



UNIVERSITATEA DE ȘTIINTE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ  
CLUJ-NAPOCA  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ



---

**TEZA DE ABILITARE**

# **Studii de farmacodinamie în evaluarea chimiorezistenței la medicația antiparazitară**

---

Domeniul: **Medicină Veterinară**

---

Autor: **Mihai Sorin CERNEA**

---

CLUJ-NAPOCA, 2022



**USAMV**  
UNIVERSITATEA DE  
ȘTIINTE AGRICOLE ȘI  
MEDICINĂ VETERINARĂ  
CLUJ-NAPOCA

## Rezumat

Activitatea științifică prezentată în teza de abilitare se referă la cele mai importante rezultate obținute în cercetare în perioada 2006-2020, fiind descrise rezultatele semnificative prezentate în 3 lucrări publicate în reviste indexate ISI, 19 lucrări publicate în reviste indexate BDI, în calitate de prim autor și 4 proiecte de cercetare finanțate de UEFISCDI și de parteneri din domeniul industriei farmaceutice din România.

După susținerea tezei de doctorat, direcțiile principale de cercetare au fost: evaluarea rezistenței paraziților prin studii *in vivo* și *in vitro* de farmacodinamie, respectiv alternative fitoterapeutice în parazitoză.

Teza de abilitare este structurată în trei părți, *partea întâi* este o prezentare succintă a formării mele profesionale, *partea a doua* cuprinde o selecție a celor mai relevante direcții de cercetare, iar *partea a treia* reprezintă planul de dezvoltare științifică, profesională și academică.

Partea a doua a tezei este structurată în două mari capitole care cuprind direcțiile principale de cercetare.

Capitolul 1. În acest capitol sunt prezentate metodele de depistare *in vitro* și *in vivo* a rezistenței paraziților, precum și rezultatele obținute în cadrul proiectului de cercetare PNII Idei 2007 care a avut ca scop implementarea modelelor biomatematice de monitorizare și predicție a chimiorezistenței strongililor digestivi, precum și alternative terapeutice fără componentă poluantă.

Capitolul 1.1. Sunt prezentate principalele metode de depistare a paraziților la medicația specifică, deoarece fiecare dintre aceste teste au un anumit grad de sensibilitate, fezabilitate și rentabilitate.

Capitolul 1.2. Studiile realizate au vizat verificarea comparativă a sensibilității și specificității principalelor metode și teste de investigare a chimiorezistenței helminților digestivi de la cabaline. Prin cele 540 de determinări realizate s-a remarcat faptul că aplicând metoda Stoll de cuantificare a larvelor infestante, sensibilitatea și specificitatea acestui test a fost de 100%. Comparativ, prin metoda McMaster sensibilitatea a fost de 85,82%, iar prin diagnostic clinic de doar 10,86%.

Capitolul 1.3. Un alt obiectiv a fost stabilirea parametrilor funcționali ai modelului matematic deterministic de evaluare *in vitro* a chimiorezistenței, prin testul de eclozionare al ouălor (egg hatch assay - EHA) și testul de dezvoltare larvară (larval development assay - LDA). Pentru acuratețea, corelarea și interpretarea corectă a datelor obținute, atât pentru EHA cât și LDA, s-a utilizat softul original - Anthelminthic Resistance Program (APR), conceput special pentru astfel de determinări. Cercetările întreprinse pentru validarea softului au avut drept scop, evidențierea eficacității terapeutice a derivaților benzimidazoli și lactonelor macrociclice, împotriva strongililor de la un lot de 60 cabaline, prin cele două teste *in vitro* EHA și LDA. Interpretarea statistică a datelor a fost realizată prin utilizarea modelului matematic de evaluare a chimiorezistenței conceput astfel încât să poată determina următorii indicatori: procentul de eclozionare la concentrația de referință sau de dezvoltare larvară; dreapta de predicție și ecuația acesteia;  $CL_{50}$  și CMI.

Calcularea Factorului de Rezistență (FR) reprezintă o modalitate de cuantificare a rezistenței unei populații de paraziți la o substanță antihelmintică. Pentru interpretarea datelor de la cele două teste (EHA și LDA) a fost nevoie de identificarea unor populații de ecvine care nu au beneficiat niciodată de tratamente antihelmintice, mai ales cu derivați PBZ sau BZ. Astfel, factorul de rezistență a fost determinat pe populații de cabaline provenite din Parque Nacional de Peneda Gerês, Portugalia și de la caii sălbatici din rezervația naturală Delta Dunării. În ambele situații FR a fost egal cu 1. Datorită faptului că în aceste efective de cabaline nu s-au efectuat tratamente antihelmintice, CMI și CL<sub>50</sub> obținute la albendazol (ABZ), mebendazol (MBZ) și fenbendazol (FBZ), le-am considerat valori de referință.

Totodată a fost necesară verificarea compatibilității și concordanței între metodele biologice și matematice de depistare a chimiorezistenței. Testele au fost realizate în perioada octombrie 2007-octombrie 2008, în 22 de localități din 12 județe ale României, efectivul de ecvine luat în studiu fiind de 3383 subiecți, aceștia provenind din sisteme de creștere intensivă, extensivă și grădini zoologice. Studiul a reliefat o situație destul de gravă și stringentă a chimiorezistenței strongililor de la ecvine la derivații BZ. Din cele 22 de efective de cabaline studiate în România, în 54,56% din cazuri a fost identificată rezistența strongililor la ABZ, MBZ și FBZ. Corelația între modelul biologic și matematic a fost de 50%.

În scopul determinării și cuantificării rezistenței parazitare a strongililor de la cabaline, în perioada noiembrie 2007-august 2008 am realizat teste *in vitro* cu antihelmintice din grupa BZ, lactonelor macrolitice și a tetrahidropirimidinelor. Rezultatele au evidențiat eficacitatea pirantelului și ivermectinei, în timp ce la FBZ testele au indicat susceptibilitatea rezistenței helminților.

Capitolul 1.4. Sunt prezentate studiile de farmacodinamie realizate cu scopul de a evalua prezența rezistenței endoparaziților și ectoparaziților la medicația specifică. Sunt prezentate studii realizate pe endoparazitoze digestive la ecvine, câini, ovine și suine, precum și pe ectoparaziți de la câini și pisici. Un studiu distinct, a avut ca obiectiv evaluarea efectului a șase produse dezinfectante utilizate în mod obișnuit în canine, clinici veterinare și ca produse de curățare pentru gospodărie asupra embriogenezei și viabilității ouălor de *T. canis*.

Capitolul 2. În acest capitol au fost realizate studii referitoare la posibilele alternativele fitoterapeutice în parazitoze la animale.

Capitolul 2.1. Prezintă metodele de extracție a principiilor active din plante cu potențial antiparazitar.

Capitolul 2.2. Prezintă datele obținute în urma evaluării eficacității terapeutice a extractelor hidroalcoolice și apoase în parazitozele de la cabaline, măgari și câini.

În cazul strongililor digestivi de la cabaline, au fost testate pe ouăle de strongili, 6 extracte din plante și o combinație de 7 plante regăsită ca produs comercial în fitofarmacii. Testul EHA a scos în evidență eficacitatea cea mai ridicată în cazul decoctului din cătină (*Hippophae rhamnoides*), a soluției hidroalcoolice din cimbru (*Satureja hortensis*) și pelin (*Artemisia absinthium*). În cazul testului LDA, prelungirea duratei de contact dintre principiile active din plante și ouăle de strongili nu a îmbunătățit considerabil eficacitatea plantelor testate.

Studiul privind eficacitatea antihelmintică a extractelor apoase din plante s-a desfășurat în perioada octombrie 2019 – ianuarie 2020 pe ouă de strongili provenite de la 17 măgari. Scopul a fost de a testa efectul antihelmintic a șase plante medicinale utilizate pe larg

în medicina tradițională a României pentru tratamentul infecțiilor parazitare atât la om cât și la animalele domestice. Rezultatele obținute au demonstrat că extractul apos de *I. helenium*, urmat în ordine descrescătoare de *A. absinthium*, *G. asclepiadea*, *T. vulgare* și *A. millefolium*, posedă o acțiune antihelmintică puternică împotriva nematodelor gastrointestinale de la măgari. În urma testelor EHA și LDA a fost observat că extractele apoase de plante au manifestat o activitate larvicidă și ovicidă puternică la concentrații cuprinse între 125 și 1.95 mg/mL.

Un alt obiectiv al studiilor realizate cu extracte fitoterapeutice a fost de a determina efectul acestora *in vitro* pe ouă și larve de *Ancylostomidae* și *Strongyloididae* provenite din fecale de la câini. Astfel, au fost testate 4 extracte hidroalcoolice, eficacitatea determinată prin testul EHA fiind obținută la extractul de *Satureja hortensis*, iar prin testul LDA la *Ocimum basilicum*.

Capitolul 2.3. Studiile prezintă rezultatele obținute în anul 2009 privind profilaxia strongilidozelor la ecvine prin tratamentul pășunilor cu 4 extracte vegetale. Eficacitatea cea mai ridicată asupra ouălor și larvelor de strongili a fost înregistrată în cazul extractului de cătină unde numărul de larve a fost cel mai redus (20 larve/kg de iarbă). Într-un studiu similar din 2010 au fost testate 8 extracte din plante individuale și a unei combinații de 7 plante diferite. Corelând rezultatele de laborator cu cele obținute pe parcelele de teren, se poate concluziona că decoctul *Inula helenium* (iarbă mare) poate constitui o modalitate de decontaminare nepoluantă a pășunilor infestate cu strongili.

Cea de-a treia parte a tezei prezintă planurile de evoluție și dezvoltare științifică, profesională și academică. Planul de dezvoltare a carierei mele științifice are ca prim obiectiv creșterea calității științifice, vizibilității și recunoașterii naționale și internaționale a cercetărilor proprii. Activitatea mea de cercetare va fi axată pe trei direcții principale: (1) **chimiorezistența** parazită, (2) **fitoterapia** în medicina veterinară, (3) farmacodinamia unor noi substanțe **antagoniste ale opioidelor**. Toate aceste direcții prezintă oportunități semnificative pentru obținerea de rezultate valoroase, extinderea echipei de cercetare, care va implica studenți și doctoranzi, prin accesarea de proiecte naționale/internaționale pentru susținerea cercetărilor. Pentru viitor îmi propun o corelare susținută a activităților de cercetare aplicativă cu cele educaționale, cu scopul de a dezvolta noi noi concepte și soluții în medicina veterinară.

## Abstract

The scientific research activity presented in the habilitation thesis refers to the most important results obtained between 2006-2020, being described the significant results presented in 3 papers published in ISI indexed journals, 19 papers published in IDB indexed journals (as first author) and 4 research projects funded by UEFISCDI and partners from the Romanian pharmaceutical industry.

After the PhD graduation, the main research directions were: evaluation of parasite resistance through *in vivo* and *in vitro* pharmacodynamics studies, respectively phytotherapeutic alternatives in parasitic diseases.

The habilitation thesis is structured in three parts, the first part is a brief presentation of my professional formation, the second part includes a selection of the most relevant research directions, and the third part represents the scientific, professional and academic development plan.

The second part of the thesis is structured in two major chapters that include the main research directions.

Chapter 1. This chapter presents the *in vitro* and *in vivo* methods for detection of parasite resistance, as well as the results obtained in the research project PNII Idei 2007. The main objective of this project was to implement biomathematic models for monitoring and predicting the digestive strongyls resistance, as well as therapeutic alternatives without a polluting component.

Subchapter 1.1. The main methods and tests for detecting parasites resistance to specific medication are presented and analysed, as each of these has a certain degree of sensitivity, feasibility and cost-effectiveness.

Subchapter 1.2. The studies aimed at the comparative analysis of the sensitivity and specificity of the main methods and tests to investigate the resistance of digestive helminths in horses. Following 540 determinations, was revealed that applying the Stoll method for quantifying infesting larvae, the sensitivity and specificity of this test was 100%. In comparison, by the McMaster method the sensitivity was 85.82%, and by clinical diagnosis only 10.86%.

Subchapter 1.3. Another objective was to establish the functional parameters of the mathematical deterministic model for *in vitro* evaluation of parasites resistance, through the egg hatch assay (EHA) and the larval development assay (LDA). For the accuracy, correlation and correct interpretation of the obtained data, the original software was used - Anthelminitic Resistance Program (APR), specially designed for such determinations. The research undertaken to validate the software aimed to determine the therapeutic efficacy of benzimidazole derivatives (BZ) and macrocyclic lactones, against digestive strongyls from a group of 60 horses, through the *in vitro* tests EHA and LDA. Statistical interpretation of the data was performed using the mathematical model for assessing resistance designed so that it can determine the following indicators: the percentage of hatching at the reference concentration or larval development; prediction line and its equation;  $LC_{50}$  and MIC.

Calculating the Resistance Factor (FR) is a way to quantify the resistance of a parasites population to an anthelmintic substance. In order to interpret the data from the EHA

and LDA tests, it was necessary to identify equine populations that have never benefited from anthelmintic treatments, especially with probenzimidazole or BZ derivatives. Thus, the resistance factor was determined on horse populations from the Parque Nacional de Peneda Gerês, Portugal and from wild horses in the Danube Delta nature reserve. In both cases, the FR was equal to 1. Because in these herds of horses no anthelmintic treatments were performed, obtained MICs and LC<sub>50</sub> from albendazole (ABZ), mebendazole (MBZ) and fenbendazole (FBZ), we considered them as reference values.

At the same time, it was necessary to verify the compatibility and concordance between the biological and mathematical methods for detecting parasites resistance. The tests were performed between October 2007 and October 2008, in 22 localities from 12 counties of Romania, on a number of 3383 equines, coming from intensive / extensive breeding systems and zoos. The study revealed a rather serious and stringent situation of resistance of strongyls from equines to BZ derivatives. Out of the 22 herds of horses studied in Romania, in 54.56% of cases was identified the resistance of strongyls to ABZ, MBZ and FBZ. The correlation between the biological and mathematical model was 50%. The correlation between the biological and mathematical model was 50%.

In order to determine and quantify the parasitic resistance of strongyls in horses, between November 2007 and August 2008 we performed *in vitro* tests with anthelmintic from the BZ group, macrocyclic lactones and tetrahydropyrimidines. The results showed the efficacy of pirantel and ivermectin, while in FBZ tests indicated the susceptibility of helminth resistance.

Subchapter 1.4. It is dedicated to pharmacodynamic studies performed in order to evaluate the presence of endoparasites and ectoparasites resistance to specific medication. Studies on equines, dogs, sheep and pigs digestive endoparasites, as well as on dogs and cats ectoparasites are presented. A separate study aimed to evaluate the effect of six disinfectant products commonly used in kennels, veterinary clinics and as household cleaning products on the embryogenesis and viability of *Toxocara canis* eggs.

Chapter 2. This chapter is dedicated to studies conducted to identify possible phytotherapeutic alternatives in animal parasitic diseases.

Subchapter 2.1. It presents the methods of the active principles extraction from plants with antiparasitic potential.

Subchapter 2.2. It presents the data obtained following the evaluation of the therapeutic efficacy of hydroalcoholic and aqueous extracts in parasites from horses, donkeys and dogs.

In the digestive strongylidosis of horses, 6 plant extracts and a combination of 7 plants found as a commercial product in phytopharmacies were tested on strongili eggs. The EHA test showed the highest efficacy in the case of sea buckthorn decoction (*Hippophae rhamnoides*), hydroalcoholic solution of thyme (*Satureja hortensis*) and wormwood (*Artemisia absinthium*). In the case of the LDA test, prolonging the contact time between the active ingredients from plants and the strongyl eggs did not significantly improve the efficacy of the tested plants.

The study on the anthelmintic efficacy of aqueous plant extracts was performed between October 2019 and January 2020 on strongyl eggs from 17 donkeys. The aim was to test the anthelmintic effect of six medicinal plants widely used in traditional Romanian

medicine for the treatment of parasitic infections in both humans and domestic animals. The obtained results showed that the aqueous extract of *Inula helenium*, followed in descending order by *Artemisia absinthium*, *Gentiana asclepiadea*, *Tanacetum vulgare* and *Achillea millefolium*, possesses a strong anthelmintic action against gastrointestinal nematodes from donkeys. Following the EHA and LDA tests, it was observed that the aqueous plant extracts showed a strong larvicidal and ovicidal activity at concentrations between 125 and 1.95 mg / mL.

Another goal of studies with phytotherapeutic extracts was to determine *in vitro* effect on eggs and larvae of *Ancylostomidae* and *Strongyloididae* isolated from dog faecal samples. For this study, 4 hydroalcoholic extracts were tested, the efficacy determined by the EHA test being obtained for the *Satureja hortensis* extract, and by the LDA test for *Ocimum basilicum*.

Subchapter 2.3. The studies present the results obtained in 2009 on the prophylaxis of equines strongylidosis by the treatment of pastures with 4 plant extracts. The highest efficacy on strongyl eggs and larvae was recorded in the case of *Hippophae rhamnoides* (sea buckthorn) extract where the number of larvae was lowest (20 larva / kg of grass). In a similar study conducted in 2010, 8 extracts of individual plants and a combination of 7 different plants were tested. Correlating the laboratory results with those obtained on the plots of land, it can be concluded that the decoction of *Inula helenium* (large grass) can be a way of non-polluting decontamination of pastures infested with horse strongyls.

The third part of the thesis presents the plans for the scientific, professional and academic development. The plan for the development of my scientific career has as its first objective to increase the scientific quality, visibility and national and international recognition of my own research. My research activity will be focus on three main directions: (1) **parasitic resistance**, (2) **phytotherapy** in veterinary medicine, (3) pharmacodynamics of new **opioid antagonists**. All these directions present significant opportunities for obtaining valuable results, expanding the research team, which will involve students and doctoral students, by accessing national / international projects to support research. For the future, I propose a sustained correlation of applied research activities with educational ones, in order to develop new concepts and solutions in veterinary medicine.