

TEZA DE DOCTORAT

Epidemiologie, chimioprevenție și terapie în nematodoze gastrointestinale la ovine din Transilvania

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand **Virginia Ana Roman (căs. Magdaș)**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Vasile Cozma**

Membru titular al Academiei de Științe Agricole și Silvicultură "Gheorghe Ionescu-Șișești" București

Membru de onoare al Academiei Oamenilor de Știință din România



REZUMAT

Creșterea cererii globale pentru produse de origine animală a determinat o intensificare a creșterii ovinelor, specii apreciate pentru adaptabilitatea și cerințele reduse de întreținere (Morris, 2009). Cu toate acestea, nematodozele gastrointestinale reprezintă o provocare majoră pentru sectorul ovin, afectând semnificativ sănătatea animalelor și rentabilitatea economică a acestora (Quadros și Burke, 2024; Rufino-Moya și colab., 2024). Impactul economic negativ este determinat atât de scăderea producției, cât și de costurile asociate tratamentelor antiparazitare.

Modificările recente în epidemiologia paraziților, pe fondul schimbărilor climatice, al intensificării managementului și al utilizării excesive a medicamentelor antiparazitare, au dus la o creștere a rezistenței acestora (Mavrot și colab., 2015; Taylor, 2012). Această rezistență, apărută prin mutații genetice sau adaptări progresive, se dezvoltă de-a lungul anilor în cadrul fermelor (Jackson și Coop, 2000; Menzies și colab., 2010). În România, controlul paraziților se bazează preponderent pe tratamente standardizate, fără evaluare epidemiologică prealabilă, ceea ce contribuie la creșterea presiunii selective (Höglund și Gustafsson, 2023).

Studiile evidențiază că subdozarea și aplicarea necorespunzătoare a tratamentelor conduc la pierderea eficacității moleculelor antiparazitare (Kenyon și Jackson, 2012). Paraziții dezvoltă rezistență la mai multe molecule sintetice, iar strategiile de control bazate exclusiv pe acestea sunt tot mai frecvent contestate (Riviere și colab., 2009). Utilizarea tratamentelor selective, orientate pe indivizi în locul tratării în masă, este recomandată pentru menținerea eficienței terapeutice (Van Wyk, 2001; Cabaret și colab., 2009).

În contextul agriculturii durabile, extractele vegetale apar ca o alternativă promițătoare. Studiile existente susțin eficacitatea unor compuși naturali precum taninurile, terpenoidele și alcaloizii împotriva nematodelor, fără riscurile asociate cu produsele de sinteză (Burke și Miller, 2020). Pe lângă avantajele de ordin economic și ecologic, aceste produse se aliniază cererii tot mai mari pentru soluții bio și agricultură ecologică (Hoste și colab., 2015).

Acest studiu a fost conceput pentru a răspunde unor nevoi stringente din domeniul sanitar-veterinar, având ca obiectiv principal evaluarea situației endoparazitismului la ovinele crescute în sistem extensiv, în regiunea Transilvaniei. Studiul a urmărit identificarea prevalenței și intensității infestațiilor parazitare, evaluarea eficacității unor molecule antihelmintice, precum și determinarea nivelului de rezistență al paraziților la cele mai frecvent utilizate molecule antihelmintice nematodicide.

Teza de doctorat este organizată în două secțiuni principale: prima, intitulată „Stadiul actual al cunoașterii”, oferă o sinteză a literaturii de specialitate, iar cea de-a doua, denumită „Contribuția personală”, prezintă rezultatele cercetărilor experimentale proprii.

Prima parte este structurată în 3 capitole. În **capitolul I.1.** sunt prezentate principalele rase de ovine, atât autohtone cât și importate, crescute în România. Sunt descrise caracteristicile morfo-productive ale raselor tradiționale: Țurcană, Țigaie și Merinos de Palas, precum și ale raselor importate, precum Suffolk, Ile de France, Texel și Friza. **Capitolul I.2.** oferă o descriere detaliată a nematodozelor gastrointestinale ale ovine. Sunt analizate etiologia, morfologia și principalele genuri implicate: *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Bunostomum*, *Oesophagostomum*, *Chabertia*, *Strongyloides* și *Trichuris*. Este detaliată epidemiologia, ciclul biologic, mecanismele de patogenitate, tabloul clinic, metodele de diagnostic și principalele molecule utilizate în tratarea nematodozelor gastrointestinale la ovine. **Capitolul I.3.** este dedicat metodelor de evaluare a rezistenței antihelmintice. Sunt prezentate și analizate principalele tehnici: testul reducerii ouălor din fecale (FECRT), testul de dezvoltare larvară (LDA), testul de embrionare a ouălor (EHA), testul de paralizie larvară (LPA) și tehnicile moleculare (PCR).

Partea a doua cuprinde cercetările proprii și este structurată în 5 capitole. Capitolul II.1. prezintă un studiu epidemiologic al infecțiilor endoparazitare la ovine din regiunea Transilvaniei. Capitolele II.2. și II.3. cuprind cercetări cu privire la fenomenul de rezistență antiparazitară (teste *in vivo* și *in vitro*). Capitolul II.4. stabilește eficacitatea unor extracte vegetale asupra strongililor digestivi la ovine și ultimul capitol II.5. face o comparație între metoda morfologică și moleculară de identificare a speciilor de strongili.

Capitolul II.1. Studiul a fost conceput ca o investigație epidemiologică comparativă între sezoanele de primăvară și toamnă, pentru a evidenția eventualele variații în prevalența și intensitatea infecțiilor endoparazitare la ovine. În total, au fost colectate și analizate 1304 probe de fecale, recoltate individual de la nivelul rectului, câte 652 în fiecare sezon, provenind din 20 de turme de ovine din județele Cluj, Sălaj și Mureș. Prin utilizarea unor metode cantitative și calitative de diagnostic (flotație, sedimentare, tehnica Baermann și metoda McMaster), studiul a urmărit corelarea sezonului cu intensitatea eliminării formațiunilor parazitare, oferind o imagine complexă asupra dinamicii infecțiilor parazitare în sistemul extensiv de creștere a ovinelor din Transilvania.

Rezultatele au evidențiat o prevalență totală extrem de ridicată a infecțiilor parazitare (95,70%), majoritatea probelor fiind caracterizate prin infecții polispecifice. Dintre agenții etiologici identificați, strongilii digestivi au avut prevalența cea mai ridicată, 77,1%, fiind urmați de coccidiile din genul *Eimeria* (65,66%) și *Strongyloides papillosus* (15,49%). Prevalențe mai reduse au fost evidențiate pentru *Dicrocoelium dendriticum* (12,31%), *Moniezia* spp. (7,58%), *Dictyocaulus filaria* (5,67%), *Muellerius capillaris* (4,14%), *Protostrongylus rufescens* (3,13%) și *Trichuris ovis* (1,81%).

Analiza sezonieră a arătat diferențe semnificative, în special în ceea ce privește prevalența și intensitatea infecțiilor cu strongili digestivi, care au atins valori maxime în perioada de primăvară.

Totodată, în cadrul studiului a fost folosit un chestionar, adresat medicilor veterinari responsabili de turmele investigate, în vederea identificării substanțelor antiparazitare utilizate la ultimele deparazitări; datele obținute au evidențiat o frecvență ridicată a utilizării benzimidazolilor [în special albendazol (40%)], urmați de ivermectină (15%), combinația ivermectină+clorsulon (15%), levamisol (12,5%), oxiclozanid (12,5%) și fenbendazol (5%), subliniind totodată lipsa rotației moleculelor în majoritatea efectivelor.

Capitolul II.2 al lucrării prezintă un studiu *in vivo* realizat în județul Cluj, pe ovine din cinci turme crescute în sistem extensiv, având ca obiectiv evaluarea eficacității unor molecule antihelmintice de sinteză utilizate frecvent în România. Studiul a urmărit testarea a cinci substanțe active (albendazol, fenbendazol, levamisol, doramectină și eprinomectină), precum și a două combinații ale acestora (doramectină+albendazol și doramectină+levamisol). Pentru evaluarea eficacității acestor tratamente s-a aplicat testul de reducere a numărului de ouă din fecale (FECRT), pentru fiecare lot fiind alocat un număr de 15 animale. Probele au fost recoltate în zilele 0 și 14 ale experimentului pentru efectuarea examenului Mc Master și stabilirea numărului de ouă per gram de fecale.

Rezultatele au evidențiat o eficacitate foarte ridicată în cazul combinației doramectină+levamisol, care a atins o rată medie de reducere a ouălor din fecale de 99,4%. Levamisolul administrat individual a avut, de asemenea, o eficacitate medie de 95,6 %. În schimb, lactonele macrociclice [doramectină (76,2%), eprinomectină (69%)] și benzimidazolii [(albendazol (57,8%), fenbendazol (62,6%)] au prezentat o eficacitate redusă, sugerând un grad ridicat de rezistență în rândul strongililor gastrointestinali de la ovine.

Identificarea morfologică a larvelor de stadiul 3 înainte și după tratament a permis evaluarea distribuției speciilor de strongili. În urma identificării morfologice a L3 din ziua 0 au fost identificate șapte genuri/specii: *Haemonchus contortus* (26,11%), *Teladorsagia circumcincta* (12,17%), *Trichostrongylus* spp. (21,26%), *Cooperia* spp. (33,03%), *Oesophagostomum* spp. (5,29%), *Chabertia ovina* (0,97%) și *Bunostomum trigonocephalum* (0,58%). Dintre acestea, *H. contortus* a înregistrat cel mai ridicat grad de rezistență, cu o creștere semnificativă a prevalenței post-tratament.

Studiul confirmă existența unei rezistențe larg răspândite a strongililor digestivi la mai multe clase de antihelmintice utilizate curent în România, subliniind necesitatea unor strategii integrate de control și a unei monitorizări continue a eficacității tratamentelor antiparazitare.

Capitolul II.3 cuprinde un studiu *in vitro* realizat pentru a evalua eficacitatea a patru molecule antihelmintice frecvent utilizate în România: albendazol, levamisol, doramectină și eprinomectină asupra strongililor gastrointestinali de la ovine. Cercetarea a fost efectuată în două turme din județul Cluj (T1 și T2), iar testele aplicate au fost testul de embrionare a ouălor (EHA), testul de dezvoltare larvară (LDT) și testul de paralizie larvară (LPA). Aceste metode permit evaluarea eficacității

antihelminticelor într-un timp mai scurt decât testele *in vivo* și sunt utile în detectarea timpurie a rezistenței.

Rezultatele obținute indică un grad semnificativ de rezistență în cazul albendazolului, eficacitatea acestuia fiind sub 50% în cazul T1 și ușor peste 60% în cazul T2, la concentrația discriminatorie, atât în testul EHA cât și în LDT. Rezistența la lactone macrociclice a fost confirmată în T1, unde eficacitatea a fost considerabil mai scăzută comparativ cu T2, unde s-a înregistrat o valoare a eficacității de 100% pentru doramectină și 96,8% pentru eprinomectină. Levamisolul, a demonstrat o eficacitate ridicată (83,4%-89,2% la LDT și 82,4%-94% la LPA), dar insuficientă pentru a exclude rezistența.

Analiza comparativă a eficacității între cele două turme a evidențiat diferențe semnificative statistic, reflectând variabilitatea susceptibilității la tratament. Studiul confirmă existența rezistenței multiple în rândul strongililor digestivi. Rezultatele subliniază necesitatea unei monitorizări continue a eficienței tratamentelor antiparazitare și adaptarea protocoalelor terapeutice în funcție de contextul epidemiologic local.

Capitolul II.4. Scopul acestui studiu a fost evaluarea *in vitro* a eficacității antiparazitare a cinci extracte alcoolice vegetale: *Allium sativum* (usturoi), *Tagetes patula* (crăiță), *Cucurbita pepo* (semințe de dovleac), *Satureja hortensis* (cimbru) și *Artemisia absinthium* (pelin) asupra strongililor gastrointestinali de la ovine, în contextul găsirii unor alternative terapeutice naturale la antihelminticele sintetice, în special pentru utilizarea în fermele ecologice.

Rezultatele au evidențiat faptul că toate extractele testate au prezentat un anumit grad de eficiență antiparazitară, însă cu variații semnificative. Extractul alcoolic din semințe de *C. pepo* a demonstrat cea mai ridicată eficacitate antiparazitară, cu inhibarea completă a embrionării și dezvoltării larvare la concentrații ridicate (50 mg/ml) și menținerea efectului chiar și la cea mai mică concentrație testată (48,8 - 63% la 1,56 mg/ml); valorile reduse ale DL50 (1,63 - 1,64 mg/ml) confirmă eficacitatea sa ridicată. Usturoiul și pelinul au avut, de asemenea, o activitate pronunțată, în timp ce cimbrul și crăița au avut un efect moderat spre scăzut.

Valoarea DL50 a confirmat aceste observații, indicând eficacitatea ridicată a extractelor de *C. pepo* și *A. sativum*. Studiul sugerează că aceste plante, în special semințele de dovleac și usturoiul, pot constitui opțiuni promițătoare în strategiile alternative de control al paraziților, contribuind la reducerea utilizării moleculelor sintetice și a riscului de dezvoltare a rezistenței antihelmintice.

Capitolul II.5. Scopul acestui capitol a fost de a evalua diversitatea speciilor de strongili gastrointestinali prezenți la ovinele din Transilvania, utilizând metode morfologice și moleculare, în vederea îmbunătățirii acurateței diagnosticului și a elaborării unor strategii eficiente de control antiparazitar.

Studiul a inclus 20 de turme de ovine, de la fiecare dintre acestea recoltându-se un număr de probe direct proporțional cu numărul de ovine din efectiv. Din probele de fecale s-au realizat culturi larvare pentru obținerea larvelor de stadiul 3. Larvele

astfel obținute au fost identificate prin metoda morfologică și reacția în lanț a polimerazei (PCR). Prin identificare morfologică au fost identificate 8 specii/genuri de strongili (*H. contortus*, *Trichostrongylus* spp., *C. curticei*, *T. circumcincta*, *Oesophagostomum* spp., *C. ovina*, *Nematodirus* spp. și *B. trigonocephalum*), în timp ce metoda moleculară a evidențiat prezența a 15 specii (*H. contortus*, *T. vitrinus*, *T. colubriformis*, *Oe. venulosum*, *C. ovina*, *C. curticei*, *T. circumcincta*, *O. ostertagi*, *Oe. columbianum*, *T. axei*, *N. fillicolis*, *N. spathiger*, *B. trigonocephalum*, *C. oncophora* și *O. leptospicularis*), demonstrând o sensibilitate superioară. *Haemonchus contortus* a fost cea mai prevalentă specie, detectată în 85% dintre turme, atât prin morfologie cât și prin PCR. Media speciilor identificate per turmă a fost de 3,95 prin morfologie și 5,25 prin PCR. Rezultatele subliniază limitările diagnosticului morfologic și avantajele aduse de metodele moleculare, care permit o identificare rapidă, precisă și cuprinzătoare a infecțiilor mixte, susținând integrarea acestora în practica veterinară curentă pentru o gestionare optimă a strongilidozelor la ovine.

Concluzii generale

- Profilul endoparazitar al ovinelor din rasele Țurcană și Țigaie crescute în sistem extensiv în Transilvania evidențiază o prevalență ridicată a infestațiilor parazitare (95,70%), cu o dominantă clară a infestațiilor polispecifice (86,06%), ceea ce subliniază o expunere constantă și complexă la paraziți gastrointestinali și pulmonari în cadrul acestor sisteme de creștere.
- Cea mai ridicată prevalență s-a înregistrat în cazul strongililor digestivi (77,1%).
- Cea mai bună eficacitate asupra nematodelor gastrointestinale a fost înregistrată de combinația doramectină + levamisol (99,4%), urmată de levamisol (95,6%)
- Prin metoda FECRT a fost evidențiat un nivel ridicat de rezistență la principalele molecule anthelmintice utilizate în tratamentul ovinelor (albendazol, fenbendazol, doramectină și eprinomectină).
- Prezența rezistenței este susținută și de rezultatele obținute la testele *in vitro*, care evidențiază un nivel ridicat de rezistență la albendazol, alături de o rezistență parțială la levamisol și lactone macrociclice.
- Extractele vegetale testate prezintă o eficiență antiparazitară variabilă, influențată semnificativ de compoziția chimică a extractului și tipul compușilor bioactivi.
- Activitatea antiparazitară remarcabilă a extractelor din *Cucurbita pepo* și *Allium sativum* subliniază perspectivele promițătoare ale fitoterapiei în contextul gestionării rezistenței antiparazitare.
- Metoda morfologică a permis identificarea a 8 specii/genuri (*H. contortus*, *Trichostrongylus* spp., *C. curticei*, *T. circumcincta*, *Oesophagostomum* spp., *C. ovina*, *Nematodirus* spp. și *B. trigonocephalum*), metoda PCR a evidențiat 15 specii (*H. contortus*, *T. vitrinus*, *T. colubriformis*, *Oe. venulosum*, *C. ovina*, *C. curticei*, *T. circumcincta*, *O. ostertagi*, *Oe. columbianum*, *T. axei*, *N. fillicolis*, *N. spathiger*, *B. trigonocephalum*, *C. oncophora* și *O. leptospicularis*).
- Media speciilor identificate per turmă a fost de 3,95 la identificarea morfologică și 5,25 la PCR, rezultat care confirmă sensibilitatea superioară a metodei moleculare.

- *Haemonchus contortus* a prezentat cea mai ridicată prevalență în studiul nostru, fiind identificat în 85% dintre turme (17/20), valoare întâlnită în cazul ambelor metode.

BIBIOGRAFIA

1. Burke, J. M., & Miller, J. E. (2020). Sustainable approaches to parasite control in ruminant livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(1), 89–107.
2. Cabaret, J., Benoit, M., Laignel, G., & Nicourt, C. (2009). Current management of farms and internal parasites by conventional and organic meat sheep French farmers and acceptance of targeted selective treatments. *Veterinary Parasitology*, 164, 21–29.
3. Höglund, J., & Gustafsson, K. (2023). Anthelmintic treatment of sheep and the role of parasite refugia in a local context. *Animals*, 13(12), 1960.
4. Hoste, H., Torres-Acosta, J. F., Sandoval-Castro, C. A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S. M., & Terrill, T. H. (2015). Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, 212(1–2), 5–17.
5. Jackson, F., & Coop, R. L. (2000). The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*, 120(Suppl), S95–S107.
6. Kenyon, F., & Jackson, F. (2012). Targeted flock/herd and individual ruminant treatment approaches. *Veterinary Parasitology*, 186, 10–17.
7. Mavrot, F., Hertzberg, H., & Torgerson, P. R. (2015). Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: A systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 8, 557.
8. Menzies, P., Andrew, P., Shakya, K., Avula, J., Fernandez, S., Jones, A., Kelton, D., Mederos, A., Guthrie, A., Falzon, L., de Wolf, B., VanLeeuwen, J., Martin, R., LeBoeuf, A., Corriveau, F., & Jansen, J. (2010). Manuel de lutte contre les parasites internes du mouton. Dept. Population Medicine, Ontario Veterinary College, University of Guelph.
9. Morris, T. (2009). Economics of sheep production. *Small Ruminant Research*, 86(1–3), 59–62.
10. Quadros, D., & Burke, J. (2024). Nutritional strategies for small ruminant gastrointestinal nematode management. *Animal Frontiers*, 14(5), 5–12.
11. Riviere, J. E., & Papich, M. G. (2009). *Veterinary pharmacology and therapeutics* (9th ed., pp. 1051–1145). Wiley-Blackwell.
12. Rufino-Moya, P. J., Zafra Leva, R., Gonçalves Reis, L., Acosta García, I., Ruiz Di Genova, D., Sánchez Gómez, A., & Martínez-Moreno, F. J. (2024). Prevalence of gastrointestinal parasites in small ruminant farms in Southern Spain. *Animals*, 14(11), 1668.
13. Taylor, M. A. (2012). Emerging parasitic diseases of sheep. *Veterinary Parasitology*, 189, 2–7.
14. Van Wyk, J. A. (2001). Refugia – overlooked as perhaps the most important factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of*