

**Universitatea de Științele Vieții “Regele Mihai I” din Timișoara**



**Școala Doctorală Medicină Veterinară Timișoara**

**MATEȘ A. BOGDAN ADRIAN**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**CERCETĂRI PRIVIND FENOMENUL DE  
REZISTENȚĂ LA ANTIHELMINTICE ÎN ZONA DE  
CENTRU-VEST A ROMÂNIEI**

**Conducător științific**

**Prof. Dr. MORARIU SORIN**

**Timișoara**

**2024**



**University of Life Sciences “King Mihai I” from Timișoara**



**Doctoral School Veterinary Medicine Timișoara**

**MATEȘ A. BOGDAN ADRIAN**

# **DOCTORAL THESIS**

**RESEARCHES REGARDING THE ANTHELMINTIC  
RESISTANCE PHENOMENON IN THE  
CENTRAL-WESTERN ROMANIA**

**Scientific advisor**

**Prof. Dr. MORARIU SORIN**

**Timișoara  
2024**



**PER ASPERA AD ASTRA!**

(Seneca, 4 I.C. – 65 D.C.)

Sincere mulțumiri coordonatorului științific, dl. profesor Sorin Morariu, precum și întregului colectiv de cadre didactice și studenți doctoranzi de la disciplina de Parazitologie și Boli Parazitare, pentru tot sprijinul acordat pe parcursul desfășurării studiilor doctorale.

Dedic această teză părinților care mi-au fost alături necondiționat și m-au încurajat în finalizarea studiilor doctorale.

**Rezumatul tezei de doctorat**  
**CERCETĂRI PRIVIND FENOMENUL DE REZISTENȚĂ LA**  
**ANTIHELMINTICE ÎN ZONA DE CENTRU-VEST A ROMÂNIEI**

**Prezenta teză conține:**

*Listă de abrevieri*

*Rezumatele în limba română și engleză*

*Introducere*

*Stadiul actual al cunoașterii: 18 pagini*

*Cercetările proprii: 60 pagini*

*Tabele: 14*

*Figuri: 35*

*Surse bibliografice: 301*

*Anexe: 14*

Infestațiile parazitare cu diverse categorii de paraziți, mai ales cu helminți, reprezintă una din principalele cauze ale morbidității și chiar mortalității, atât la animale cât și la oameni. La animale, aceste infestații reduc sporul mediu zilnic, producția de carne și lapte, dar și fertilitatea, afectând bunăstarea acestora. Pentru a reduce sau elimina aceste infestații fermierii recurg la antihelmintice. Însă, folosirea incorectă, chiar abuzivă, a acestora în terapie induce o importantă presiune de selecție pentru rezistența la antihelmintice. Astfel, rezistența la diversele substanțe, fie ele antiinfecțioase, fie antiparazitare, reprezintă un subiect mereu actual și de interes în cercetare datorită prevalenței ridicate a fenomenului observată în ultimii ani, în special în efectivele de rumegătoare 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 **primul capitol** introductiv sunt prezentate motivația alegerii temei de cercetare, importanța și actualitatea temei alese, o scurtă prezentare a conținutului și a obiectivelor științifice propuse cercetării.

## I. Stadiul actual al cunoașterii

Această parte a tezei se extinde pe 18 pagini și cuprinde două capitole.

### Capitolul 2. Date generale privind fenomenul de rezistență la antihelmintice

În acest capitol sunt dezbătute pe scurt unele aspecte generale ale fenomenului de rezistență la antihelmintice, definiția rezistenței, tipurile de rezistență, precum și factorii care influențează instalarea acestui fenomen.

În practica medicală veterinară există numeroase produse medicamentoase antihelmintice din diverse grupe (orgnofosforice, piretrinoide, avermectine și altele), care pot fi utilizate, cu discernământ, într-o anumită situație. Dar, în timp, instalarea rezistenței la aceste medicamente a creat una dintre cele mai serioase probleme cu care se confruntă parazitologia actualmente.

Astfel, rezistență se referă la capacitatea paraziților de a supraviețui unor doze care, în mod normal,ucid atât paraziții aceleiași specii, cât și aceluiași stadiu biologic. Altfel spus, rezistența se traduce ca o schimbare a sensibilității unei anumite specii la un anumit produs farmaceutic.

Se consideră că există mai multe tipuri de rezistență: *de familie* (side-resistance), *încrucișată* (cross-resistance) și *multiplă*. Momentan, pentru a explica mecanismul genetic al selecției sușelor rezistente la antihelmintice, sunt acceptate două teorii: *mutația indusă* și *pre-existența genomului rezistent*.

Factorii care influențează fenomenul pot fi: genetici, biologici (biologia parazitului, relația gazdă parazit) și operaționali / manageriali (frecvența dehelmintizărilor, momentul acestora, subdozarea, utilizarea consecutivă a medicamentelor cu același mod de acțiune etc.).

### Capitolul 3. Modul de acțiune al diferitelor clase de antihelmintice

În acest capitol sunt trecute în revistă principalele clase de antihelmintice utilizate în medicina veterinară, mecanismul lor de acțiune și câteva informații privind prevalența fenomenului de rezistență în Europa.

Medicamentele antihelmintice aflate pe piața veterinară aparțin claselor: probenzimidazolice (febantel, netobimim) și benzimidazolice (thiabendazol, cambendazol, albendazol, mebendazol, fenbendazol etc.), lactone macrociclice (avermectinele, milbemicinele și spinosinele), imidazothiazoli (levamisol, tetramisol), salicilanilide (closantel, niclosamid,

oxiclozanid, rafoxanid etc.), tetrahidropirimidine (pirantel, morantel etc.), spiroindoli (derquantel), derivați amino-acetonitrilici (monepantel) și ciclooctadepsipeptidelor (emodepsid).

Dintre cele mai utilizate antihelmintice, benzimidazolicele sunt asociate modificărilor beta-tubulinei, imidazotiazolicele / tetrahidropirimidine ținesc receptorii nicotini ai acetilcolinei, iar lactonele macrociclice intervin la nivelul canalelor ionice de clor acționate de glutamat, producând deschiderea ireversibilă a canalelor și conducând la o permanentă hiperpolarizare celulară, urmată de paralizie.

Răspândirea fenomenului în Europa este îngrijorătoare, fiind semnalată prima dată în 1957, la fenotiazină. Cele mai multe cazuri de rezistență au fost raportate în țările vest-europene, dar fenomenul s-a extins în aproape toată Europa. În România, primele cercetări în această direcție au fost realizate de Cosoroabă și col. (1996) și Cristina și col. (1997).

## II. Cercetări proprii

Această parte se extinde pe 60 pagini și este compusă tot din două capitole, unul din ele cu două subcapitole.

### 4. Prevalența infestațiilor parazitare strongiliene în trei județe din vestul și centrul României

Scopul prezentului studiu a fost acela de a investiga spectrul parazitar, în special al nematodelor gastrointestinale, la ovine din trei comune de dimensiuni medii din vestul și centrul României pe o perioadă de un an de zile, începând cu aprilie 2021, până în martie 2022, respectiv Livada din județul Arad, Mogoș din județul Alba și Călan din județul Hunedoara.

De la indivizii supuși studiului s-au colectat între 30 și 50 g de fecale, fie proaspăt eliminate, fie direct din rect, au fost ambalate în pungi de plastic și refrigerate până la momentul prelucrării. În laboratorul disciplinei de Parazitologie și boli parazitare din cadrul Facultății de Medicină Veterinară din Timișoara au fost procesate prin următoarele metode: Willis, McMaster, Euzeby și s-au efectuat culturi de larve.

Pentru localitatea Livada din județul Arad rezultatele sunt redată în tabelul 4.1 și figura 4.1., din care se poate constata că există o creștere treptată a excreției de elemente parazitare, de la o medie de 233,33 OPG în luna aprilie, până la 836,66 OPG în luna octombrie, când a fost realizat peak-ul coproeliminării. Amplitudinea variațiilor OPG a fost destul de mare, constatându-se un OPG scăzut în lunile de iarnă (între 0 și 150 în luna februarie) și unul ridicat în sezonul autumnal (între 700 și 1100 în luna octombrie).



Studiul eliminării larvelor prin fecale a relevat doar prezența celor de protostrongili. Dintre acestea, au fost identificate cele de *Protostrongylus rufescens* și *Muellerius capillaris*. Încărcătura parazitară (tabelul 4.1 și figura 4.2) nu a fost intensă, variind între o medie de 1,06 LPG în luna aprilie 2021 și 4,66 LPG în lunile noiembrie 2021 și martie 2022.

Pentru localitatea Călan din județul Hunedoara rezultatele sunt redată în tabelul 4.2 și figura 4.3., observându-se că există o creștere graduată a eliminării de elemente parazitare, de la o medie de 130 OPG în luna aprilie, până la 736,66 OPG în luna octombrie, lună în care a fost consemnat maximul coproeliminării. Variația amplitudinii OPG a fost relativ mare, obținându-se un OPG destul de scăzut în lunile de iarnă (între 200 – în lunile ianuarie și februarie - și 750 în luna decembrie) și unul mai ridicat în sezonul autumnal (între 350 în luna septembrie și 1100 în luna octombrie).

În ceea ce privește eliminarea larvelor prin fecale, s-a observat și aici prezența celor de protostrongili, fiind identificate doar cele de *Protostrongylus rufescens* și *Muellerius capillaris*. Încărcătura parazitară (tabelul 4.2 și figura 4.4) a fost redusă, oscilând între o medie de 0,46 LPG în luna aprilie 2021 și doar 2,66 LPG în luna octombrie 2021.

Rezultatele privind localitatea Mogoș din județul Alba sunt redată în tabelul 4.3 și figura 4.5. Și aici se remarcă o creștere treptată a coproeliminărilor elementelor parazitare, de la o medie de 110 OPG în luna aprilie, până la 656,66 OPG în luna octombrie, când s-a înregistrat maximul eliminării diverselor elemente parazitare. Totodată, variația amplitudinii OPG a fost mare, obținându-se un OPG relativ scăzut în lunile de iarnă (între 250 – în luna februarie - și 900 în luna decembrie) și unul mai ridicat în toamnă (între 350 în luna septembrie și 1050 în luna octombrie).

Referitor la prezența larvelor în fecale, au fost identificate și aici cele de *Protostrongylus rufescens* și *Muellerius capillaris*, datele fiind redată în tabelul 4.3 și figura 4.6. De asemenea, și pentru această localitatea încărcătura larvară a fost redusă, fluctuând între o medie de 0,33 LPG în luna aprilie 2021 și abia 1,86 LPG în luna noiembrie 2021.

După citirea culturilor larvare, pentru localitatea Livada au fost identificate cinci genuri de nematode gastrointestinale: *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Chabertia* și *Oesophagostomum*. Primele trei genuri ca pondere au fost: *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, respectiv *Chabertia*, iar cel mai puțin reprezentat a fost *Haemonchus*.

Pentru județul Hunedoara tot genul *Trichostrongylus* a fost cel mai bine reprezentat, dar cu valori mai mici. Un alt gen bine reprezentat a fost *Chabertia*. Cel mai constant s-a dovedit a fi genul *Oesophagostomum*. Spre deosebire de județul Arad, pe lângă genurile identificate anterior, a fost consemnat și genul *Bunostomum*, care s-a comportat asemănător genului *Oesophagostomum*.

Comportamentul genurilor de helminți gastrointestinali identificați la ovinele din județul Alba a fost diferit în comparație cu datele raportate pentru celelalte două județe. Pentru tot sezonul de pășunat, până în luna decembrie, corespunzătoare stabulației, genul dominant a fost *Haemonchus*, urmat, la valori mai mici, de genul *Ostertagia*. Al treilea gen ca pondere a fost *Chabertia*, iar cel mai slab reprezentat a fost genul *Oesophagostomum*.

Cel mai mare output al elementelor parazitare a fost observat în luna octombrie pentru toate cele trei județe luate în studiu.

## 5. Cercetări privind rezistența la antihelmintice în efective de ovine din zona central-vestică a României

### A. Cercetări prin metode clasice

Obiectivul acestui studiu a fost acela de a identifica spectrul parazitărilor la două turme din județul Hunedoara, respectiv Alba și eventuala prezență a fenomenului de rezistență la antihelmintice, prin metode clasice.

Au fost selectate randomic și examinate coproscopic câte 15 ovine din fiecare turmă, prin metodele cunoscute: Willis, McMaster, spălări succesive, respectiv FECRT și alte două metode de calcul propuse de Dash și col. (1988) și Kochapakdee și col. (1995).

Pentru efectivul din județul Alba, din tabelul 5.1 se poate observa că au fost evidențiați paraziți aparținând claselor Protozoa, Trematoda și Nematoda. Pentru efectivul din județul Hunedoara se adaugă și clasa Cestoda. La ambele efective, extensivitatea parazitismului cu strongili digestivi a fost de 100%.

Aplicarea formulei clasice a FECRT pentru ABZ la turma din județul Alba a relevat o eficacitate de **93,18%**, situată imediat sub limita inferioară a intervalului de siguranță, ceea ce pare să denote o susceptibilitate pentru fenomenul de rezistență la această substanță. Aplicând cea de-a doua formulă, a lui Dash și col., rezultatul a fost similar, obținându-se o eficacitate de **92,90%**. Calculând eficacitatea albendazolului după a treia formulă s-a obținut același rezultat, adică **93,20%**. Deoarece rezultatele au fost similare, ca urmare, pentru toate celelalte calcule s-a folosit doar metoda clasică ”golden standard” a FECRT.

Utilizarea formulei clasice a FECRT pentru IVM a demonstrat o eficacitate **de 97,67%**, situată peste limita inferioară a intervalului de siguranță, ceea ce confirmă lipsa fenomenului de rezistență la această substanță.

Calculând eficacitatea albendazolului după formula clasică a FECRT la efectivul din județul Hunedoara s-a obținut valoarea de **86,44%**, ceea ce semnalează probabilitatea prezența rezistenței la benzimidazole în acest efectiv.

Pentru ivermectină, calculul FECRT a furnizat valoarea de **94,73%**, ceea ce situează efectivul imediat sub limita inferioară a declarării rezistenței, existând, practic, suspiciunea de rezistență la acțiunea lactonelor macrociclice.

## B. Cercetări prin metode de biologie moleculară

Acest studiu și-a propus identificarea fenomenului de rezistență prin metoda clasică a PCR.

S-au recoltat probe care au constat în nematode adulte, atât de la ovine sacrificate în județul Hunedoara, cât și în Alba. Reacția PCR a fost efectuată după tehnica descrisă de Gasser și col. în 1993, cu unele mici modificări. Amplificarea propriu zisă s-a realizat prin PCR clasic și s-a bazat pe crearea mai multor copii a unei secvențe a genei ITS -2 de mărimea a ~ 300 bp. Primerii utilizați au fost: forward NC1: 5'-ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT-3' și reverse NC2: 5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3').

Identificarea strongililor rezistenți la benzimidazol a fost efectuată folosind setul de primeri CN25FR/CN30R, în timp ce setul de primeri CN24FS/CN30R a fost utilizat pentru strongilii sensibili la benzimidazol. Pentru confirmarea de specie, produsele PCR au fost secvențiate și comparate cu cele disponibile în baza de date GenBank (Anexele 3-14), utilizând alinierea BLAST

În godeurile 7-10 se observă probele examinate cu primerii CN30/CN24 pentru alelele benzimidazol-**susceptibile**, proba 3 (*Ch. ovina* din județul Hunedoara) fiind identificată ca pozitivă. Godeurile 12-15 redau probele examinate cu primerii CN30/CN25 pentru alelele benzimidazol-**rezistente**, proba 2 (*H. contortus* din județul Alba) fiind pozitivă. Aceasta este **prima semnalare** a susceptibilității rezistenței pentru *Ch. ovina* în zona de vest a României.

Datele obținute în urma analizei PCR confirmă rezultatele FECRT, cu privire la susceptibilitatea prezenței rezistenței la antihelminticele benzimidazolice în județul Alba și existența acestuia în județul Hunedoara.

**PhD Thesis summary**

**RESEARCHES REGARDING THE ANTHELMINTIC RESISTANCE PHENOMENON  
IN THE CENTRAL-WESTERN ROMANIA**

The present thesis consists of:

*List of abbreviations*

*Summary in English and Romanian*

*Introduction*

*The current status of knowledge: 18 pages*

*Own researches: 60 pages*

*Tables: 14*

*Figures: 35*

*Bibliographic resources: 301*

*Annexes: 14*

Parasitic infestations with various categories of parasites, especially helminths, are one of the main causes of morbidity and even mortality, both in animals and in humans. In animals, these infestations reduce the average daily gain, meat and milk production, but also fertility, affecting their welfare. To reduce or eliminate these infestations, farmers use anthelmintics. However, their incorrect, even abusive, use in therapy induces an important selection pressure for anthelmintic resistance. Thus, resistance to various substances, whether they are anti-infectious or anti-parasitic, is an ever-current topic and of interest in research due to the high prevalence of the phenomenon observed in recent years, especially in domestic ruminant flocks/herds.

The Thesis contains an introductory part and the results of research. The latter is made up of:

- I. The current status of knowledge;
- II. Own research;
- III. General conclusions and recommendations;
- IV. Elements of originality.

In the first **introductory** chapter, the motivation for choosing the research theme, the importance and topicality of the chosen theme, a brief presentation of the content and scientific objectives proposed for the research are presented.

## I. The current status of knowledge

This part of the thesis extends over 18 pages and includes two chapters.

### Chapter 2. General data on the anthelmintic resistance phenomenon

In this chapter, some general aspects of the phenomenon of anthelmintic resistance, the definition of resistance, the types of resistance, as well as the factors that influence the establishment of this phenomenon are briefly discussed.

In veterinary medical practice, there are numerous anthelmintic medicinal products from various groups (organophosphorus, pyrethrinoids, avermectins and others), which can be used, with discernment, in a certain situation. But over time, the development of resistance to these drugs has created one of the most serious problems facing parasitology today.

Thus, resistance refers to the ability of parasites to survive doses that normally kill both parasites of the same species and biological stage. In other words, resistance translates as a change in the sensitivity of a particular species to a particular pharmaceutical product.

It is considered that there are several types of resistance: *side-resistance*, *cross-resistance* and *multiple one*, respectively. Currently, to explain the genetic mechanism of selection of anthelmintic-resistant strains, two theories are accepted: *induced mutation* and *pre-existence of the resistant genome*.

The factors that influence the phenomenon can be: genetic, biological (parasite biology, host-parasite relationship) and operational / managerial (frequency of deworming, their timing, under dosing, consecutive use of drugs with the same mode of action, etc.).

### Chapter 3. Mode of action of different classes of anthelmintics

This chapter reviews the main classes of anthelmintics used in veterinary medicine, their mechanism of action and some information on the prevalence of resistance in Europe.

The anthelmintic drugs on the veterinary market belong to the following classes: probenzimidazoles (febantel, netobimim) and benzimidazoles (thiabendazole, cambendazole, albendazole, mebendazole, fenbendazole, etc.), macrocyclic lactones (avermectins, milbemycins and spinosins), imidazothiazoles (levamisole, tetramisole), salicylanilides (closantel, niclosamide, oxyclozanide, rafoxanide, etc.), tetrahydropyrimidines (pyrantel, morantel, etc.), spiroindoles (derquantel), amino-acetonitrile derivatives (monepantel) and cyclooctadepsipeptides (emodepsid).

Among the most used anthelmintics, benzimidazoles are associated with changes in beta-tubulin, imidazothiazoles / tetrahydropyrimidines target nicotinic acetylcholine receptors, and macrocyclic lactones intervene at the level of glutamate-activated chlorine ion channels, producing the irreversible opening of the channels and leading to a permanent cellular hyperpolarization, followed by paralysis.

The spread of the phenomenon in Europe is worrying, being reported for the first time in 1957, with phenothiazine. Most cases of resistance have been reported in Western European countries, but the phenomenon has spread to almost all of Europe. In Romania, the first researches in this direction were carried out by Cosoroabă et al. (1996) and Cristina et al. (1997).

## II. Own researches

This part extends over 60 pages and is also composed of two chapters, one of them with two subchapters.

### Chapter 4. The prevalence of strongilian parasitic infestations in three counties in west and central Romania

The aim of the present study was to investigate the parasitic spectrum, especially of gastrointestinal nematodes, in sheep from three medium-sized communes in the west and center of Romania over a period of one year, starting from April 2021, until March 2022, respectively Livada from Arad County, Mogoş from Alba County and Călan from Hunedoara County.

Between 30 and 50 g of feces were collected from the individuals under study, either freshly eliminated or directly from the rectum, they were packed in plastic bags and refrigerated until the time of processing. In the laboratory of the discipline of Parasitology and parasitic diseases of the Faculty of Veterinary Medicine in Timișoara, they were processed by the following methods: Willis, McMaster, Euzeby and larval cultures were performed.

For the locality of Livada in Arad County, the results are shown in table 4.1 and figure 4.1., from which it can be seen that there is a gradual increase in the excretion of parasitic elements, from an average of 233.33 EPG in April, up to 836.66 EPG in October, when the coproelimination peak was achieved. The amplitude of EPG variations was quite large, with a low EPG observed in the winter months (between 0 and 150 in February) and a high one in the autumn season (between 700 and 1100 in October).

The study of the elimination of larvae through faeces revealed only the presence of protostrongyles. Among these, those of *Protostrongylus rufescens* and *Muellerius capillaris*

were identified. The parasite load (table 4.1 and figure 4.2) was not intense, varying between an average of 1.06 LPG in April 2021 and 4.66 LPG in November 2021 and March 2022.

For the locality of Călan in Hunedoara County, the results are shown in table 4.2 and figure 4.3., noting that there is a gradual increase in the elimination of parasitic elements, from an average of 130 EPG in April, up to 736.66 EPG in October, the month in which the maximum coproelimination was recorded. The variation of the EPG amplitude was relatively large, obtaining a fairly low EPG in the winter months (between 200 - in January and February - and 750 in December) and a higher one in the autumn season (between 350 in September and 1100 in October).

As for the elimination of larvae through faeces, the presence of protostrongyles was also observed here, only those of *Protostrongylus rufescens* and *Muellerius capillaris* being identified. The parasitic load (table 4.2 and figure 4.4) was reduced, oscillating between an average of 0.46 LPG in April 2021 and only 2.66 LPG in October 2021.

The results regarding the locality of Mogoş in Alba County are shown in table 4.3 and figure 4.5. Here too, a gradual increase in coproeliminations of parasitic elements can be noted, from an average of 110 EPG in April, to 656.66 EPG in October, when the maximum elimination of various parasitic elements was recorded. At the same time, the variation of the EPG amplitude was large, obtaining a relatively low EPG in the winter months (between 250 - in February - and 900 in December) and a higher one in autumn (between 350 in September and 1050 in October). Regarding the presence of larvae in faeces, those of *Protostrongylus rufescens* and *Muellerius capillaris* were also identified here, the data being reproduced in table 4.3 and figure 4.6. Also, for this locality the larval load was reduced, fluctuating between an average of 0.33 LPG in April 2021 and barely 1.86 LPG in November 2021.

After reading the larval cultures, five genera of gastrointestinal nematodes were identified for the Livada locality: *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Chabertia* and *Oesophagostomum*. The first three genera by weight were: *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, respectively *Chabertia*, and the least represented was *Haemonchus*.

For Hunedoara County, also the *Trichostrongylus* genus was the best represented, but with lower values. Another well-represented genus was *Chabertia*. The most constant proved to be the genus *Oesophagostomum*. Unlike the Arad County, in addition to the previously identified genera, the genus *Bunostomum* was also recorded, which behaved similar to the genus *Oesophagostomum*.

The behavior of the gastrointestinal helminth genera identified in sheep from Alba County was different compared to the data reported for the other two counties. For the entire grazing season, until December, corresponding to the stable, the dominant genus was

*Haemonchus*, followed, at lower values, by the genus *Ostertagia*. The third most important genus was *Chabertia*, and the least represented genus was *Oesophagostomum*.

The highest output of parasitic elements was observed in October for all three counties under study.

## Chapter 5. Research on resistance to antihelmintics in sheep flocks from the central - west area of Romania

### A. Research through classical methods

The objective of this study was to identify the parasite spectrum in two herds from Hunedoara County, and Alba, respectively, and to identify the eventual presence of the phenomenon of resistance to anthelmintics, by classical methods.

Fifteen sheep from each flock were randomly selected and coproscopically examined, using the known methods: Willis, McMaster, successive washings, respectively FECRT and two other calculation methods proposed by Dash et al. (1988) and Kochapakdee et al. (1995).

For the population from Alba County, from table 5.1 it can be seen that parasites belonging to the classes Protozoa, Trematoda and Nematoda were found. For the livestock in Hunedoara County, the Cestoda class is also added. In both herds, the extent of parasitism with digestive strongyles was 100%.

The application of the classic FECRT formula for ABZ to the herd in Alba County revealed an efficacy of **93.18%**, located immediately below the lower limit of the safety interval, which seems to denote a **susceptibility** to the phenomenon of resistance to this substance. Applying the second formula, by Dash et al., the result was similar, yielding an efficacy of **92.90%**. Calculating the effectiveness of albendazole according to the third formula, the same result was obtained, i.e. **93.20%**. Since the results were similar, as a result, for all other calculations, only the classical "golden standard" method of FECRT was used.

The use of the classic formula of FECRT for IVM demonstrated an efficacy of **97.67%**, located above the lower limit of the safety interval, which confirms the absence of the phenomenon of resistance to this substance.

Calculating the effectiveness of albendazole according to the classic formula of FECRT in the flock from Hunedoara County, the value of **86.44%** was obtained, which indicates the **probability** of the presence of resistance to benzimidazoles in this flock.

For ivermectin, the FECRT calculation provided the value of **94.73%**, which places the effective immediately below the lower limit of the declaration of resistance, practically existing the **suspicion** of resistance to the action of macrocyclic lactones.



## B. Research through molecular biology methods

This study aimed to identify the phenomenon of resistance through the classic PCR method.

Collected samples consisted of adult nematodes, both from slaughtered sheep in Hunedoara County and in Alba. The PCR reaction was performed according to the technique described by Gasser et al. in 1993, with some minor changes. The amplification itself was performed by classical PCR and was based on the creation of several copies of a ~300 bp of the ITS -2 gene sequence. The primers used were: forward NC1: 5'-ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT-3' and reverse NC2: 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3').

Identification of benzimidazole-resistant strongyles was performed using primer set CN25FR/CN30R, while primer set CN24FS/CN30R was used for benzimidazole-sensitive strongyles. For species confirmation, PCR products were sequenced and compared to those available in the GenBank database (Appendices 3-14) using BLAST alignment.

In wells 7-10, the samples examined with primers CN30/CN24 for benzimidazole-susceptible alleles can be observed, sample 3 (*Ch. ovina* from Hunedoara County) being identified as positive. Wells 12-15 reproduce the samples examined with primers CN30/CN25 for benzimidazole-resistant alleles, sample 2 (*H. contortus* from Alba County) being positive. This is the first indication of resistance susceptibility for *Ch. ovina* in the western area of Romania.

The data obtained from the PCR analysis confirm the FECRT results, regarding the susceptibility of the presence of resistance to benzimidazole anthelmintics in Alba County and its existence in Hunedoara County.