

Universitatea de Științe Vieții “Regele Mihai I” din Timișoara



Școala Doctorală Medicină Veterinară Timișoara

CIREȘAN A. CĂLIN-ALEXANDRU

TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDIU COMPARATIV ASUPRA HELMINȚILOR
GASTROINTESTINALI LA RUMEGĂTOARELE
MICI ÎN SUD-VESTUL ROMÂNIEI**

Conducător științific

Prof. Emerit Dr. Dr. h. c. DĂRĂBUȘ GHEORGHE

**Timișoara
2024**

University of Life Sciences “King Mihai I” from Timișoara



Doctoral School Veterinary Medicine Timișoara

CIREȘAN A. CĂLIN-ALEXANDRU

DOCTORAL THESIS

**COMPARATIVE STUDY ON GASTROINTESTINAL
HELMINTHS IN SMALL RUMINANTS IN
SOUTHWEST ROMANIA**

Scientific advisor

Prof. Emerit Dr. Dr. h. c. DĂRĂBUȘ GHEORGHE

**Timișoara
2024**

Rezumatul tezei de doctorat

Studiu comparativ asupra helminților gastrointestinali la rumeătoarele mici în Sud-Vestul României

Prezenta teză conține:

Listă de abrevieri

Rezumatele în limba Română și Engleză

Introducere

Stadiul actual al cunoașterii: 27 pagini

Cercetările proprii: 68 pagini

Tabele: 13

Figuri: 125

Surse bibliografice: 332

Anexe: 18

I. Stadiul actual al cunoașterii

Această parte se extinde pe 27 pagini și este compusă din 1 capitol care cuprinde 4 subcapitole.

Capitolul 1. Cercetări bibliografice privind parazitismul cu nematode gastrointestinale la ovine

Subcapitolul 1. Importanța parazitismului cu helminți gastrointestinali la ovine

În acest capitol este descrisă importanța creșterii ovinelor în agricultura românească. Totodată și problema reprezentată de parazitozele gastrointestinale, care provoacă pierderi în cazul creșterii ovinelor datorită scăderii performanțelor productive ale acestora, creșterea cheltuielilor generate de utilizarea tratamentelor și mortalitatea pe care o pot provoca în cazul infecțiilor masive.

Principalii helminți gastrointestinali la rumeătoarele mici sunt *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *T. axei*, *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta*, *Cooperia spp.*, *Oesophagostomum spp.*, *Trichuris ovis*, *Strongyloides papillosus* și *Bunostomum spp.*. Aceste parazitoze apar în general simultan, provocând simptome clinice care pot varia ca severitate, în mare măsură în funcție de vârsta animalului și starea nutrițională.

Subcapitolul 2. Etiologia și epidemiologia nematodozelor gastrointestinale la ovine

Sunt descrise speciile și caracterele morfologice ale nematodelor gastrointestinale cu importanță majoră (enumerați în capitolul anterior), cât și ciclul biologic, sursele și căile de infestare, receptivitatea gazdelor și potențialul biotic al fiecărei specii de parazit. Totodată sunt prezentați factorii favorizanți în apariția nematodozelor, precum factorii de mediu și factorii care depind de gazdă și prevalența acestor paraziți la nivel mondial și național.

Subcapitolul 3. Diagnosticul în nematodozele gastrointestinale

Diagnosticul epidemiologic

Acesta constă de fapt într-o anchetă epidemiologică, în care sunt colectate date despre: structura turmelor, tipul de pășune, cum se realizează pășunatul, regimul pluviometric, istoricul bolilor parazitare din zona de interes etc..

Diagnosticul clinic

În nematodozele digestive semnele predominante sunt date de diaree cu pierderea sporului în greutate, friabilitate a lânii și hipo sau agalaxia animalelor adulte. Din punct de vedere comportamental animalele parazitare sunt apatice, prezintă o stare depresivă și se deplasează lent pe pășune. În infestațiile masive semnele clinice se pot agrava, în final ajungându-se la moartea animalelor.

Diagnosticul anatomopatologic

Diagnosticul morfopatologic este utilizat ca metodă precisă de diagnostic în helmintozele gastrointestinale. Acesta se realizează după tehnicile uzuale de necropsie, punând în evidență paraziții și leziunile produse de aceștia, putându-se aprecia în același timp și gradul de infestare. Dependent de parazit și locul de parazitare sunt descrise numeroase leziuni la nivelul tubului digestiv.

Diagnosticul de laborator

Cuprinde diagnosticul coproscopic, hematologic, biochimic.

Subcapitolul 4. Controlul parazitologic

Terapia clasică în controlul nematodozelor gastrointestinale la ovine

Terapia clasică cuprinde metodele uzuale pe care crescătorii le utilizează în tratarea animalelor, acestea rezumându-se în final la administrarea de medicamente pentru controlul parazitologic.

Cele mai utilizate grupe de medicamente în controlul nematozilor gastrointestinali sunt benzimidazolicile, imidazotiazolicile și lactonele macrociclice.

Terapii alternative în parazitismul cu strongili gastrointestinali la ovine

În special datorită apariției chimiorezistenței, de-a lungul timpului, au fost testate mai multe plante cunoscute cu un potențial efect antiparazitar. Efectul antiparazitar al plantelor a fost testat atât prin administrare directă a acestora în rația animalelor, cât și prin utilizarea de extracte ale acestora cu conținut de substanțe cu efect antiparazitar.

Măsuri generale de management al parazitismului cu nematozi gastrointestinali la ovine

Pentru a fi cât mai eficient pe termen lung în tratarea parazitozelor, este de preferat ca tratamentele clasice antiparazitare să fie corelate și aplicate împreună cu alte metode de combatere ale helminților. Un management corespunzător se referă la un sistem care include multiple abordări în controlul parazitologic, care țin cont de factorii economici, epidemiologici, sistemul de producție etc.. Acesta include metode chimice și metode nechimice de control.

II.Cercetări proprii

Această parte se extinde pe 68 pagini și este compusă din 4 capitole.

Capitolul 2. Prevalența nematodelor gastrointestinale la ovinele din județele Timiș, Caraș-Severin și Mehedinți

Scopul și obiectivele cercetării

Scopul acestui studiu a fost acela de a investiga spectrul parazitar de la nivelul tubului digestiv al ovinelor, implicat în dinamica populațională și prevalența acestora în județele Timiș, Caraș-Severin și Mehedinți.

Cunoașterea acestor aspecte ajută atât fermierii cât și medicii veterinari în aplicarea schemelor de tratament antiparazitare eficiente, cât și în elaborarea de planuri de combatere ale acestor paraziți pe termen lung.

Materiale și metode

Studiul a fost făcut pe câte 5 ferme din fiecare județ luat în calcul, după cum urmează:

- În județul Timiș au fost examinate câte o fermă de pe raza localităților Cadar (comuna Tormac), Sânnicolau Mare, Sândandrei, Cenei și Gătaia;
- În județul Caraș-Severin au fost examinate câte o fermă de pe raza localităților Vermeș, Berzovia, Oțelul Roșu, Carașova și Brebu;
- În județul Mehedinți au fost examinate câte o fermă de pe raza localităților Pătulele, Pădina Mare, Vânju Mare, Jiana Mare și Ostrovu Mare (comuna Gogoșu).

Au fost recoltate probe de fecale de la câte 20 de animale din fiecare turmă, din fiecare județ, respectiv 300 de probe în total pe durata întregului studiu.

Metodele coproscopice folosite au fost metoda Willis și metoda McMaster.

Rezultate și discuții

În urma examinării probelor de fecale prin metoda Willis s-au putut observa ouă larvate de *Strongyloides spp*, ouă morulate de strongili gastrointestinali și alte elemente parazitare (oochisturi de eimerii și oncosfere de cestode). Prin metoda McMaster au putut fi evidențiate și ouă grele de trematode.

În urma examinării probelor de fecale prin metoda McMaster s-a putut identifica pe fiecare județ luat în studiu, numărul OPG fecale la ovinele din cât și raportul dintre elementele infestante.

Per general, la nivelul celor 3 județe s-a putut observa o prevalență crescută a parazitismului gastrointestinal la ovinele din județele studiate, respectiv de **39,66%** în cazul strongilidozei, **82%** în cazul strongilidozelor gastrointestinale și **90,66%** în cazul altor parazitoze cumulate (eimerioze, cestodoze, trematodoze).

Capitolul 3. Identificare microscopică și moleculară a speciilor de nematode gastrointestinale de la ovinele din județul Timiș

Scopul și obiectivele cercetării

Scopul studiului a fost de a identifica atât microscopic, cât și molecular paraziții adulți regăsiți la nivelul tubului digestiv la ovinele găsite decedate din 5 turme de ovine din județul Timiș.

Materiale și metode

Probele au constat în paraziți recoltați de la nivelul tubului digestiv de la 5 ovine moarte provenite din ferme diferite, din județul Timiș, localizate pe raza localităților Cadar, Sânnicolau Mare, Sânanndrei, Gătaia și Cenei.

Paraziții adulți identificați au fost prelevați și au fost examinați cu ajutorul lupei, microscopului optic, microscopul electronic și microscopului confocal.

Ulterior, nematodele gastrointestinale adulte prelevate au fost supuse analizelor moleculare în vederea identificării ADN-ului parazitar.

Rezultate și discuții

La nivelul tubului digestiv al animalelor s-au identificat următoarele:

- în rumen s-au identificat paraziți din genul *Paramphistomum*;
- la nivelul abomasului și intestinului au fost identificați strongili gastrointestinali;
- la nivelul ficatului și căilor biliare au fost identificați paraziți din specia *Dicrocoelium lanceolatum*;
- la nivelul intestinului au fost identificați paraziți din genul *Moniezia*.

În urma identificării moleculare prin tehnica PCR a nematodelor gastrointestinale, au fost identificate speciile *Haemoncus contortus*, *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta*, *Chabertia ovina* și *Oesophagostomum venulosum*.

Capitolul 4. Controlul parazitologic al nematodelor gastrointestinale la ovine prin utilizarea de medicamente uzuale (albendazol, ivermectină și levamisol)

Scopul și obiectivele cercetării

În acest studiu ne-am propus două obiective:

- primul obiectiv a fost acela de a evalua gradul de infestare al ovinelor din 3 ferme din județul Timiș,
- al doilea obiectiv a fost acela de a testa eficacitatea levamisolului (produs comercial *Levaverm 10%*), al ivermectinei (produs comercial *Evomec plus*) și al albendazolului (produs comercial *Vermitan 10%*) în tratamentul nematodozelor gastrointestinale.

Informațiile obținute vor putea fi utilizate în managementul controlului parazitologic al rumegătoarelor pe viitor prin utilizarea eficace de medicamente sigure din punctul de vedere al eficacității și evitarea apariției chimiorezistenței.

Materiale și metode

Studiul a fost realizat în 3 ferme de ovine din rasa *Țurcană*, din județul Timiș, din localitățile Cadar, Duboz și Nițchidorf pe parcursul a 21 de zile.

În total au fost recoltate 300 de probe de fecale pe durata întregului experiment și anume: de la fiecare turmă s-au recoltat câte 25 de probe de fecale în zilele 0, 7, 14 și 21 ale experimentului (100 de probe/ turmă) pentru a se urmări inițial, în ziua 0, gradul de infestare al fiecărei turme prin numărarea, ca mai apoi, până la finalul experimentului, evoluția OPG-ului și implicit efectul antiparazitar al fiecărui medicament în parte.

Gradul de infestare al ovinelor cu nematozi gastrointestinali s-a determinat cu ajutorul metodei coproscopice cantitative McMaster. Examinarea s-a realizat folosind obiectivul 10x de la microscopul optic.

Tratarea ovinelor, în ziua 0, din fiecare fermă s-a efectuat după cum urmează: ferma din Cadar cu *Levaverm 10 %* (1ml / 10 kg greutate corporală, per os), ferma din Duboz cu *Evomec plus* (0,2 mg / kg, injectabil, subcutanat), ferma din Nițchidorf cu *Vermitan 10%* (7,5 mg / kg, per os).

Rezultate și discuții

În urma examinării fecalelor în ziua 0, s-a putut observa o încărcătură parazitară ridicată la toate cele 3 ferme. Aceasta a scăzut imediat după administrarea tratamentului, eficacitatea antihelmintică a produselor utilizate fiind de:

- În cazul lui *Levaverm 10%*: **90,74%** în cazul strongilidozei și de **97,60%** în cazul trichostrongilidozelor și de **97,16%** per general nematozi gastrointestinali.
- În cazul lui *Evomec Plus*: **91,61%** în cazul strongilidozei și de **96,78%** în cazul trichostrongilidozelor și de **96,51%** per general nematozi gastrointestinali.
- În cazul lui *Vermitan 10%*: **92,04%** în cazul strongilidozei și de **95,79%** în cazul trichostrongilidozelor și de **95,52%** per general nematozi gastrointestinali.

În urma comparării rezultatelor obținute pe fiecare medicament în parte s-a putut observa o scădere a eficacității antiparazitare mai pronunțată în cazul albendazolului, scădere care poate fi atribuită faptului că animalele au fost deparazitate intern cu aceeași substanță la ultima dehelmintizare și implicit populațiile de paraziți existente la nivelul fermei respective au fost descendente ale generațiilor care au supraviețuit acelei dehelmintizări. Acest fenomen poate să demonstreze faptul că deparazitările cu aceeași substanță în mod repetat poate accelera apariția chimiorezistenței.

Pentru a se evita apariția chimiorezistenței este mandatoriu să se recurgă la rotația utilizării medicamentelor antiparazitare.

Capitolul 5. Controlul nematodelor gastrointestinale la ovine prin utilizarea de plante cu efect antiparazitar

Scopul și obiectivele cercetării

- Primul scop a fost de a determina conținutul de taninuri ale fânurilor de câmpie (compus dintr-o floră spontană regăsită pe pajiști) de ghizdei și de cicoare;
- Al doilea scop a fost acela de a demonstra efectul antiparazitar pe care îl au aceste fânuri atunci când sunt incluse în rația ovinelor.

Informațiile obținute în acest studiu pot fi utilizate în dezvoltarea de strategii de control antiparazitar pentru fermele de rumegătoare, în special pe perioada de producție de lapte, deoarece fermierii nu vor avea de pierdut prin retragerea de pe piață a laptelui, la fel ca în cazul administrării de medicamente uzuale. Folosirea plantelor cu efect antiparazitar în detrimentul medicamentelor de pe piață ajută în combaterea apariției chimiorezistenței, iar cunoașterea efectului antiparazitar al plantelor poate duce la apariția mai multor ferme organice, care vin pe piață cu produse animaliere ”drug-free”, tot mai căutate de consumatori.

Materiale și metode

Determinarea taninurilor totale și condensate

Pentru determinarea taninurilor totale și condensate au fost recoltate câte 3 probe din fiecare categorie de fân (9 în total) ce urmau a se administra ovinelor din experiment (fân de câmpie cu floră spontană, fân de cicoare și fân de ghizdei). Taninurile au fost extrase prin metoda percolării la rece. Pentru determinarea taninurilor totale a fost folosită metoda lui Petchidurai (2019), cu mici modificări, iar pentru determinarea taninurilor condensate a fost folosită metoda lui Makkar (2003).

*Controlul strongililor gastrointestinali cu ajutorul fânului de *Chycorium intibus* și *Lotus corniculatus**

Studiul a fost realizat într-o fermă din județul Timiș, localitatea Cadar, pe parcursul a 28

de zile și a fost efectuat pe trei loturi a câte 30 de ovine din rasa *Țurcană*, cu vârstă de aproximativ 1 an.

Pe întreaga perioadă experimentală animalele au pășunat împreună pe o pășune cu floră caracteristică zonei de câmpie. Pe timpul nopții, cele 3 loturi au fost introduse în regim de stabulație și au beneficiat de o hrană suplimentară pe care o consumau în integralitate înainte de a ieși din nou la pășune a doua zi. Hrana suplimentară, în funcție de lot, a fost reprezentată de:

- un tain de fân de câmpie de aproximativ 20 kg/ lot / zi pentru lotul martor (1);
- un tain de fân de cicoare de aproximativ 20 kg/ lot / zi pentru lotul 2;
- un tain de fân de ghizdei de aproximativ 20 kg/ lot / zi pentru lotul 3.

De la fiecare ovină din fiecare lot au fost recoltate fecale în zilele 0, 7, 14, 21, 28 ale experimentului. În total s-au recoltat 450 de probe de fecale pe durata întregului studiu. Probele au fost examinate la microscopul optic cu ajutorul metodei McMaster.

Pe durata studiului au fost recoltate și probe de sânge în vacutainere cu anticoagulant (EDTA) de la câte 5 animale din fiecare lot în zilele 0, 14 și 28 pentru a se determina evoluția hematocritului și a formulei leucocitare pe întreaga perioadă de 28 de zile ale experimentului.

Rezultate și discuții

În urma determinării taninurilor totale și condensate s-au obținut următoarele rezultate:

- fânul de câmpie a conținut 2,58 mg/g taninuri condensate și 13,92 mg/g taninuri totale;
- fânul de cicoare a conținut 29,84 mg/g taninuri condensate și 78,59 mg/g taninuri totale;
- fânul de câmpie a conținut 15,94 mg/g taninuri condensate și 94,43 mg/g taninuri totale;

În urma determinării eficacității antiparazitare a fânurilor s-au obținut următoarele:

- Fânul de cicoare a redus încărcătura parazitară a lotului 2 cu **21,57%** după 7 zile, cu **37,79%** după 14 zile, cu **25,19%** după 21 de zile și cu **24,72%** după 28 de zile.
- Fânul de ghizdei a redus încărcătura parazitară a lotului 3 cu **19,16%** după 7 zile, cu **31,18%** după 14 zile, cu **23,49%** după 21 de zile și cu **20%** după 28 de zile.

Conform t-test, diferențele statistice au fost semnificative între lotul martor și cele 2 loturi experimentale ($p < 0,05$). Iar între cele 2 loturi experimentale diferențele nu au fost semnificative ($p > 0,05$).

Animalele din grupurile experimentale au avut pe toată perioada experimentală valori mai ridicate ale hematocritului și ale hemoglobinei comparativ cu lotul martor.

Reducerea OPG-ului în cazul loturilor experimentale față de lotul martor demonstrează efectul antiparazitar al ghizdeiului și al ciorii.

Fânurile de cicoare și ghizdei pot fi utilizate ca supliment alimentar pentru ovinele de la pășune pentru controlul parazitar al populațiilor de strongili gastrointestinali. Acest protocol de combinare al pășunatului direct cu floră spontană și cu suplimente de plante cu conținut de taninuri ar putea fi utilizat atât pentru creșterea tradițională cât și pentru fermele organice.

Capitolul 6. Concluzii generale și recomandări

1. La toate fermele de ovine luate în studiu s-au depistat infestații cu nematode gastrointestinale și alți paraziți ai tubului digestiv.

2. Prevalența generală a parazitismului în zona de Sud-Vest luată în considerare, a fost de 39,66% cu *Strongyloides spp.*, 82% cu strongili gastrointestinali și 90,66% cu alte parazitoze digestive.

3. Prin examinarea macroscopică și microscopică au fost identificați paraziți din cadrul claselor *Sporozoa*, *Trematoda*, *Cestoda* și *Nematoda*.

4. Prin examinarea la microscopul optic, în abomasul și intestinul ovinelor din județul Timiș s-au identificat nematode gastrointestinale din genurile *Haemonchus*, *Ostertagia* și speciile *Oesophagostomum spp* și *Chabertia spp*.

5. Prin PCR, la ovinele din județul Timiș s-au identificat nematode din speciile *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta*, *Oesophagostomum venulosum* și *Chabertia ovina*.

6. În urma testării produselor *Vermitan 10%*, *Evomec Plus* și *Levaverm 10%*, s-a demonstrat că acestea sunt încă în ”grupa de siguranță” în țara noastră.

7. Chimiorezistența este favorizată de creșterea frecvenței utilizării unui medicament în tratamentul antiparazitar.

8. Pentru a se evita apariția chimiorezistenței este obligatoriu să se recurgă la rotația utilizării medicamentelor antiparazitare.

9. Fânul de ghizdei și cicoare conține cantități mai mari atât de taninuri totale cât și de taninuri condensate comparativ cu fânul de câmpie cu floră spontană.

10. Datorită reducerii OPG-ului în cazul loturilor experimentale furajate cu fân de cicoare și ghizdei s-a demonstrat efectul antiparazitar al acestor plante.

11. Fânurile de cicoare și ghizdei pot fi utilizate ca supliment alimentar pentru ovinele de la pășune pentru controlul parazitărilor de nematode gastrointestinale. Acest protocol de combinare al pășunatului direct cu floră spontană și cu suplimente de plante cu conținut de taninuri ar putea fi utilizat atât pentru creșterea tradițională cât și pentru fermele organice.

Capitolul 7. Elemente de originalitate

1. Determinarea prevalenței parazitismului cu nematode gastrointestinale în corelație cu alte parazitoze gastrointestinale la ovine, în Sud-Vestul României.

2. Identificarea microscopică și genetică a speciilor de C la ovine, în Sud-Vestul României.

3. Evaluarea modificărilor hemoleucogramei ovinelor dependent de gradul de parazitare al acestora cu nematode gastrointestinale.

4. În județul Timiș nu s-a identificat chimiorezistența nematodelor gastrointestinale la levamisol, albendazol și ivermectină.

5. Identificarea unor protocoale de control parazitologic al nematodelor gastrointestinale la ovine prin mijloace fitoterapeutice cu cicoare și ghizdei.

6. Controlul fitoterapeutic al nematodelor gastrointestinale poate reprezenta un punct de plecare în dezvoltarea fermelor organice.

PhD thesis summary

Comparative study on gastrointestinal helminths in small ruminants in South-Western Romania

I. Current state of knowledge

This part extends over 27 pages and consists of 1 chapter comprising 4 sub-chapters.

Chapter 1. Bibliographic research on gastrointestinal nematode parasitism in sheep

Subchapter 1. Importance of gastrointestinal helminth parasitism in sheep

This chapter describes the importance of sheep farming in Romanian agriculture. The problem of gastrointestinal parasitosis, which causes losses in sheep farming, due to the decrease in their productive performance, the increase in the expenses generated by the use of treatments and the mortality they can cause in case of massive infections, is also discussed.

The main gastrointestinal helminths in small ruminants are *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *T. axei*, *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta*, *Cooperia spp.*, *Oesophagostomum spp.*, *Trichuris ovis*, *Strongyloides papillosus* and *Bunostomum spp.*. These parasites generally occur simultaneously, causing clinical symptoms that can vary in severity, largely depending on the age of the animal and nutritional status.

Subchapter 2. Etiology and epidemiology of gastrointestinal nematodes in sheep

The species and morphological characters of major gastrointestinal nematodes (listed in the previous chapter) are described, as well as the life cycle, sources and pathways of infestation, host susceptibility and biotic potential of each parasite species. Also presented are factors favouring the emergence of nematodes, such as environmental and host-dependent factors and the prevalence of these parasites at global and national levels.

Subchapter 3. Diagnosis in gastrointestinal nematodes

Epidemiological diagnosis

This consists of an epidemiological investigation, in which data are collected on: herd structure, type of grazing, grazing practices, rainfall regime, history of parasitic diseases in the area of interest, etc..

Clinical diagnosis

In digestive nematodes the predominant signs are diarrhoea with weight loss, friability of wool and hypo- or agalactia in adult animals. Behaviourally, parasitized animals are apathetic, depressed and slow-moving in the pasture. In massive infestations clinical signs may worsen, eventually leading to death.

Anatomopathological diagnosis

Morpho-pathological diagnosis is used as an accurate method of diagnosis in gastrointestinal helminths. It is carried out following the usual necropsy techniques, highlighting the parasites and the lesions produced by them, while also being able to assess the degree of

infestation. Depending on the parasite and the site of parasitism, numerous lesions in the digestive tract are described.

Laboratory diagnosis

Includes coproscopic, haematological, biochemical diagnosis.

Subchapter 4. Parasitological control

Classical therapy in the control of gastrointestinal nematodes in sheep

Classical therapy comprises the usual methods that farmers use to treat animals, which ultimately involve the administration of drugs for parasitological control.

The most commonly used groups of drugs for the control of gastrointestinal nematodes are benzimidazoles, imidazothiazoles, and macrocyclic lactones.

Alternative therapies in gastrointestinal strongyles parasitism in sheep

Particularly due to the emergence of chemoresistance, several known plants with a potential antiparasitic effect have been tested over time. The antiparasitic effect of plants has been tested both by direct administration in the animal ration and by using their extracts containing substances with antiparasitic effect.

General management measures for gastrointestinal nematode parasitism in sheep

To be most effective in the long-term treatment of parasitosis, classical antiparasitic treatments should be combined and applied in conjunction with other helminth control methods. Proper management refers to a system that includes multiple approaches to parasitological control, taking into account economic factors, epidemiological factors, production systems, etc. It includes chemical and non-chemical control methods.

II. Personal research

This part extends over 68 pages and consists of 4 chapters.

Chapter 2. Prevalence of gastrointestinal nematodes in sheep in Timiș, Caraș-Severin and Mehedinți counties

Aim and objectives of the research

The aim of this study was to investigate the parasite spectrum in the digestive tract of sheep, implicitly their population dynamics and prevalence in the counties of Timiș, Caraș-Severin and Mehedinți.

Knowledge of these aspects helps both farmers and veterinarians in applying effective anti-parasitic treatment schemes, as well as in developing long-term control plans for these parasites.

Materials and methods

The study was carried out on 5 farms in each county considered as follows:

- In Timiș county, one farm each was examined in Cadar, Sânnicolau Mare, Sănandrei, Cenei and Gătaia;
- In Caras-Severin county, one farm was examined each in Vermeș, Berzovia, Oțelul Roșu, Carașova and Brebu;
- In Mehedinți county, one farm was examined in Pătulele, Pădina Mare, Vânju Mare, Jiana Mare and Ostrovu Mare (Gogoșu).

Faecal samples were collected from 20 animals from each herd in each county, i.e. 300 samples in total during the whole study.

The coproscopic methods used were the Willis method and the McMaster method.

Results and discussions

Examination of faecal samples by the Willis method revealed larval eggs of *Strongyloides* spp, morula eggs of gastrointestinal strongyles and other parasitic elements (oocysts of eimers and oncospheres of cestodes). Heavy trematode eggs were also detected by the McMaster method.

Following examination of faecal samples by the McMaster method, it was possible to identify for each county studied the number of faecal EPG in the sheep and the ratio of infesting elements.

In general, an increased prevalence of gastrointestinal parasitism could be observed in sheep in the three counties studied, i.e. **39.66%** in the case of strongyloidosis, **82%** in the case of gastrointestinal strongyloidosis and **90.66%** in the case of other cumulative parasitoses (eimeriosis, cestodes, trematodes).

Chapter 3. Microscopic and molecular identification of gastrointestinal nematode species from sheep in Timis County

Aim and objectives of the research

The aim of the study was to identify both microscopically and molecularly the adult parasites found in the digestive tract of sheep found dead from 5 sheep flocks in Timis County.

Materials and methods

Samples consisted of parasites collected from the digestive tract of 5 dead sheep from different farms in Timiș County, located in Cadar, Sânnicolau Mare, Sânzandrei, Gătaia and Cenei.

The identified adult parasites were collected and examined by magnifying glass, light microscope, electron microscope and confocal microscope.

Subsequently, the sampled adult gastrointestinal nematodes were subjected to molecular analysis to identify parasite DNA.

Results and discussions

The following were identified in the digestive tract of the animals:

- parasites of the genus *Paramphistomum* were identified in the rumen;
- gastrointestinal strongyles were identified in the abomasum and intestine;
- parasites of the species *Dicrocoelium lanceolatum* were idealised in the liver and bile ducts;
- parasites of the genus *Moniezia* were identified in the intestine.

Following molecular identification of gastrointestinal nematodes by PCR technique, *Haemoncus contortus*, *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta*, *Chabertia ovina* and *Oesophagostomum venulosum* were identified.

Chapter 4. Parasitological control of gastrointestinal nematodes in sheep using common drugs (albendazole, ivermectin and levamisole)

Aim and objectives of the research

In this study we set ourselves two objectives:

- the first objective was to assess the degree of infestation of sheep in 3 farms in Timiș County,

- the second objective was to test the efficacy of levamisole (commercial product Levaverm 10%), ivermectin (commercial product Evomec plus) and albendazole (commercial product Vermitan 10%) in the treatment of gastrointestinal nematodes.

The information obtained can be used in the management of parasitological control of ruminants in the future through the effective use of drugs that are safe in terms of efficacy and avoid the development of chemoresistance.

Materials and methods

The study was carried out in 3 farms of sheep of the *Tsurcana* breed in Timiș county, in the localities of Cadar, Duboz and Nițchidorf during 21 days.

A total of 300 faecal samples were collected during the whole experiment: 25 faecal samples were collected from each flock on days 0, 7, 14 and 21 of the experiment (100 samples / flock) in order to follow initially, on day 0, the degree of infestation of each flock by counting, and then, until the end of the experiment, the evolution of the EPG and implicitly the antiparasitic effect of each drug.

The degree of infestation of sheep with gastrointestinal nematodes was determined using the McMaster quantitative coproscopic method. Examination was performed using the 10x objective of the light microscope.

Treatment of sheep on day 0 in each farm was carried out as follows: farm in Cadar with Levaverm 10% (1ml/10 kg body weight, per os), farm in Duboz with Evomec plus (0.2 mg/kg, injectable, subcutaneous), farm in Nițchidor with Vermitan 10% (7.5 mg/kg, per os).

Results and discussion

Following examination of faeces on day 0, a high parasite load could be observed on all three farms. This decreased immediately after treatment, the anthelmintic efficacy of the products used being:

- In the case of Levaverm 10%: **90.74%** for strongyloidosis and **97.60%** for trichostrongyloidosis and **97.16%** for general gastrointestinal nematodes.

- For Evomec Plus: **91.61%** for strongyloidosis and **96.78%** for trichostrongylosis and **96.51%** for general gastrointestinal nematodes.

- For Vermitan 10%: **92.04%** for strongyloidosis and **95.79%** for trichostrongylosis and **95.52%** for general gastrointestinal nematodes.

A comparison of the results obtained for each individual drug showed a more pronounced decrease in antiparasitic efficacy in the case of albendazole, which can be attributed to the fact that the animals were dewormed internally with the same substance at the last deworming and therefore the parasite populations on the farm were descendants of the generations that survived that deworming. This phenomenon may demonstrate that repeated deworming with the same substance can accelerate the emergence of chemoresistance.

To avoid the emergence of chemoresistance it is mandatory to rotate the use of antiparasitic drugs.

Chapter 5. Control of gastrointestinal nematodes in sheep by the use of antiparasitic plants

Aim and objectives of the research

- The first aim was to determine the tannin content of lowland hay (composed of a spontaneous flora found in meadows) of birdsfoot trefoil and chicory;

- The second aim was to demonstrate the antiparasitic effect that these hay products have when included in the sheep ration.

The information obtained in this study can be used in the development of antiparasitic control strategies for ruminant farms, especially during the milk production period, as farmers will not lose out by withdrawing milk from the market, as with the administration of common drugs. The use of plants with an anti-parasitic effect instead of drugs on the market helps to combat the emergence of chemoresistance, and knowledge of the anti-parasitic effect of plants can lead to more organic farms coming to market with drug-free livestock products that are increasingly sought after by consumers.

Materials and methods

Determination of total and condensed tannins

For the determination of total and condensed tannins, 3 samples were taken from each hay category (9 in total) to be fed to the sheep in the experiment (wildflower meadow hay, chicory hay and birdsfoot trefoil hay). Tannins were extracted by cold percolation method. The method of Petchidurai (2019) was used for the determination of total tannins with minor modifications and the method of Makkar (2003) was used for the determination of condensed tannins.

*Control of gastrointestinal strongyles using *Chycorium intibus* and *Lotus corniculatus* hay*

The study was carried out on a farm in Timis county, Cadar locality, during 28 days and was conducted on three batches of 30 sheep of the *Tsurcana* breed, aged about 1 year.

Throughout the experimental period the animals grazed together on a pasture with flora characteristic of the lowland area. During the night, the three flocks were placed in a stalling system and were given supplementary feed, which they consumed in its entirety before going out to pasture again the next day. The supplementary feed, depending on the flock, was:

- about 20 kg of meadow hay /group/day for the control group (1);
- approximately 20 kg of chicory hay /group/day for group 2;
- approximately 20 kg of birdsfoot trefoil hay /group/day for group 3.

Faeces were collected from each sheep in each group on days 0, 7, 14, 21, 28 of the experiment. A total of 450 faecal samples were collected throughout the study. Samples were examined under light microscope using the McMaster method.

During the study, blood samples were also collected in vacutainers with anticoagulant (EDTA) from 5 animals from each group on days 0, 14 and 28 to determine the evolution of haematocrit and leucocyte count throughout the 28-day period of the experiment.

Results and discussion

The determination of total and condensed tannins gave the following results:

- meadow hay contained 2.58 mg/g condensed tannins and 13.92 mg/g total tannins;
- chicory hay contained 29.84 mg/g condensed tannins and 78.59 mg/g total tannins;
- birdsfoot trefoil hay contained 15,94 mg/g condensed tannins and 94,43 mg/g total tannins;

The determination of the antiparasitic efficacy of hay resulted in the following:

- Chicory hay reduced the parasite load of batch 2 by 21.57% after 7 days, 37.79% after 14 days, 25.19% after 21 days and 24.72% after 28 days.
- The birdsfoot trefoil hay reduced the parasite load of batch 3 by 19.16% after 7 days, 31.18% after 14 days, 23.49% after 21 days and 20% after 28 days.

According to t-test, statistical differences were significant between the control and the 2 experimental groups ($p < 0.05$). And between the 2 experimental groups the differences were not

significant ($p > 0.05$).

Animals in the experimental groups had higher hematocrit and hemoglobin values throughout the experimental period compared to the control group.

The reduction of EPG in the experimental groups compared to the control group demonstrates the antiparasitic effect of gizda and chicory.

Chicory and birdsfoot trefoil hay can be used as a feed supplement for grazing sheep for parasite control of gastrointestinal strongyles populations. This protocol of combining direct grazing with wild flora and tannin-containing plant supplements could be used for both traditional and organic farming.

Chapter 6. General conclusions and recommendations

1. In all the sheep farms studied, infestations with gastrointestinal nematodes and other parasites of the digestive tract were detected.

2. The overall prevalence of parasitism in the South-West area considered was 39.66% with *Strongyloides* spp., 82% with gastrointestinal strongyles and 90.66% with other digestive parasitoses.

3. Through macroscopic and microscopic examination, parasites from the classes *Sporozoa*, *Trematoda*, *Cestoda* and *Nematoda* were identified.

4. By optical microscopic examination, gastrointestinal nematodes of the genus *Haemonchus*, *Ostertagia*, and of the species *Oesophagostomum* spp, and *Chabertia* spp. were identified in the abomasum and intestine of sheep from the Timis county.

5. Through PCR, nematodes of the species *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia* (*Ostertagia*) *circumcincta*, *Oesophagostomum venulosum* and *Chabertia ovina* were identified in sheep from Timiș County.

6. After testing the products *Vermitan 10%*, *Evomec Plus* and *Levaverm 10%*, it was shown that they are still in the "safety group" in our country.

7. Chemoresistance is favored by increasing the frequency of use of a drug in antiparasitic treatment.

8. To avoid the emergence of chemoresistance, it is mandatory to resort to the rotation of the use of antiparasitic drugs.

9. Chicory hay contains higher amounts of both total tannins and condensed tannins compared to field hay with spontaneous flora.

10. The antiparasitic effect of these plants was demonstrated due to the reduction of EPG in the case of the experimental groups fed with chicory hay and birdsfoot trefoil.

11. Chicory and birdsfoot trefoil hay can be used as a dietary supplement for grazing sheep for parasitic control of gastrointestinal strongyle populations. This protocol of combining direct grazing with spontaneous flora and plant supplements containing tannins could be used for both traditional and organic farming.

Chapter 7. Elements of originality

1. Determination of the prevalence of parasitism with gastrointestinal nematodes in correlation with other gastrointestinal parasitoses in sheep, in South-West Romania.

2. Microscopic and genetic identification of gastrointestinal nematode species in sheep, in South-West Romania.

3. Evaluation of changes in the blood count of sheep depending on their degree of parasitism with gastrointestinal nematodes.
4. Chemoresistance of gastrointestinal strongyles to levamisole, albendazole and ivermectin was not identified in Timiș County.
5. Identification of some protocols for parasitological control of gastrointestinal nematodes in sheep by phytotherapeutic means with chicory and birdsfoot trefoil.
6. Phytotherapeutic control of gastrointestinal nematodes can be a starting point in the development of organic farms.