

REZUMAT

CERCETĂRI PRIVIND ETIOLOGIA ȘI EPIZOOTOLOGIA PARAMFISTOMOZEI ÎN VESTUL ROMÂNIEI

Prezenta teză conține:

Listă de abrevieri

Rezumatele în limba română și engleză

Studiu bibliografic: 30

Partea de cercetări proprii: 55

Tabele: 8

Figuri: 64

Surse bibliografice: 237

Paramfistomoza este o trematodoză frecvent întâlnită la rumegătoarele domestice și sălbatice având o distribuție largă la nivel global. Reprezintă un subiect de interes în cercetare, datorită prevalenței ridicate observată în ultimii ani, în special la rumegătoarele domestice.

Teza conține o parte introductivă și cercetarea propriu-zis. Aceasta din urmă este alcătuită din:

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

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

Partea intitulată **stadiul actual al cunoașterii** este structurată în **două capitole** care conțin informații din cărți de specialitate și din diverse articole științifice publicate în literatura de specialitate:

- 1. Clasa Trematoda**
- 2. Caracteristici generale ale paramfistomozei la rumegătoare**

Primul capitol începe cu un scurt istoric al trematodelor la animale și continuă cu prezentarea unor date etiologice.

În unul din subcapitole sunt prezentate detalii legate de încadrarea taxonomică, dar și despre morfologia externă, respectiv morfologia internă (sistemul muscular, sistemul nervos, sistemul excretor, sistemul digestiv și sistemul reproducător) a trematodelor adulte.

În cel de-al doilea subcapitol sunt descrise caracteristicile morfologice ale formelor larvare și juvenile (ou, miracidiu, sporocist, redii, cercari și metacercari) ale trematodelor.

Al doilea capitol oferă informații despre caracteristicile generale ale paramfistomozei la rumegătoare.

În primul subcapitol sunt prezentate detalii morfologice caracteristice fiecărei specii și etapele ciclului biologic.

Ultimele subcapitole oferă câteva date epidemiologice, astfel, sunt detaliați factorii implicați în apariția acestor trematodoze (sursele de infestație, căile de infestație, rezistența în mediu, longevitatea parazitului și implicarea gazdelor intermediare), oferă informații despre metodele de diagnostic care sunt folosite pentru a stabili prezența parazitului și descriu controlul terapeutic, în care sunt prezentate principalele substanțe antiparazitare utilizate până în prezent în domeniul parazitologiei veterinare. Deasemenea, sunt prezentate metodele de profilaxie și combatere.

Cercetările proprii au fost cuprinse în cinci capitole:

3. Descrierea geografică a zonelor de proveniență a probelor
4. Prevalența infestațiilor cu paraziți gastrointestinali la bovine și ovine în două regiuni din vestul României
5. Identificarea moleculară a speciilor de trematode din familia *Paramphistomidae* colectate de la bovine, ovine și rumegătoare sălbatice (*Capreolus capreolus*) în diferite locații din județele Timiș, Arad, Bihor și Hunedoara
6. Investigații electrono-microscopice asupra morfologiei trematodului *Paramphistomum (Calicophoron) daubneyi*
7. Studiu privind rolul de gazdă intermediară pentru *Calicophoron daubneyi* al unor melci acvatici din vestul României

Fiecare capitol este structurat în patru subcapitole:

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

În **capitolul trei** sunt descrise cele cinci județe din vestul României (Timiș, Arad, Bihor, Caraș-Severin și Hunedoara) supuse studiului. S-au colectat date despre localizarea geografică, climă, rețeaua hidrografică și vegetația fiecărui județ luat în studiu, care pot influența, în mod pozitiv sau negativ parazitismul atât la rumegătoarele domestice, cât și la cele sălbatice.

Județul Timiș este situat în partea de vest a României și este considerat cel mai mare județ al țării, având o suprafață de 8698,7 km², ocupând astfel 3,6% din suprafața țării. Teritoriul județului Timiș include toate formele de relief, iar rețeaua hidrografică este formată din cursurile mai multor râuri, dar și de un număr mare de lacuri naturale și lacuri de acumulare.

Județul Arad este, deasemenea, situat în partea vestică a țării, ocupând locul șase ca suprafață în țară (7754 km²).

Județul Bihor este situat în nord-vestul României, fiind așezat pe cursurile râurilor Crișul Negru și Crișul Repede. Suprafața județului este de aproximativ 7544 km². Teritoriul include toate formele de relief, ocupând astfel 3% din suprafața totală a țării.

Județul Caraș-Severin se întinde pe o suprafață de 8520 km² (ocupând 3,57% din suprafața țării) fiind situat în sud-vestul țării. Județul cuprinde toate tipurile de relief, predominant fiind cel muntos, ocupând astfel aproximativ 65% din teritoriul județului.

Ultimul județ supus studiului este Hunedoara. Acesta este situat în partea central-vestică a României, ocupând 2,96% din suprafața totală a țării (7063 km²). Teritoriul județului este cuprins între zona de câmpie și zona montană, fiind alcătuit din numeroase lacuri glaciare și lacuri antropice.

Cel de-al patrulea capitol oferă informații despre prevalența paraziților gastrointestinali la bovine și ovine din vestul României. Se cunoaște faptul că infestațiile parazitare de la nivelul tractului digestiv adesea determină scăderea producțiilor la animalele din întreaga lume. Astfel, pentru a preveni infestațiile parazitare, este necesară realizarea unui examen coproparazitologic de cel puțin 2 ori pe an, prin metode coprologice descrise succint în prezentul capitol (metoda Willis și metoda sedimentării).

Scopul acestui studiu a fost acela de a evalua apariția și importanța epidemiologică a helminților și protozoarelor gastrointestinale la efectivele de bovine și ovine din două mari regiuni (Banat și Crișana) din vestul României.

Astfel, în perioada 2017 – 2018 au fost examinate 788 probe de fecale: 303 probe de fecale de la bovine și 485 probe de fecale de la ovine. Animalele luate în studiu au provenit din gospodării private, dar și din ferme. Au fost

incluse în studiu 5 rase de bovine (Holstein Friză, Simmental, Limousin, Albastru Belgian și Bălțată Românească) și o singură rasă de ovine (Țurcană). Deasemenea, animalele au aparținut mai multor categorii de vârstă: ≤ 2 ani, 2 – 8 ani și > 8 ani.

Rezultatele obținute au evidențiat o prevalență totală a paraziților gastrointestinali de 86,1% la bovine și 92,6% la ovine.

Speciile parazitare identificate la bovine au fost: *Eimeria* spp. (24,1%, 95% CI = 19,5 – 29,4), *Balantidium coli* (10,2%, 95% CI = 7,2 – 14,3), *Fasciola/Paramphistomum* spp. (55,8%, 95% CI = 50 – 61,4), *Dicrocoelium lanceolatum* (14,2%, 95% CI = 10,6 – 18,8), *Toxocara* spp. (0,3%, 95% CI = 0,2 – 2,1) și strongili digestivi (46,9%, 95% CI = 81,6 – 89,7).

A fost prezent și poliparazitismul în ambele zone luate în studiu.

Cele mai multe cazuri pozitive cu *Fasciola/Paramphistomum* spp. au fost observate la bovinele care trăiesc în Banat (72,1%), față de 49,3% în Crișana. În schimb, prevalența strongililor digestivi a fost mai mare în Crișana, comparativ cu Banatul, cea mai mare prevalență fiind observată la bovinele cu vârsta > 8 ani, comparativ cu bovinele cu vârsta ≤ 2 ani sau cu vârsta cuprinsă între 2 și 8 ani.

Speciile parazitare identificate la ovine au fost: *Eimeria* spp. (43,7%, 95% CI = 39,3 – 48,3), *Balantidium coli* (1%, 95% CI = 0,4 – 2,5), *Fasciola/Paramphistomum* spp. (75%, 95% CI = 71 – 78,8), *Dicrocoelium lanceolatum* (32%, 95% CI = 27,9 – 36,3), *Moniezia* spp. (3,5%, 95% CI = 2,1 – 3,7), *Nematodirus* spp. (24,5%, 95% CI = 20,8 – 28,7) și alte specii de strongili digestivi (71,3%, 95% CI = 67,1 – 75,3).

Desemenea, și la ovine a fost constatat poliparazitismul, atât în Banat, cât și în Crișana. Categoria de vârstă cea mai predispusă la poliparazitism a fost cuprinsă între 2 și 8 ani.

Cele mai multe cazuri pozitive cu *Eimeria* spp., *Dicrocoelium lanceolatum*, *Nematodirus* spp. și alți strongili digestivi la ovine au fost observate în Banat, comparativ cu Crișana, spre deosebire de *Fasciola/Paramphistomum* spp. care a avut o prevalență mai mare în Crișana, în comparație cu Banatul. Astfel, prevalența *Eimeria* spp. a fost mai mare la ovinele cu vârsta ≤ 2 ani, spre deosebire de celelalte două categorii de vârstă, iar procentul de ovine infestate cu strongili digestivi a fost semnificativ mai mare la categoria de vârstă cuprinsă între 2 și 8 ani, comparativ cu vârsta ≤ 2 ani și grupul de vârstă > 8 ani.

În **capitolul cinci** au fost puse în evidență speciile de trematode din familia *Paramphistomidae* ce infestază atât rumegătoarele domestice, cât și pe cele sălbatice din zona de vest a României, utilizând PCR-ul clasic.

Astfel, în perioada 2019 – 2020 au fost prelevate 679 de prestomace, de la bovine și ovine din județele Timiș, Arad, Hunedoara și Bihor. Probele au provenit din gospodăriile populației (71 de prestomace de la bovine și ovine) și din abatoare (608 de prestomace de la ovine).

Tot în perioada 2019 – 2020 au fost colectate 52 de prestomace de la căprioare. Probele au provenit din 14 fonduri de vânătoare din județele Timiș (33 de prestomace) și Arad (19 prestomace).

Amplificarea propriu – zisă s-a realizat prin PCR clasic, după tehnica descrisă de Lotfy și colaboratorii în 2010, cu ajutorul kitului BIOLINE® pentru țesuturi și s-a bazat pe crearea mai multor copii a unei secvențe a genei 5.8S de mărimea a ~ 403 bp pentru *Calicophoron daubneyi*, respectiv de mărimea a ~ 350 bp pentru *Paramphistomum leydeni*.

Primerii utilizați au fost:

- GA1 (forward 5'-AGA ACA TCG ACA TCT TGA AC-3')
- BD2 (reverse 5'-TAT GCT TAA ATT CAG CGG GT3').

Prevalența generală a trematodelor din familia *Paramphistomidae*, provenite din gospodăriile populației, obținută prin necropsie a fost de 28,57% (2/7) pentru probele provenite de la bovine și 57,81% (37/64) pentru probele colectate de la ovine; iar prevalența generală a trematodelor provenite de la prestomacele ovinelor colectate din abatoare a fost de:

- ✓ 40,51% (64/158) în Timiș;
- ✓ 20,33% (61/300) în Arad;
- ✓ 8% (12/150) în Hunedoara.

Deasemenea, prevalența generală a trematodelor, provenite din fondurile de vânătoare, de la căprioare a fost de 7,69% (4/52).

Toate probele provenite de la rumegătoare domestice au fost procesate cu succes prin metoda PCR. În toate probele fiind identificată specia *Calicophoron daubneyi* (secvența OM913616.1), asemănătoare cu alte secvențe depuse în GenBank: KP201674.1, AY790883.1, AB973394.1, KT182096.1, etc.

În ceea ce privește probele provenite de la căprioare (4 probe), acestea au fost procesate cu succes prin PCR-ul clasic. În trei probe a fost identificată specia *Calicophoron daubneyi*, fiind asemănătoare cu secvențele KP201674.1, AY790883.1, AB973394.1, KT182100.1 depuse în GenBank, iar o probă a fost pozitivă pentru *Paramphistomum leydeni* (secvența OM953778.1), aceasta fiind asemănătoare cu următoarele secvențe depuse în GenBank: KJ995531.1, KJ995529.1, AB973398.1, HM209064.1, etc.

În **capitolul șase** au fost aprofundate caracteristicile morfologice ale tegumentului adulților de *Paramphistomum (Calicophoron) daubneyi* cu ajutorul microscopiei electronice.

În studiu au fost colectate 938 de prestomace (85 prestomace provenite de bovine și ovine din gospodăriile populației și 853 de prestomace colectate de la ovine sacrificate în abator) din județele Timiș, Arad, Bihor și Hunedoara.

Din totalul probelor colectate, 193 au fost infestate cu *Calicophoron daubneyi*, ceea ce reprezintă o prevalență de 20,58%.

După colectare, paramfistomii au trecut prin mai multe etape de spălare, fixare, colorare și curățare, apoi au fost identificați pe baza caracteristicilor morfologice.

După ce au fost identificați pe baza caracteristicilor morfologice, paramfistomii au fost acoperiți cu aur cu ajutorul aparatului Quorum SC7620 Sputter Coater, după care au fost examinați cu ajutorul microscopului Hitachi TM3000 Tabletop.

Suprafața ventrală a tegumentului, atât în regiunea anterioară, cât și în regiunea posterioară este lipsită de spini, dar prezintă numeroase falduri majore și microfalduri, pe care există două tipuri de papile, ce au rol de receptori senzoriali. Papilele mai pot fi observate pe suprafețele anterioare, laterale și mediale, dar și în interiorul faringelui și în canalul genital.

Suprafața dorsală a tegumentului prezintă caracteristici similare cu cele ale suprafeței ventrale. Suprafața prezintă pliuri și caneluri, deasemenea este lipsită de spini, iar papilele sunt într-un număr mai mic, spre deosebire de suprafața ventrală.

În **capitolul șapte** au fost identificate speciile de melci acvatici pe baza caracteristicilor morfologice și au fost identificate formele juvenile ale trematodului *Calicophoron daubneyi*, din melci acvatici, prin metoda PCR. Astfel, studiul a fost efectuat în anul 2020, în 10 locații diferite din județele Timiș (Leucușești, Cliciova, Coșteiu, Fârdea), Hunedoara (Roșcani, Dobra, Ilia) și Caraș-Severin (Obreja, Glimboca, Oțelul Roșu).

Au fost colectați 235 de melci acvatici, 132 din județul Timiș, 79 din județul Caraș-Severin și 24 din județul Hunedoara.

În urma investigațiilor realizate asupra morfologiei melcilor, s-a constatat că aceștia fac parte din:

- familia *Lymneidae*, speciile:
 - *Galba truncatula*;
 - *Stagnicola palustris*
- familia *Planorbidae*, specia:
 - *Planorbis corneus*.

Din cei 132 de melci acvatici colectați din județul Timiș:

- 56 (42,42%) au fost identificați ca fiind *Galba truncatula*;
- 37 (28,03%) au fost reprezentați de *Stagnicola palustris*;
- 39 de melci (29,55%) au aparținut speciei *Planorbis corneus*.

Din județul Caraș-Severin au fost recoltați un număr de 79 de melci acvatici, din care:

- 35 (44,30%) au fost reprezentați de specia *Galba truncatula*;
- 11 (13,92%) au fost identificați ca fiind *Stagnicola palustris*;
- 33 (41,77%) au aparținut familiei *Planorbidae*.

În județul Hunedoara au fost colectați 24 de melci, aparținând în proporție de 100% speciei *Galba truncatula*.

După ce au fost identificate speciile de melci acvatici, aceștia au fost ținuți la temperatura laboratorului în vederea eliberării posibilităților cercari în apă. Cercarii au fost recoltați și au fost supuși analizelor moleculare în vederea identificării ADN-ului parazitar.

Amplificarea propriu - zisă s-a realizat prin PCR clasic, iar primerii utilizați au fost:

- ❖ GA1 (forward 5'-AGA ACA TCG ACA TCT TGA AC-3');
- ❖ BD2 (reverse 5'-TAT GCT TAA ATT CAG CGG GT3').

Din totalul de 235 de melci recoltați, 165 au fost pozitivi la prezența cercarilor, iar dintre aceștia 93 (39,75%) au prezentat cercari de *Calicophoron daubneyi*.

Din cei 115 melci identificați ca fiind *Galba truncatula*, doar 88 (76,52%) au fost pozitivi cu cercari, dintre aceștia 49 (55,68%) fiind pozitivi pentru *Calicophoron daubneyi*.

Din specia *Stagnicola palustris* au fost colectați 48 de melci, 27 (56,25%) au prezentat cercari, dar numai 20 (24,07%) au fost de *Calicophoron daubneyi*, iar din specia *Planorbis corneus* au fost colectați 72 de melci, 50 (69,44%) au prezentat cercari, dar numai 24 (48%) au fost de *Calicophoron daubneyi*.

Elementele de originalitate ale tezei reies din faptul că aceasta este prima cercetare mai amplă privind parazitismul cu trematode ruminale, la rumegătoarele din vestul României. Deasemenea, prin rezultatele obținute este pusă în evidență situația epidemiologică a acestor trematodoze atât la rumegătoarele domestice, cât și la cele sălbatice.

Un alt aspect important și original al tezei este faptul că sunt prezentate diferențe care pot să apară, în ceea ce privește prevalența, în funcție de specie, de modul de creștere (în gospodăriile oamenilor sau în mediul lor natural), dar și de modul în care sunt îngrijite animalele. Astfel, este reprezentată importanța metodelor de profilaxie ce trebuie aplicate în mod regulat pentru a reduce posibilitatea infestării.

Totodată, în prezenta teză au fost identificate pentru prima dată, în vestul României, speciile *Calicophoron daubneyi* și *Paramphistomum leydeni*.

SUMMARY

RESEARCH ON THE ETIOLOGY AND EPIZOOTIOLOGY OF PARAMPHISTOMIASIS IN WESTERN ROMANIA

The present thesis consists of:

List of abbreviations

Summary in English and Romanian

Bibliographic research: 30

Personal research section: 55

Tables: 8

Figures: 64

Bibliographic resources: 237

Paramphistomiasis is a disease caused by trematodes, frequently affecting domestic and wild ruminants, with a large, worldwide distribution. It is a subject of interest in the field of research, due to its high prevalence, noticed throughout the past years, especially among domestic ruminants.

The thesis contains an introductory part and the research section. The latter consists of:

- I. Literature review
- II. Personal research.
- III. General conclusions and recommendations
- IV. Elements of originality.

The **Introduction** presents the motivation behind the choice of the research topic, the importance and timeliness of the chosen topic, a brief presentation of the content and the scientific objectives of the proposed research..

The part entitled **Literature review** is structured into **two chapters** containing information from books and various scientific articles published in the literature::

- 1. The Trematoda Class**
- 2. General characteristics of paramphistomiasis in ruminants**

The first chapter begins with a brief history of trematodes in animals and continues with the presentation of some aetiological data.

In one of the sub-chapters, details are given on the taxonomic classification, but also on the external and internal morphology (muscular system, nervous system, excretory system, digestive system and reproductive system) of adult trematodes.

The second subchapter describes the morphological characteristics of the larval and juvenile forms (egg, miracidia, sporocysts, redia, cercariae and metacercariae) of trematodes.

The second chapter provides information on the general characteristics of paramphistomiasis in ruminants.

Morphological details characteristic to each species and life cycle stages are presented in the first subchapter.

The last subchapters provide some epidemiological data, thus, detailing the factors involved in the occurrence of these diseases caused by trematodes (sources of infestation, routes of infestation, environmental resistance, longevity of the parasite and involvement of intermediate hosts), provide information on the diagnostic methods that are used to establish the presence of the parasite and describe the therapeutic control, presenting the main antiparasitic substances used to date in the field of veterinary parasitology. Methods of prophylaxis and control are also presented.

The Personal Research section comprises **five chapters**:

1. **Geographical description of the origin areas of the samples**
2. **Prevalence of gastrointestinal parasite infestations in cattle and sheep in two regions from western Romania**
3. **Molecular identification of trematode species belonging to the *Paramphistomidae* family collected from cattle, sheep and wild ruminants (*Capreolus capreolus*) from different locations in Timis, Arad, Bihor and Hunedoara counties.**
4. **Electronmicroscopic investigations on the morphology of the *Paramphistomum (Calicophoron) daubneyi* trematode**
5. **Study on the role of aquatic snails from western Romania as intermediate host for *Calicophoron daubneyi***

Each chapter is divided into 4 sub-chapters:

- Aim and objectives
- Materials and methods
- Results and discussions
- Conclusions

Chapter three describes the five studied counties from western Romania (Timiș, Arad, Bihor, Caraș-Severin and Hunedoara). Data which may positively or negatively influence parasitism in both domestic and wild ruminants such as the geographical location, climate, hydrographic network and vegetation of each studied county were collected..

Timis county is located in the western part of Romania and is considered the largest county in the country, with an area of 8698.7 km², thus occupying 3.6% of the country's surface. The territory of Timiș County includes all types of landforms and the hydrographic network is formed by the courses of several rivers, as well as by a large number of natural lakes and reservoirs.

Arad county is also located in the western part of the country, ranking sixth in terms of surface area (7754 km²).

Bihor County is located in north-western Romania on the rivers Crișul Negru and Crișul Repede. The area of the county covers approximately 7544 km². The territory includes all landforms, thus occupying 3% of the total area of the country.

Caraș-Severin county covers an area of 8520 km² (occupying 3.57% of the country's surface) and is located in the south-western part of the country. The county includes all landforms, predominantly mountainous, occupying about 65% of the county territory.

The final surveyed county is Hunedoara. It is located in the central-western part of Romania, occupying 2.96% of the total area of the country (7063 km²). The territory of the county lies between plains and mountains and is made up of numerous glacial lakes and anthropic lakes.

The fourth chapter provides information on the prevalence of gastrointestinal parasites in cattle and sheep from western Romania. It is known that parasitic infestations of the digestive tract often lead to decreased production in animals worldwide. Thus, to prevent parasitic infestations, it is necessary to perform a coproparasitological examination at least twice a year, using the coprological methods briefly described in this chapter (Willis method and sedimentation method).

The aim of this study was to evaluate the occurrence and epidemiological importance of gastrointestinal helminths and protozoa in cattle and sheep herds in two large regions (Banat and Crișana) from western Romania.

Thus, 788 faecal samples were examined in the period 2017 - 2018: 303 faecal samples from cattle and 485 faecal samples from sheep. The animals taken into study came from both private households and farms. Five breeds of cattle (Holstein Friesian, Simmental, Limousin, Belgian Blue and Romanian Balti) and one breed of sheep (Turkish) were included in the study. The animals also belonged to several age categories: ≤ 2 years, 2 - 8 years and > 8 years.

The results showed an overall prevalence of gastrointestinal parasites of 86.1% in cattle and 92.6% in sheep.

The parasitic species identified in sheep were: *Eimeria* spp. (24.1%, 95% CI = 19.5 – 29.4), *Balantidium coli* (10.2%, 95% CI = 7.2 – 14.3), *Fasciola/Paramphistomum* spp. (55.8%, 95% CI = 50 – 61.4), *Dicrocoelium*

lanceolatum (14.2%, 95% CI = 10.6 – 18.8), *Toxocara* spp. (0.3%, 95% CI = 0.2 – 2.1) and digestive strongyles (46.9%, 95% CI = 31.6 – 59.7).

Multiparasitism was encountered in both studies areas.

The most positive cases for *Fasciola/Paramphistomum* spp. were noticed in cattle living in the Banat region (72.1%), compared to 49.3% in Crişana. On the other hand, the prevalence rate of digestive strongyles was higher in Crişana compared to Banat, with a maximum prevalence rate noticed in cattle aged >8 years, compared to cattle aged <2 years or between 2 to 8 years.

The parasitic species identified in sheep were: *Eimeria* spp. (43.7%, 95% CI = 39.3 – 48.3), *Balantidium coli* (1%, 95% CI = 0.4 – 2.5), *Fasciola/Paramphistomum* spp. (75%, 95% CI = 71 – 78.8), *Dicrocoelium lanceolatum* (32%, 95% CI = 27.9 – 36.3), *Moniezia* spp. (3.5%, 95% CI = 2.1 – 3.7), *Nematodirus* spp. (24.5%, 95% CI = 20.8 – 28.7) and other digestive strongyles (71.3%, 95% CI = 67.1 – 75.3).

Multiparasitism was also found in sheep, both in Banat and in Crişana. The age group most prone to multiparasitism was 2 to 8 years old.

Most positive cases with *Eimeria* spp., *Dicrocoelium lanceolatum*, *Nematodirus* spp. and other digestive strongyles in sheep were observed in Banat compared to Crişana, unlike *Fasciola/Paramphistomum* spp. which had a higher occurrence in Crişana compared to Banat. Thus, the prevalence of *Eimeria* spp. was higher in sheep aged ≤ 2 years, as opposed to the other two age categories, and the percentage of sheep infested with digestive strongyles was significantly higher in the age category 2-8 years, compared to age ≤ 2 years and age group > 8 years.

In **chapter five**, trematode species of the Paramphistomidae family infesting both domestic and wild ruminants from western Romania were highlighted using classical PCR.

Therefore, between 2019 and 2020, 679 forestomachs were sampled from cattle and sheep in Timis, Arad, Hunedoara and Bihor counties. Samples came from households (71 forestomachs from cattle and sheep) and slaughterhouses (608 forestomachs from sheep).

Fifty-two forestomachs from deer were also collected in 2019-2020. The samples came from 14 hunting grounds in Timiş (33 forestomachs) and Arad (19 forestomachs) counties.

The amplification itself was performed by classic PCR, as described by Lotfy et al. in 2010, using the BIOLINE® tissue kit and was based on the creation of multiple copies of a 5.8S gene sequence of size ~403 bp for *Calicophoron daubneyi* and ~350 bp for *Paramphistomum leydeni*. The utilized primers were:

- GA1 (forward 5'-AGA ACA TCG ACA TCT TGA AC-3')
- BD2 (reverse 5'-TAT GCT TAA ATT CAG CGG GT3').

The overall prevalence rate of trematodes from the *Paramphistomidae* family, coming from animals found in households, and from samples obtained via necropsy was 28.57% (2/7) for samples collected from cattle and 57.81% (37/64) for samples collected from sheep; while the overall prevalence rate of trematodes found in the forestomachs of sheep collected even from the slaughterhouse were:

- ✓ 40.51% (64/158) in Timiş;
- ✓ 20.33% (61/300) in Arad;
- ✓ 8% (12/150) in Hunedoara.

The overall prevalence of trematodes coming from deer found on the hunting grounds, was 7.69% (4/52).

All samples originating from domestic ruminants were successfully processed via PCR. All samples came back positive for the presence of *Calicophoron daubneyi* (sequence OM913616.1), similar to other sequences already deposited in GenBank: KP201674.1, AY790883.1, AB973394.1, KT182096.1, etc.

In the case of wild deer (4 samples), they were successfully processed via classical PCR. The species *Calicophoron daubneyi*, was identified in three samples showing similarity with genes KP201674.1, AY790883.1, AB973394.1, KT182100.1 deposited in GenBank, and on sample was positive for *Paramphistomum leydeni* (sequence OM953778.1), similar to the following sequences deposited in GenBank: KJ995531.1, KJ995529.1, AB973398.1, HM209064.1, etc.

In chapter six the morphological characteristics of the integument of adult *Paramphistomum (Calicophoron) daubneyi* were studied in depth using electron microscopy.

In the study, 938 forestomachs (85 forestomachs from cattle and sheep from households and 853 forestomachs from sheep slaughtered in slaughterhouses) were collected from Timis, Arad, Bihor and Hunedoara counties.

One hundred and thirty-nine of the collected samples were infested with *Calicophoron daubneyi*, representing a prevalence of 20.58%.

After collection, the parasites were put through several stages of washing, fixation, staining and cleaning, followed by morphological identification.

After being identified based on morphological characteristics, the parasites were coated with gold using the Quorum SC7620 Sputter Coater and then examined using the Hitachi TM3000 Tabletop microscope.

The ventral surface of the integument, both in the anterior and posterior regions, is devoid of spines, but shows numerous major folds and micro-folds, on which there are two types of papillae, acting as sensory receptors. Papillae can also be seen on the anterior, lateral and medial surfaces, as well as inside the pharynx and in the genital canal.

The dorsal surface of the tegument has similar characteristics to the ventral surface. The surface has folds and grooves, is also free of spines, and the papillae are fewer in number, unlike the ventral surface.

Chapter seven describes a study based on aquatic snail species which were identified based on morphological characteristics as well as juvenile forms of the trematode *Calicophoron daubneyi* identified from aquatic snails by PCR. The study was carried out in 2020 in 10 different locations in the counties of Timiș (Leucușești, Cliciova, Coșteiu, Fârdea), Hunedoara (Roșcani, Dobra, Ilia) and Caraș-Severin (Obreja, Glimboca, Oțelul Roșu).

A total of 235 aquatic snails were collected, 132 from Timis county, 79 from Caras-Severin county and 24 from Hunedoara county.

Following investigations on snail morphology, we have reached the conclusion that they belonged to the following families:

- *Lymneidae*, species:
 - *Galba truncatula*;
 - *Stagnicola palustris*
- *Planorbidae*, species:
 - *Planorbis corneus*.

Out of 132 water snails collected from Timiș county:

- 56 (42.42%) were identified as *Galba truncatula*;
- 37 (28.03%) were represented by *Stagnicola palustris*;
- 39 snails (29.55%) belonged to the *Planorbis corneus* species

A number of 79 water snails were collected from Caraș-Severin of which:

- 35 (44.30%) were *Galba truncatula*;
- 11 (13.92%) were identified as *Stagnicola palustris*;
- 33 (41.77%) belonged to the *Planorbidae*.

Twenty four snails were collected from Hunedoara county, all of them (100%) being *Galba truncatula*. Once the aquatic snail species were identified, they were kept at laboratory temperature in order to release possible cercariae into the water.

The cercariae were collected and subjected to molecular analysis in order to identify parasitic DNA. The actual amplification was performed by classical PCR and the primers used were:

- ❖ GA1 (forward 5'-AGA ACA TCG ACA TCT TGA AC-3');
- ❖ BD2 (reverse 5'-TAT GCT TAA ATT CAG CGG GT3').

Out of the total of 235 collected snails, 165 were positive for the presence of cercariae, and of these 93 (39.75%) had *Calicophoron daubneyi* cercariae.

Of the 115 snails identified as *Galba truncatula*, only 88 (76.52%) were positive with cercariae, of which 49 (55.68%) were positive for *Calicophoron daubneyi*.

Forty-eight snails of the species *Stagnicola palustris* were collected, 27 (56.25%) showed cercariae, but only 20 (24.07%) were *Calicophoron daubneyi*, whereas in the case of *Planorbis corneus*, 72 snails were collected, and 50 (69.44%) showed cercariae, but only 24 (48%) were *Calicophoron daubneyi*.

The originality of the thesis derives from the fact that this is the first larger research on ruminal trematode parasitism in ruminants in western Romania. The results also highlight the epidemiological situation of these trematodes in both domestic and wild ruminants.

Another important and original aspect of the thesis is that differences that may occur, in terms of prevalence, depending on the species, on the way of rearing (in households or in their native environment), but also on the way the animals are cared for, are presented. Thus, the importance of regularly applying prophylactic methods to reduce the possibility of infestation is represented.

In this thesis, the species *Calicophoron daubneyi* and *Paramphistomum leydeni* were identified for the first time in western Romania.