was recorded in two horses from TM 1 and TM 4 and in 10 horses from AR 3 and AR 4. Lower efficiency values for 2% ivermectin were noticed in TM 4 (96%) and AR 4 (97.42%).

In the lots from TM 4, AR 3 and AR 4, this situation may be due to the high number of treatments per year (5-6 treatments/year), over a long period of time with 10% fenbendazole.

For horses which have cyathostomins and the suspicion for drug resistance, it is recommended to administer a product from another class of antiparasitic drugs, to lower the number of treatments (2-3 treatment/year) and to make treatments only after coproscopic exams. The use of a single antiparasitic substance is indicated over a one-year period. After that, it should be changed with a substance from another class.

In **chapter 5**, was studied the installment of drug resistance, this time using a different method, namely the ERP (egg reappearance period) determination.

ERP is defined as the necessary time interval between deworming and the moment when EPG is 10% higher or equal to the EPG from the period prior to deworming. Several researchers consider that a reduction of this period has to be regarded as a first sign for drug resistance.

The study was conducted on 315 horses from Timis and Arad Counties, in the period October 2013-March 2017. The feces samples from Timis were collected from 162 horses and from 153 horses from Arad. They were held on pastures and in stables, facts that are important from an epidemiological point of view. The ages of the animals ranged from 6 months to 28 years and the animals were light to draft breed horses.

The samples were collected from horses in private studs and from private households. Horses from studs were fed on pastures and in stables. The mares and the foals were free-range, separate from stallions, with access to pastures for a longer period compared to stallions, which were kept in individual boxes, with a short-time access on pastures.

Horses from private households had access to grazing lands from March until November. In each household, the number of horses ranged from two to five.

The number of locations was as follows:

- six from Timis (TM 1, TM 2, TM 3, TM 4, TM 5, TM 6);
- four from Arad (AR 1, AR 2, AR 3, AR 4).

The horses in studs were dewormed 3-6 times/year and the ones from private households had rarer treatments: once or twice/year. Some horses were dewormed once in two years, only when the animal was ill and the symptomatic treatment had no effect. An important aspect of the study was that all the feces samples were collected from horses that were not dewormed at least 12 weeks prior to the beginning of the study.

The horses received previous treatments with fenbendazole, a product frequently used because of its low costs and high availability on the pharmaceutical market. This product is followed by ivermectin, frequently used during warmer periods (acts on external parasites as well) but also before the beginning of grazing period. Pyrantel is rarely used and that is the reason why drug resistance was only studied for fenbendazole and ivermectin.

The antiparasitic substances administered to horses were **10% fenbendazole** (Panacur Intervet, oral paste, 7.5 mg/kg body weight, for 5 consecutive days) and **2% ivermectin** (Eqvamec P, Pasteur Institute, oral paste, 20 mg/100 kg body weight, a single dose).

The producers of the antiparasitic oral pastes recommend the following treatment to be performed after 6-8 weeks for **fenbendazole** and 8-12 weeks for **ivermectin**.

The feces samples were collected once in two weeks (from 0 to 8 weeks) on days 14, 28, 42 and 56 in both cases of antiparasitic substances. For ivermectin we collected additional samples on day 70 and 84 (week 10 and 12). These days were selected taking into account the egg reappearance time and the dose scheme recommended by the producers of the antiparasitic drugs.

In order to determine the egg reappearance time we used the Willis, McMaster and larval cultures methods, the latter serving as a differentiation method for the morulated eggs into cyathostomins or strongyles.

The feces samples with an EPG lower than 200 were excluded from the study and the animals did not receive antiparasitic treatment in order to lower the risk of drug resistance. Following the coproscopic exams, were identified strongyles and roundworms.

From a total of **315 samples** collected from horses in 2 counties from Banat:

- **251 samples** were recorded with a $EPG \geq 200$ in what regards the strongyle type eggs. They were monitored in order to evaluate the ERP of the two antiparasitic substances: fenbendazole and ivermectin.

- **64 samples** were recorded with a $EPG < 200$ and excluded from the study, without receiving antiparasitic treatment;

In **Timis County**, from 162 horses that were subjected to coproscopic exams:

- **121 horses** had a $EPG \geq 200$ and were further monitored in order to find out the ERP;

- **41 horses** had a EPG lower than 200, being excluded from the study.

The **121 horses** from Timis County were separated into two groups:

- one group (**55 horses**) treated with fenbendazole;

- the second group (**66 horses**) treated with ivermectin

The horses in this county were light to draft breed horses. Were collected 81 feces samples from horses that belonged to private studs farms and 40 samples from horses in private households.

In **Arad County**, were examined 153 horses and observed the following:

- **130** had a $EPG \geq 200$ and were further investigated to find out the ERP;

- **23** had a $EPG < 200$ and were excluded from the study.

The **130 horses** from Arad County were separated into two groups according to the antiparasitic substance was administered:

- the first group made of **73 horses** received treatment with fenbendazole;

- the second group made of **57 horses** received treatment with ivermectin.

The horses from this county were also light to draft bred horses. All the samples were collected from private owners.

In **Timis County**, in week 0, we identified larvae belonging to the *Cyathostominae* subfamily, types A, B, C, D and *Gyalocephalus*, present in all horses, from every location. We also identified larvae belonging to the *Strongylinae* subfamily and *Strongylus vulgaris* larvae in horses from location TM 2 and TM 5.

In the horses from Timis County, in the group treated with **fenbendazole**, there were three light breed mares (TM 1 and TM 4) that had positive feces samples throughout the entire period of study but the number of parasite eggs was reduced from 2000-2500 to 200-250 for weeks 2-4, rising up to 1750-2350 in week 8. During week 8, all horses had a EPG similar to the one in week 0.

The feces samples, in the case of animals dewormed with **ivermectin**, became positive again starting from week 10 (14 horses with EPG 200-450) in TM 4. The horses were both light and draft bred males and females. During week 12, the number of horses grew to 52 (TM 1, TM 2, TM 3, TM 4, TM 5) out of 66 horses with $EPG \geq 200$. Most of the samples were from TM 4-32 horses.

The ERP recorded in the present study is similar to the one presented by the producers of oral pastes, 6-8 weeks for **fenbendazole** and 8-12 weeks for **ivermectin**.

In **Arad County**, the larvae identified through initial larval cultures, belonged to the *Cyathostominae* and *Strongylinae* subfamilies. We identified types A, C, D and F of cyathostomins in all locations from Arad and additionally, we identified *Strongylus vulgaris*, *Triodontophorus* and *Oesophagodontus* in horses from AR 1, AR 2 and AR 3.

In Arad County, 47 out of 73 horses dewormed with **fenbendazole**, presented starting with week 6, a EPG over 200. In week 8, the number of horses grew to 71.

The samples of 37 out of 57 horses, dewormed with **ivermectin**, had a EPG over 200 in week 8. During weeks 10 and 12, the number of positive samples grew to 55, respectively 56.

All horses came from private households, they were hold on pasture from March until November, fact which made infestation easier.

The results obtained for Arad County are similar to the ones from Timis County, the ERP suffering no modifications. The ERP was 6-8 weeks for fenbendazole and 8-12 weeks for ivermectin, fact which denotes the absence of drug-resistance.

In **Chapter 6**, drug-resistance was determined using polymerase chain reaction (PCR) for benzimidazoles.

The aim of this study was to enhance the drug-resistance towards benzimidazoles, installed in horses from Timis County, using polymerase chain reactions. In order to achieve this goal, the larvae, which resulted following larval cultures, were collected and used for DNA extraction.

In cyathostomins, the mechanism of drug-resistance towards benzimidazoles implies more than one mutation (TTC/TAC), thus codones 167 and 200 of the isotope I are considered important for this process.

Feces samples from horses (43) in Timis County were collected for this study. The animals came from private studs farms (TM 1 and TM 2). They were light breed horses (Hungarian Sport Horse, Romanian Sport Horse, Thoroughbred and Arabian Purebred) that were dewormed with benzimidazoles during the previous months and years.

Were collected 21 samples from **TM 1**, from horses aged 3-16 years. The male-female ratio was 18/3.

From **TM 2**, we collected 22 samples from horses aged 6 months to 22 years. The male-female ratio was 8/14.

The negative feces samples were eliminated from the study (six samples from TM 1 and three samples from TM 2).

The recorded EPG for the feces samples in TM 1 was 50-550 and from TM 2 it was 150-1900.

In order to extract the DNA from larvae, we used the Isolate II Genomic DNA Kit standard protocol.

The larvae were collected from larval cultures through liquid centrifuging at 1500 rpm (rotations per minute), for three minutes.

DNA amplification was done using PCR according to Samson-Himmelstjerna et al. (2002) and Coles et al. (2006) modified. The primers used for the reactions were:

Reverse - CN30R (nonspecific allele) with the sequence 5' AGC AGA GAG GGG AGC AAA GCC AGG 3'

Forward - CN24FS (specific allele) with sequence 5' GGT TGA AAA TAC AGA CGA GAC TTT 3'

- **CN25FR** (specific allele) with sequence 5' GGT TGA AAA TAC AGA CGA GAC TTA 3'.

The combination of primers used to identify benzimidazole resistant cyathostomins is CN25FR/CN30R and the one for benzimidazole sensitive is CN24FS/CN30R. This method is used to identify 7 species of cyathostomins: *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicocyclus insigne*, *Cylicocyclus elongatus*, *Cylicocyclus radiatus*, *Cyathostomum pateratum*, *Cyathostomum catinatum* and *Cyathostomum coronatum*.

This PCR reaction was made to demonstrate the polymorphism of the codon 200 TTC/TAC in the structure of the β -tubuline gene of cyathostomins. Through this reaction, we have demonstrated that the larvae from a population of benzimidazole resistant parasites contain TTC plasmids.

The DNA samples extracted from larvae obtained after centrifuging were numbered 11 to 44 in order to easily identify and associate the feces samples from TM 1 and TM 2 horses. We made four 2% agarose gels for the 34 samples with extracted and amplified DNA.

Following electrophoresis, were identified horses with benzimidazole sensitive cyathostomins, benzimidazole resistant cyathostomins or both.

There were 20 horses out of 34 (**58.82%**) with **benzimidazole resistant and sensitive genes**, 9 (**26.47%**) with **benzimidazole sensitive genes** and three (**8.82%**) with **benzimidazole resistant genes**. In two samples (29 and 34) the DNA was not amplified.

In **TM 1**, 13 samples out of 19 (68.42%) had cyathostomins with both genes present, three samples (15.78%) had only benzimidazole sensitive genes and two samples (10.52%) had benzimidazole resistant genes.

The situation of drug-resistance in **TM 2** was as follows: seven samples out of 15 (46.66%) had both genes present, six samples (40%) were benzimidazole sensitive and only one sample (6.66%) was benzimidazole-resistant.