

Universitatea de Științe Vieții “Regele Mihai I” din Timișoara



Școala doctorală Medicină Veterinară Timișoara

GIUBEGA (căs. DUMITRU) T. SIMONA VICTORIA

TEZĂ DE DOCTORAT

**CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE ÎN BABESIOZA ȘI
TEILERIOZA CABALINELOR**

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

GIUBEGA (DUMITRU) T. SIMONA VICTORIA

DOCTORAL THESIS

**EPIDEMIOLOGIC RESEARCH IN EQUINE
BABESIOSIS AND THEILERIOSIS**

Scientific advisor

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

Timișoara

2024

REZUMAT

CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE ÎN BABESIOZA ȘI TEILERIOZA CABALINELOR

Prezenta teză conține:

- Lista de abrevieri
- Rezumatele în limba Română și Engleză
- Introducerea
- Stadiul actual al cunoașterii: 26 pagini
- Cercetările proprii: 81 pagini
- Tabele: 16
- Figuri: 96
- Surse bibliografice: 208
- Anexe: 28

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prima parte se extinde pe 26 pagini și este compusă din 1 capitol care cuprinde 5 subcapitole.

Capitolul 1. Caracteristici generale ale genului *Babesia* și *Theileria*

În capitolul 1 sunt prezentate caracteristicile generale ale Ordinului *Piroplasmida*, etiologia, ciclul biologic, epidemiologia, elemente de diagnostic ale Genului *Babesia* și *Theileria*, precum și măsuri de prevenție și control.

II. CERCETĂRI PROPRII

Cea de-a doua parte, cuprinde cercetările proprii care au avut ca scop stabilirea prevalenței paraziților *Theileria equi* și *Babesia caballi* prin metode de diagnostic de ultimă generație, atât serologice cât și moleculare, se extinde pe 85 pagini și este compusă din 7 capitole.

Fiecare capitol este structurat în patru subcapitole și anume:

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

Capitolul 2. Descrierea geografică a zonelor de proveniență a probelor

În acest capitol sunt descrise județele luate în studiu, condițiile de interes din județele investigate fiind reprezentate de tiparele climatice și tipurile de vegetație predominante. Astfel, în România, vegetația este variată având trei zone care pot fi distinse și anume alpină, forestieră și de stepă. Clima este una temperat-continentală de tranziție, cu influențe oceanice dinspre nord, sud-vest, și efecte continentale excesive dinspre nord-est.

Populațiile de căpușe pot fi influențate de mai mulți factori ecologici, printre care schimbările climatice continue dar și schimbarea modului de utilizare a terenurilor.

Capitolul 3. Seroprevalența infecției cu *Theileria equi* în sud-vestul, vestul și nord-vestul României

Scopul acestui studiu a fost de a estima seroprevalența și distribuția geografică a teileriozei cabaline în zona de sud-vest, vest și nord-vest a României, fapt care poate ajuta la înțelegerea mai profundă a situației parazitologice a cailor de pe teritoriul țării noastre.

Materiale și metode:

Studiul a inclus un număr de 522 animale. Probele de sânge de la cabaline au fost recoltate din vena jugulară a fiecărui animal în eprubete sterile cu sau fără anticoagulant, în perioada martie 2018 - iunie 2020, din zonele sud-vest, vest și nord-vest ale României, respectiv din județele Gorj, Timiș și Maramureș. Astfel, 241 de probe au provenit din județul Gorj, 37 din județul Maramureș și 244 din județul Timiș. Probele de ser au fost analizate prin metoda cELISA utilizând *Theileria Equi* Antibody Test Kit.

Rezultate și discuții:

În urma efectuării testului cELISA asupra probelor provenite de la cabalinele luate în studiu, 67 au fost pozitive cu un procent de inhibiție mai mare de 40%. **Prevalența anticorpilor anti-*Theileria equi*** în probele testate prin cELISA a fost de **12,83%** la cabalinele din trei regiuni ale României.

Capitolul 4. Seroprevalența infecției cu *Babesia caballi* în sud-vestul vestul și nord-vestul României

În România, există date epidemiologice insuficiente despre prevalența *B. caballi*, scopul acestui studiu fiind de a estima seroprevalența și distribuția geografică a babesiozei cabaline în zona de sud-vest, vest și nord-vest a României.

Materiale și metode:

Studiul a inclus un număr de 428 animale (227 femele și 201 masculi) din gospodăriile populației. 125 de probe au provenit din județul Gorj, 16 din județul Mehedinți, 35 din Caraș-Severin, 162 din Timiș, 88 din Arad și 2 din județul Satu Mare.

Giubega (căș. Dumitru) Simona Victoria
Cercetări epidemiologice în babesioza și teilerioza cabalinelor

Probele de ser au fost analizate prin metoda ELISA utilizând AsurDx™ *Babesia Caballi* Antibody Test Kit (Biostone Animal Health).

Rezultate și discuții:

Citirea valorilor procentului de pozitivitate relevat faptul că 197 de probe au avut o valoare mai mare de 60%. Calculând procentul de probe cu valorile ale PP mai mari de 60%, raportat la numărul total de probe prelucrate s-a obținut o **prevalență de 46.02%**.

Din totalul probelor, pe categorii de sex, 96 de probe pozitive au provenit de la femele (42.29%) și 101 de la masculi (50.24%), iar în ceea ce privește categoria de vârstă au aparținut categoriei de vârstă 0-60 luni, 101 categoriei >60-180 luni și 71 categoriei >180 luni.

În toate județele luate în studiu au fost identificate probe pozitive, respectiv 94 probe în județul Gorj, 4 în Mehedinți, 22 în Caraș-Severin, 42 în Timiș, 33 în Arad și 2 în județul Satu Mare.

Capitolul 5. Identificarea parazitului *Babesia caballi* prin Real Time PCR

Scopul acestui studiu a fost de a detecta prezența genomului parazit al lui *B. caballi* în probele de sânge de ecvine din 6 județe în care situația epidemiologică a acestui parazit este în prezent necunoscută. Deoarece animalele seropozitive dintr-o populație asimptomatică nu reprezintă un indicator al unei infecții recente sau active, testarea prin metode moleculare este alegerea pentru confirmarea sau infirmarea prezenței genomului parazit.

Materiale și metode:

Studiul a inclus un număr de 310 animale (172 femele și 138 masculi) din zonele sud-vest, vest, nord-vest și nord ale României, respectiv din județele Gorj, Mehedinți, Caraș-Severin, Timiș, Satu Mare și Bistrița Năsăud.

Extracția ADN-ului s-a făcut automat cu ajutorul extractorului King Fisher și s-a folosit kitul de extracție ADN/ARN MAG MAX Core Nucleic acid purification Kit – Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific.

Cantitatea de acizi nucleici extrasă a fost cuantificată cu ajutorul unui fluorometru Qubit® 4.0 și al kitului Qubit® dsDNA HS Assay.

Alegerea pentru desfășurarea prezentului studiu a fost protocolul descris de Bhoora (2010) cu o sondă TaqMan MGB (minor groove binder) și o pereche de primeri Bc_18SF402 respectiv Bc_18SR496. Sonda și primerii au fost concepuți pentru a detecta un fragment în regiunea hipervariabilă V4 a genei 18S ARNr, de 95 bp.

Rezultate și discuții:

În urma examinării probelor de sânge a rezultat o **prevalență de 5,81%**, care sugerează faptul că 18 din cei 310 cai au fost infectați cu *B. caballi*. Ct-urile probelor pozitive au fost cuprinse între 24,582 și 38,415.

Din totalul probelor pozitive, 12 au provenit de la femele (6.97%), și 6 de la masculi (4.34%).

Probele pozitive au fost identificate în două din cele șase județe supuse studiului, cu procentul de pozitivitate de 2,46% pentru județul Timiș și 15,38% pentru județul Gorj.

Giubega (căs. Dumitru) Simona Victoria
Cercetări epidemiologice în babesioza și teilerioza cabalinelor

În vederea secvențierii, 10 probe pozitive au fost testate prin PCR convențional, 5 dintre acestea au fost secvențiate bidirecțional și comparate cu cele disponibile în baza de date GenBank, utilizând analiza BLAST.

Capitolul 6. Identificarea parazitului *Theileria equi* prin Real Time PCR

Scopul acestui studiu a fost, pe de o parte, de a detecta genomul parazitărilor al *T. equi* în sângele ecvinelor, respectiv prevalența prin metode moleculare și, pe de altă parte, de a stabili dacă nivelurile de parazitemie sunt detectabile, la ecvinele provenite din zonele cu rezultate pozitive la testele serologice pentru detectarea anticorpilor anti *T. equi*.

Materiale și metode:

Studiul a inclus un număr de 810 animale (414 femele și 396 masculi) din gospodăriile populației, herghelie și abator, despre care au fost obținute date referitoare la vârstă și sex. Un număr de 309 probe au provenit din județul Gorj, 43 din județul Mehedinți, 35 din Caraș-Severin, 322 din Timiș, 65 din Arad, 4 din Satu Mare, 2 din județul Bistrița-Năsăud și 30 organe (splină).

Matricile utilizate pentru detecția genomului parazitărilor *T. equi* au fost sânge pe EDTA (780) și splină (30). Extracția ADN-ului și cuantificarea a fost efectuată așa cum a fost descris la capitolul 5.2.1. și 5.2.2.

În urma studierii literaturii de specialitate alegerea primerilor și a sondei s-au conformat protocolului descris de Lobanov.

Pentru a valida protocolul utilizat este necesară raportarea rezultatelor la o probă cunoscută ca fiind pozitivă. Martorul pozitiv ***Theileria equi* DNA 20μL (Concentration 0.1~1μg/μL)** a fost furnizat de către Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Nishi 2-11, Inada, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japonia, D.V.M., Ph.D., Professor YOKOYAMA Naoaki. Prin testarea limitei de detecție se urmărește până la ce diluție metoda poate detecta genomul. În acest sens s-au analizat 18 probe de sânge pe EDTA infectat cu *T. equi* la diluțiile 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 3 replicare/diluție

Rezultate și discuții:

În urma efectuării experimentului pentru stabilirea limitei de detecție s-a concluzionat faptul că limita de detecție este la diluția de 10^{-5} . Astfel, valoarea medie a Ct-urilor de la diluția de 10^{-5} este de 35.912 ± 2 deviații standard, rezultând o valoare cut-off de 37.711.

În urma testării prin Real Time PCR a probelor de sânge pe EDTA și probelor de țesuturi (splină) provenite din cele 7 județe nu a rezultat **nici un cal pozitiv** pentru detecția genomului parazitărilor al *T. equi*.

Constatări similare au fost raportate anterior, unde rezultatele pozitive prin cELISA nu au fost similare cu rezultatele obținute prin PCR.

Studiile efectuate anterior au demonstrat faptul că la purtătorii asimptomatici nivelurile parazitemiei au fost scăzute, iar eritrocitele infectate pot fi regăsite în splină, măduvă osoasă, endoteliul vascular, dar nu și în sângele periferic.

Capitolul 7. Identificarea morfologică a căpușelor vectori în zonele studiate

Giubega (căș. Dumitru) Simona Victoria
Cercetări epidemiologice în babesioza și teilerioza cabalinelor

Scopul acestui studiu a fost de a identifica genurile de căpușe prezente la animalele domestice aflate pe pășune din trei județe distincte ale României, respectiv Gorj, Caraș-Severin și Timiș. În România, fost identificate până în prezent 25 de specii de căpușe făcând parte din familia *Ixodidae* identificându-se astfel și speciile implicate în transmiterea piroplasmelor.

Materiale și metode:

Un număr total de 356 de căpușe au fost colectate pentru prezentul studiu. Probele au fost colectate în perioada septembrie 2023 - iunie 2024, din zonele sud-vest și vest ale României, respectiv din județele Gorj, Caraș-Severin și Timiș.

Toate probele de căpușe colectate au provenit de la animalele infestate de pe pășune și au fost identificate la nivel de gen, pe baza unor chei standard, folosind un stereomicroscop (Olympus®).

Rezultate și discuții:

În urma identificării pe baza cheilor standard, au rezultat căpușe aparținând la **trei genuri, respectiv *Ixodes*, *Dermacentor* și *Rhipicephalus*.**

Din numărul total de căpușe, 217 au fost female și 139 masculi aparținând celor trei genuri identificate. Astfel, genul *Dermacentor* au fost 236, dintre care 136 femele și 100 masculi, genul *Ixodes* 30 femele și *Rhipicephalus* 90, dintre care 51 femele și 39 masculi.

Toate cele trei genuri au fost identificate doar în județul Gorj, în județul Timiș doar genul *Dermacentor*, respectiv genul *Ixodes* și *Rhipicephalus* în județul Caraș-Severin.

Toate cele trei genuri identificate reprezintă vectori competenți pentru PE, competența acestora fiind demonstrată pe baza detecției ADN-ului parazitar în speciile de căpușe.

Capitolul 8. Identificarea moleculară a piroplasmelor în căpușele vector prin Real Time PCR

Scopul acestui studiu a fost de a identifica *Babesia caballi* și *Theileria equi* în căpușele colectate din trei județe din zona de sud-vest și vest a României.

Detectarea *Babesia* spp. și *Theileria* spp. în gazda sa nevertebrată este un punct important în înțelegerea biologiei parazitului pentru a dobândi mai multe cunoștințe despre interacțiunile gazdă-parazit-vector. În plus, detectarea paraziților este necesară pentru a determina prevalența acestor protozoare în diferite genuri de căpușe

Materiale și metode:

Studiul a inclus un număr de 145 de căpușe recoltate anterior în vederea identificării morfologice, din zonele sud-vest și vest, ale României, respectiv din județele Gorj, Caraș-Severin și Timiș.

Din județul Gorj au fost selectate randomic un număr de 66 de căpușe, din județul Timiș 40 și din județul Caraș-Severin 39, aparținând celor trei genuri identificate anterior (Capitolul 7), respectiv *Ixodes*, *Dermacentor* și *Rhipicephalus*

Extracția ADN-ului și cuantificarea a fost efectuată așa cum a fost descris la capitolul 5.2.1. și 5.2.2, cu mențiunea că anterior procesului de extracție s-a făcut o liză mecanică scopul fiind ruperea învelișului chitinos și eliberarea conținutului, iar pentru o mai bună omogenizare și

Giubega (căș. Dumitru) Simona Victoria
Cercetări epidemiologice în babesioza și teilerioza cabalinelor

eliberarea conținutului s-a efectuat secționarea căpușelor în două sau patru părți în funcție de mărimea acestora.

Amplificarea probelor extrase s-a făcut cu primerii, sonda și master mix-ul utilizați pentru probele de sânge pe EDTA, conform protocolului descris la Capitolul 5.2.3 pentru *Babesia caballi*, și Capitolul 6.2.3 pentru *Theileria equi*, precum și calculul și exprimarea rezultatelor.

În vederea secvențierii, 3 probe pozitive au fost testate prin PCR convențional, conform protocolului descris la Capitolul 5.3.

Pentru confirmarea rezultatelor Real Time PCR și PCR convențional, un număr de 3 probe au fost secvențiate bidirecțional și comparate cu cele disponibile în baza de date GenBank, utilizând analiza BLAST.

Rezultate și discuții:

În urma examinării probelor de căpușe 20 s-au dovedit a fi **pozitive pentru *B. caballi*** și **nici una pentru *Theileria equi***.

Ct-urile probelor pozitive au fost cuprinse între 36,399 și 39,313. Valoare Ct este invers proporțională cu încărcătura parazitară din proba, astfel, cu cât valoare este mai mare, cu atât cantitatea de ADN țintă este mai mică.

Prevalența totală a fost de 13,79%, pentru *B. caballi*, probele pozitive au fost identificate într-un singur județ și anume județul Gorj, cu un procent de pozitivitate de 30,30%.

Din totalul probelor pozitive, 6 au provenit din genul *Ixodes* (4.13%), 12 *Dermacentor* (8.27%) și 2 din genul *Rhipicephalus* (1.37%).

III. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

1. Seroprevalența *T. equi* bazată pe rezultatele testului cELISA a fost de 12,83%, iar cea a *B. caballi* bazată pe rezultatele testului ELISA a fost de 46,02% la cabalinele din regiunile de sud-vest, vest și nord-vest ale României.
2. Rezultatele seroprevalenței PE constatate pe teritoriul României confirmă situația endemică a acestei boli în țara noastră, în special la caii din gospodăriile populației.
3. Prin Real Time PCR prevalența *B. caballi* a fost de 5.81% la cabalinele din diferite regiuni ale României, în timp ce pentru *T. equi* nici un animal nu a fost testat pozitiv.
4. În trei județe din România au fost identificate trei genuri de căpușe aparținând familiei *Ixodidae* și anume: *Dermacentor* sp., *Ixodes* sp., și *Rhipicephalus* sp., toate cele trei genuri fiind dovediți a fi vectori competenți pentru piroplasmoza ecvină.
5. Prevalența babesiozei rezultată prin metode moleculare a fost de 13,79% la căpușele din trei județe ale României, probele pozitive fiind identificate în județul Gorj.
6. Prevalența de 15,38% pentru *B. caballi* în județul Gorj este susținută și de prevalența rezultată în căpușele vector din același județ.
7. Rezultatele acestei teze de doctorat indică existența unei expuneri ridicate cel puțin pentru *B. caballi* la nivel național, împreună cu o răspândire a acestor paraziți în prezent, o constatare asociată în principal cu detecția parazitului în căpușele vector.

IV. ELEMENTE DE ORIGINALITATE

Originalitatea și inovația rezidă din lipsa studiilor, la nivel național, asupra parazitismului cu *Babesia spp.* și *Theileria spp.* la ecvine și se reflectă prin contribuția la cunoașterea științifică a principalilor hemoparaziți la cabaline în România, prin cunoașterea epidemiologiei și implicațiile lor în sănătatea animală.

Rezultatele prezentei cercetări au contribuit la stabilirea situației epidemiologice în regiunile din România, astfel:

- Este **primul studiu** din România în ceea ce privește epidemiologia babesiozei și teileriozei la ecvinele din gospodăriile populației;
- **Primul studiu** care utilizează un protocol de testare prin metoda Real Time PCR, în România;
- Este primul studiu care determină prevalența prin metode serologice a anticorpilor împotriva *B. caballi* și *T. equi*;
- Identificarea vectorilor competenți ai PE din trei județe ale României;
- Identificarea prevalenței *B. caballi* și *T. equi* la căpușele vectori din trei județe ale României;
- Rezultatele publicate în lucrări de specialitate **completează harta Europei** și nu numai, **cu România.**

SUMMARY

EPIDEMIOLOGIC INVESTIGATIONS IN EQUINE BABESIOSIS AND THEILERIOSIS

This thesis contains:

- List of abbreviations
- Abstracts in Romanian and English
- Introducing
- Current state of knowledge: 26 pages
- Personal research: 81 pages
- Tables: 16
- Figures: 96
- Bibliographic sources: 208
- Annexes: 28

I. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The first part extends over 26 pages and consists of 1 chapter with 5 subchapters.

Chapter 1. General characteristics of the genera *Babesia* and *Theileria*

Chapter 1 presents the general characteristics of the order *Piroplasmida*, etiology, life cycle, epidemiology and diagnostic features of the genera *Babesia* and *Theileria*, as well as prevention and control measures.

II. PERSONAL RESEARCH

The second part, which includes our own research aimed at establishing the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* parasites by state-of-the-art diagnostic methods, both serologic and molecular, covers 81 pages and consists of 7 chapters.

Each chapter is divided into four subchapters:

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

Chapter 2. Geographical description of sample source areas

In this chapter, the counties under study are described, the conditions of interest in the investigated counties being represented by the climatic patterns and the prevailing vegetation types. Thus, in Romania, the vegetation varies, with three zones that can be distinguished, namely alpine, forest and steppe zones. The climate is transitional temperate-continental, with oceanic influences from the north and southwest and excessive continental effects from the northeast.

Tick populations can be influenced by several ecological factors, including ongoing climate change and land-use change.

Chapter 3. Seroprevalence of *Theileria equi* infection in southwestern, western and northwestern Romania

The aim of this study was to estimate the seroprevalence and geographical distribution of equine theileriosis in the southwestern, western and northwestern parts of Romania, which may help to better understand the parasitologic situation of horses in our country.

Materials and methods:

The study included a total of 522 animals. Blood samples from equine were collected from the jugular vein of each animal, in sterile tubes with or without anticoagulant between March 2018 and June 2020 from the southwest, west and northwest areas of Romania, respectively, in the counties of Gorj, Timis and Maramures. Thus, 241 samples came from Gorj County, 37 from Maramureş County and 244 from Timiş County. Serum samples were analyzed by the cELISA method using *Theileria Equi* Antibody Test Kit.

Results and discussions:

After performing the cELISA test on samples from the mares included in the study, 67 samples were positive, with an inhibition percentage greater than 40%. The **prevalence of anti-Theileria equi antibodies** in the samples tested by cELISA was **12.83%** from three regions of Romania.

Chapter 4. Seroprevalence of *Babesia caballi* infection in southwestern, western and northwestern Romania

In Romania, there are insufficient epidemiologic data on the prevalence of *B. caballi* and the aim of this study was to estimate the seroprevalence and geographical distribution of equine babesiosis in the southwest, west and northwest of Romania.

Materials and methods:

The study included a total of 428 animals (227 females and 201 males) from households. 125 samples came from Gorj County, 16 from Mehedinţi County, 35 from Caras-Severin County, 162 from Timis County, 88 from Arad County and 2 from Satu Mare County.

Giubega (căș. Dumitru) Simona Victoria
Cercetări epidemiologice în babesioza și teilerioza cabalinelor

Serum samples were analyzed by ELISA using AsurDx *Babesia Caballi* Antibody Test Kit (Biostone Animal Health).

Results and discussions:

Reading the percent positivity values revealed that 197 samples had a value greater than 60%. The percentage of samples with PP values greater than 60%, in relation to the total number of samples processed, was **46.02%**.

Of the total samples, by sex, 96 positive samples were from females (42.29%) and 101 from males (50.24%), and in terms of age category, 25 were from the 0-60 months age category, 101 from the >60-180 months age category and 71 from the >180 months age category.

Positive samples were found in all the counties surveyed: 94 samples in Gorj county, 4 in Mehedinți, 22 in Caraș-Severin, 42 in Timiș, 33 in Arad and 2 in Satu Mare county.

Chapter 5. Identification of the *Babesia caballi* parasite by Real Time PCR

The aim of this study was to detect the presence of the *B. caballi* parasitic genome in blood samples from equine from 6 counties where the epidemiologic status of this parasite is currently unknown. Since seropositive animals in an asymptomatic population are not an indicator of recent or active infection, molecular testing is the choice to confirm or refute the presence of the parasite genome.

Materials and methods:

The study included a total of 310 animals (172 females and 138 males) from the south-western, western, north-western and northern areas of Romania, respectively from the counties of Gorj, Mehedinți, Caras-Severin, Timis, Satu Mare and Bistrita Năsăud.

DNA extraction was performed automatically using the King Fisher extractor and the DNA/RNA extraction kit MAG MAX Core Nucleic acid purification kit - Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific.

The amount of nucleic acids extracted was quantified using a Qubit® 4.0 fluorometer and the Qubit® dsDNA HS Assay kit.

The protocol for conducting the present study was described by Bhoora (2010) with a TaqMan MGB (minor groove binder) probe and a pair of primers Bc_18SF402 and Bc_18SR496, respectively. The probe and primers were designed to detect a 95 bp fragment in the V4 hypervariable region of the 18S rRNA gene.

Results and discussions:

Examination of the blood samples revealed a **prevalence of 5.81%**, suggesting that 18 of 310 horses were infected with *B. caballi*. The Cts of positive samples ranged from 24.582 to 38.415.

Of all, positive samples, 12 were from females (6.97%), and 6 from males (4.34%).

Positive samples were found in two out of the six counties surveyed, with the percentage of positivity of 2.46% for Timis County and 15.38% for Gorj County.

For sequencing, 10 positive samples were tested by conventional PCR, 5 of which were bidirectionally sequenced and compared with those available in the GenBank database using BLAST analysis.

Chapter 6. Identification of the parasite *Theileria equi* by Real Time PCR

The aim of this study was, on the one hand, to detect the parasitic genome of *T. equi* in the blood of equine animals, i.e. the prevalence by molecular methods and, on the other hand, to determine whether the levels of parasitemia are detectable in equine from areas with positive serologic tests for *T. equi* antibodies.

Materials and methods:

The study included a total of 810 animals (414 females and 396 males) from households, herds and slaughterhouses for which age and sex data were obtained. A total of 309 samples came from Gorj County, 43 from Mehedinți County, 35 from Caraș-Severin County, 322 from Timiș County, 65 from Arad County, 4 from Satu Mare County, 2 from Bistrița-Năsăud County and 30 organs (spleen).

The matrices used for detection of the *T. equi* parasite genome were blood on EDTA (780) and spleen (30). DNA extraction and quantification was performed as described in Chapter 5.2.1. and 5.2.2.

Following literature review, primers and probes followed the protocol described by Lobanov.

To validate the protocol used it was necessary to report the results to a known positive sample. **The *Theileria equi* DNA 20μL positive control (Concentration 0.1~1μg/μL)** was provided by Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Nishi 2-11, Inada, Inada, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan, D.V.M., Ph.D., Professor YOKOYAMA Naoaki YOKOYAMA. By testing the limit of detection it is aimed to what dilution the method can detect the genome. For this purpose, 18 blood samples were analyzed on EDTA infected with *T. equi* at dilutions of 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 3 replicates/dilution.

Results and discussions:

After performing the detection limit experiment, it was concluded that the detection limit is at a dilution of 10^{-5} . Thus, the mean value of the Cts at the dilution of 10 is $35.912 + 2$ standard deviations, resulting in a cut-off value of 37.711.

Real Time PCR of blood samples on EDTA and tissue (spleen), from the 7 counties, did not reveal **any horses positive** for the detection of the *T. equi* parasite genome.

Similar findings have been reported previously, where positive cELISA results were not similar to PCR results.

Previous studies have shown that in asymptomatic carriers, parasitemia levels are low, and infected erythrocytes can be found in the spleen, bone marrow, vascular endothelium, but not in peripheral blood.

Chapter 7. Morphological identification of tick vector in the study areas

Giubega (căs. Dumitru) Simona Victoria
Cercetări epidemiologice în babesioza și teilerioza cabalinelor

The aim of this study was to identify the tick genera present on domestic grazing animals in three distinct counties of Romania, namely Gorj, Caras-Severin and Timis. In Romania, 25 species of ticks belonging to the *Ixodidae* family have been identified so far, thus also identifying the species involved in the transmission of piroplasmas.

Materials and methods:

A total of 356 ticks were collected for the present study. The samples were collected between September 2023 and June 2024, from the southwestern and western areas of Romania, respectively from Gorj, Caras-Severin and Timis counties.

All tick samples collected were from infested pasture animals and were identified to genus level based on standard keys using a stereomicroscope (Olympus®).

Results and discussions:

Identification using standard keys resulted in ticks belonging to **three genera, *Ixodes*, *Dermacentor* and *Rhipicephalus***.

Of the total number of ticks, 217 were females and 139 males belonging to the three identified genera. Thus, the genera *Dermacentor* there were 236, of which 136 females and 100 males, the genera *Ixodes* 30 females and *Rhipicephalus* 90, of which 51 females and 39 males.

All three genera have been identified only in Gorj County, in Timis County only the genera *Dermacentor*, respectively the genera *Ixodes* and *Rhipicephalus* in Caras-Severin County.

All three identified genera represent competent vectors for EP, their competence is demonstrated based on the detection of parasite DNA in tick species.

Chapter 8. Molecular identification of piroplasmas in tick vector by Real Time PCR

The aim of this study was to identify *Babesia caballi* and *Theileria equi* in ticks collected from three counties in southwestern and western part of Romania.

The detection of *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in its invertebrate host is important for understanding parasite biology to gain more knowledge about host-parasite-vector interactions. In addition, parasite detection is necessary to determine the prevalence of these protozoa in different tick genera.

Materials and methods:

The study included a total of 145 ticks previously collected for morphological identification in the southwestern and western parts of Romania, in Gorj, Caras-Severin and Timis counties.

A total of 66 ticks belonging to three previously identified genera were randomly selected from Gorj County, 40 from Timiș County and 39 from Caraș-Severin County, belonging to the three previously identified genera (Chapter 7), namely *Ixodes*, *Dermacentor* and *Rhipicephalus*.

DNA extraction and quantification was carried out as described in chapter 5.2.1. and 5.2.2, with the mention that prior to the extraction process a mechanical lysis was performed to break the chitin coating and release the contents, and for better homogenization and release of the contents, the ticks were sectioned into two or four parts depending on their size.

Giubega (căș. Dumitru) Simona Victoria
Cercetări epidemiologice în babesioza și teilerioza cabalinelor

Amplification of the extracted samples was done with the primers, probe and master mix used for blood samples on EDTA, according to the protocol described in Chapter 5.2.3 for *Babesia caballi*, and Chapter 6.2.3 for *Theileria equi*, as well as calculation and expression of the results.

For sequencing, 3 positive samples were tested by classical PCR according to the protocol described in Chapter 5.3.

To confirm the real time PCR and conventional PCR results, 3 samples were bidirectionally sequenced and compared with those available in the GenBank database using BLAST analysis.

Results and discussions:

Examination of the tick samples revealed that **20** were **positive for *B. caballi*** and **none for *Theileria equi***.

The Cts of the positive samples ranged from 36,399 to 39,313. The Ct value is inversely proportional to the parasite load in the sample, thus, the higher the value, the lower the amount of target DNA.

The total prevalence was 13.79% for *B. caballi*, positive samples were identified in only one county, namely Gorj county, with a positivity percentage of 30.30%.

Of the total positive samples, 6 were from the genus *Ixodes* (4.13%), 12 *Dermacentor* (8.27%) and 2 from the genus *Rhipicephalus* (1.37%).

V. GENERAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

8. The seroprevalence of *T. equi* based on cELISA results was 12.83% and that of *B. caballi* based on ELISA results was 46.02% in horses from the southwest, west and northwest regions of Romania.
9. The results of EP seroprevalence in Romania confirm the endemic situation of this disease in our country, especially in horses kept in households.
10. By Real Time PCR the prevalence of *B. caballi* was 5.81% in horses from different regions of Romania, while no animal tested positive for *T. equi*.
11. Three genera of ticks belonging to the *Ixodidae* family have been identified in three counties in Romania: *Dermacentor* sp., *Ixodes* sp., and *Rhipicephalus* sp., all three genera being proven to be competent vectors for equine piroplasmosis.
12. The molecular prevalence of babesiosis was 13.79% in ticks from three counties of Romania, with positive samples identified in Gorj County.
13. The prevalence of 15.38% for *B. caballi* in Gorj County is also supported by the resulting prevalence in vector ticks in the same county.
14. The results of this Ph.D thesis indicate high exposure for at least *B. caballi* nationwide, together with a current spread of these parasites, a finding mainly associated with the detection of the parasite in tick vectors.

VI. ELEMENTS OF ORIGINALITY

The originality and innovation of this study lies in the lack of studies, at national level, on *Babesia spp.* and *Theileria spp.* parasitism in equines and is reflected in the contribution to the scientific knowledge of the main hemoparasites in horses in Romania, through knowledge of epidemiology and their implications for animal health.

The results of the present research have contributed to establishing the epidemiologic situation in the regions of Romania, as follows:

- This is the **first study** in Romania on the epidemiology of babesiosis and theileriosis in equine animals in households;
- The **first study** using a real-time PCR testing protocol in Romania;
- The first study for serologic determination of the prevalence of antibodies to *B. caballi* and *T. equi*;
- Identification of EP competent vectors in three Romanian counties;
- Identification of the prevalence of *B. caballi* and *T. equi* in tick vectors in three counties of Romania;
- The results published in peer-reviewed papers **complete the map of Europe and beyond with Romania.**