

# Usporedba dijagnostičkih postupaka u pretrazi izmeta pasa na prisutnost cisti *Giardia duodenalis*

---

Tikvić, Romana

Master's thesis / Diplomski rad

2025

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:239311>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
STUDIJ *VETERINARSKA MEDICINA*

DIPLOMSKI RAD

Romana Tikvić

Usporedba dijagnostičkih postupaka u pretrazi izmeta pasa na prisutnost cisti  
*Giardia duodenalis*

Zagreb, 2024.

Romana Tikvić

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za veterinarsko javno zdravstvo i sigurnost hrane, Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnica Zavoda za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom: prof. dr. sc. Tatjana Živičnjak

Mentor: prof. dr. sc. Albert Marinculić

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada

1. prof. dr. sc. Tatjana Živičnjak
2. prof. dr. sc. Dean Konjević
3. prof. dr. sc. Albert Marinculić
4. prof. dr. sc. Petar Džaja (zamjena)

Rad sadržava 35 stranica, 5 slika, 9 tablica, 50 literaturnih navoda.

## ZAHVALE

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Albertu Marinculiću na pomoći, stručnom vodstvu te odgovoru na svako moje pitanje. Također se zahvaljujem prof. dr. sc. Deanu Konjeviću na pomoći oko statističke obrade podataka.

Želim se zahvaliti i ostalim zaposlenicima Zavoda za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom bez čije pomoći izrada ovog diplomskog rada ne bi bila moguća.

Također zahvaljujem veterinarskoj ambulanti Bibino na prikupljenim uzorcima koji su pomogli izradu mog diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili ostvarenje ovog dugogodišnjeg sna. Hvala mojoj majci što mi je omogućila da odrastam okružena raznim životinjama te mi na taj način otkrila ljubav prema životinjama. Hvala joj i na beskrajnom razumijevanju te što me saslušala svaki put kada sam joj se požalila oko nečega. Hvala mome ocu što je uvijek vjerovao u mene, čak i kada ja nisam. Smatrao je da se uvijek može više i bolje te me na taj način naučio upornosti.

Puno hvala mojoj dugogodišnjoj cimerici Dori s kojom sam provela većinu svog fakultetskog obrazovanja i slobodnog vremena. Hvala ti za svaki provedeni trenutak, podijeljenu tajnu, spremljeni ispit, svaku podijeljenu emociju i još puno više. Hvala ti što si mi bila potpora u apsolutno svemu te što sam se s tobom osjećala kao da imam sestru, a ne cimericu.

Hvala mojoj najboljoj prijateljici Sari koja je sa mnom dijelila ljubav prema životinjama, proživjela razne sretne i manje sretne trenutke te slušala sva moja jadanja.

Hvala mojim prijateljicama Emi, Antoneli i Ivoni bez kojih sve ove godine studiranja u Zagrebu nebi bile ni upola ovoliko zanimljive.

Hvala i svim ostalim mojim prijateljima koji su mi uljepšavali školske i studentske dane te onima koji su svojim uzorcima pomogli izradu ovog diplomskog rada.

Ovaj rad posveta je mojoj prvoj ljubavi, jorkširskom terijeru Iti.

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA

$\mu\text{L}$  – mikrolitar

$\mu\text{m}$  - mikrometar

CI (engl. *confidence interval*) – interval pouzdanosti

ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – imunoenzimni test

EP (engl. *estimated proportion*) – očekivana proporcija podudarnosti

FITC (engl. *fluorescein isothiocyanate*) – fluorescein izotiocijanat

FN (engl. *false negatives*) – lažno negativni

FP (engl. *false positives*) – lažno pozitivni

g/mL – gram po mililitru

IF (engl. *immunofluorescence*) – imunofluorescencija

IFA (engl. *immunofluorescence assay*) – test imunofluorescencije

IgA – imunoglobulin razreda A

IgG – imunoglobulin razreda G

IgM – imunoglobulin razreda M

J (engl. *Youden's index*) – Youdenov indeks

NPV (engl. *negative predictive value*) – negativna prediktivna vrijednost

OP (engl. *observed proportion*) – opažena proporcija podudarnosti

P (engl. *prevalence*) – prevalencija

PBS (engl. *phosphate-buffered saline*) – fosfatni pufer

PCR (engl. *polymerase chain reaction*) – lančana reakcija polimerazom

PPV (engl. *positive predictive value*) – pozitivna prediktivna vrijednost

SAF (engl. *sodium acetate-acetic acid-formalin*) – natrij-acetat-octena kiselina-formalin

Sn (engl. *sensitivity*) – osjetljivost

Sp (engl. *specificity*) -specifičnost

TN (engl. *true negatives*) – stvarno negativni

TP (engl. *true positives*) – stvarno pozitivni

ZSCT (engl. *zinc sulfate concentration technique*) – test flotacije zasićenom otopinom cinkova sulfata

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>2</b>
2.1. O protozoonu <i>G. duodenalis</i> i giardiozi.....	2
2.1.1. Razvoj.....	2
2.1.2. Epizootiologija giardioze.....	3
2.1.3. Patogeneza giardioze.....	4
2.1.4. Klinička slika.....	5
2.1.5. Dijagnostika giardioze u ljudi i životinja.....	5
2.1.5.1. Mikroskopska pretraga bez koncentracije.....	6
2.1.5.2. Mikroskopska pretraga s koncentracijom.....	6
2.1.5.2.1. Flotacija.....	7
2.1.5.3. Entero test.....	8
2.1.5.4. Imunodijagnostički testovi.....	9
2.1.5.4.1. Imunofluorescencija.....	9
2.1.5.5. Molekularne metode.....	10
2.1.5.6. Ostale metode.....	10
2.2. Liječenje.....	10
2.3. Profilaksa.....	10
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>12</b>
3.1. Uzorci.....	12
3.2. Flotacija.....	12
3.3. Pretraga uz bojenje Lugolovom otopinom.....	13
3.4. Izravna imunofluorescencija.....	13
3.4.1. Postupak.....	15
3.5. Statistička obrada podataka.....	16
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>18</b>
4.1. Usporedba testa IF i flotacije te IF i bojenja Lugolovom otopinom ukupno.....	19
4.2. Usporedba testa IF i flotacije te IF i bojenja Lugolovom otopinom prema spolu.....	20
4.3. Ograničenja.....	23
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>24</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>27</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>28</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>33</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>34</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>35</b>

## 1.UVOD

Bičšaš *Giardia duodenalis* je protozoon iz porodice Hexamitidae kojeg nalazimo u širokom rasponu kralješnjaka. Danas je ovaj protozoon poznat kao kompleks više vrsta vrlo specifičnih genskih skupina. Skupine C, D, E, F, G i H otkrivene su kod raznih vrsta domaćih i divljih životinja, dok su skupine A i B uglavnom izdvojene iz ljudi, ali i domaćih i divljih životinja. Pored ove vrste unutar roda *Giardia* uvršteno je još nekoliko morfološki različitih vrsta (ORTEGA-PIERRES i sur., 2009.; RANA, 2024.). Protozoon ima neposredan razvoj s dva stadija: proliferirajući trofozoit i invazivna cista. Paraziti se prenose na način da nositelj proguta invazivne ciste onečišćenom vodom ili hranom ili izravnim fekalno-oralnim kontaktom. Nakon što se ciste nađu u crijevu započinje ekscistacija koja rezultira izlaskom dva trofozoita. Trofozoiti su stadij koji uzrokuje bolest jer se vežu za enterocite u gornjem dijelu tankog crijeva nositelja. Ovdje se dijele i apsorbiraju hranjive tvari iz sadržaja crijeva. U debelom crijevu se transformiraju u invazijske ciste. Smatra se da je giardioza najrasprostranjenija invazijska bolest pasa pa je dijagnostika giardioze jedan od najčešćih postupaka u pasa s proljevom. LOPEZ-ARIAS i sur. (2019.) ju smatraju najčešćim uzrokom proljeva u pasa, kada govorimo o parazitskim bolestima. Češće se nalazi u pasa u skloništim, uzgajivačnicama i ostalim mjestima gdje se drži veći broj pasa. Najčešće oboljeva štenad u koje se javlja klinički manifestni oblik, dok se u odraslih pasa bolest uglavnom pojavljuje u subkliničkom obliku. Izmetom invadirane životinje povremeno se izlučuju izrazito otporne ciste (SAARI i sur., 2019.). Ciste su invazijske odmah pri izlasku izmetom (ROJAS-LÓPEZ i sur., 2022.). U dijagnostici bolesti pasa se koristi više metoda i sve se temelje na pretraživanju izmeta. Tako se ciste mogu dokazati flotacijom uz centrifugiranje u zasićenoj otopini šećera i cinkovog sulfata. Ciste se mogu promatrati nativno ili pak nakon bojenja Lugolom koji ih oboji smeđe. Danas su veterinarskim ordinacijama vrlo zanimljivi brzi imunokromatografski testovi.

Cilj ovog rada je istražiti učinkovitost određenih dijagnostičkih postupaka za dokazivanje cisti protozoona bičšaša *Giardia duodenalis* u izmetu pasa. Ispitana je pouzdanost native pretrage nakon flotacije i native pretrage nakon flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom usporedbom sa postupkom imunofluorescencije.



## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

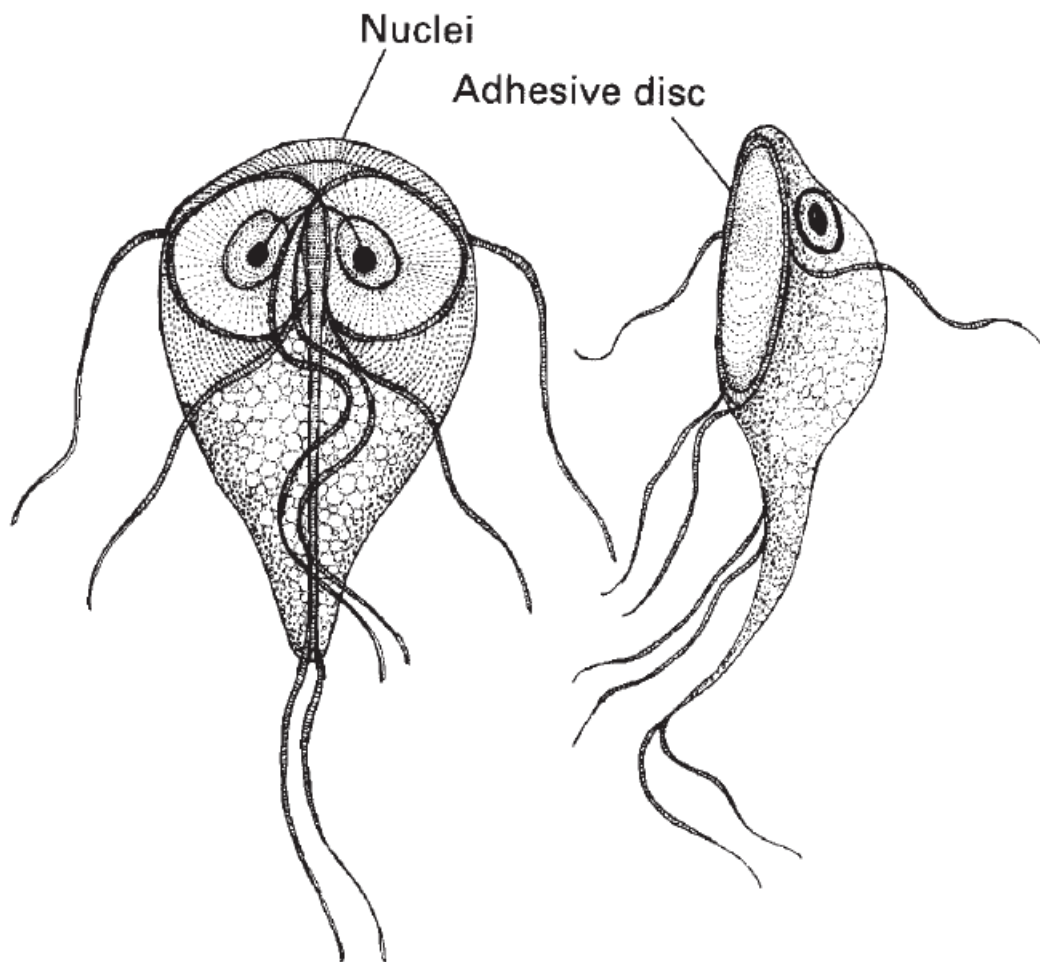
### 2.1. O protozoonu *G. duodenalis* i giardiozi

Bičšaš *G. duodenalis* je protozoon koji pripada koljenu *Metamonada*, razredu *Trepomonadea*, redu *Diplomonadida*, porodici *Hexamitidae* te rodu *Giardia*. U starijoj literaturi se mogu pronaći sinonimi *G. intestinalis* i *G. lamblia*. Pripadnici roda *Giardia* su u stvari crijevni paraziti sisavaca, ptica, gmazova, vodozemaca i riba. S obzirom na morfološke značajke, razlikujemo nekoliko vrsta i njihove nositelje: *Giardia duodenalis* (sisavci općenito), *G. muris* i *G. microti* (glodavci), *G. ardeae* i *G. psittaci* (ptice) te *G. agilis* (vodozemci). Nedavno je izolirana vrsta *G. varani* iz vodenog monitora (*Varanus salvator*), ali još nije potvrđena kao nova vrsta. Među znanstvenicima je postignut konsenzus pa je tako vrsta *G. duodenalis* podijeljena u osam genetskih skupina, od A do H. Za svaku skupinu predloženo je novo ime te je u nekih skupina uočena vrsna specifičnost. Skupina A (*G. duodenalis*) invadira ljude, primat, pse, mačke, stoku i divlje sisavce. Skupina B (*G. enterica*) invadira ljude, primat, pse, mačke, divlje sisavce i ptice. Skupine C i D (*G. canis*) invadiraju pse, ostale pripadnike porodice pasa i tuljane. Skupina E (*G. bovis*) invadira goveda i ostale papkare. Skupina F (*G. cati*) invadira mačke. Skupina G (*G. simondi*) invadira glodavce. Za skupinu H nije predloženo novo ime, a invadira morske sisavce. Iako rijetko, skupine A i B mogu imati zoonotski potencijal (ORTEGA-PIERRES i sur., 2009.; DEPLAZES i sur., 2016.).

#### 2.1.1. Razvoj

Protozoon *Giardia* se u svom životnom ciklusu javlja u dva oblika. Prvi oblik je trofozoit koji predstavlja replikativni oblik, a drugi je cista koja predstavlja invazijski oblik. Trofozoiti naseljavaju tanko crijevo te izgledom podsjećaju na polovinu ploda kruške. Veličine su 9-21 x 5-12 µm. Imaju bilateralno simetričnu strukturu, konveksnu dorzalnu te ravnu ventralnu stranu na čijem se prednjem dijelu nalazi veliki adhezijski disk (Slika 1). Sadrži dvije jezgre na apikalnom kraju, četiri para bičeva i karakteristična polumjesečasta medijana tjelešca (DEPLAZES i sur., 2016.). Medijana tjelešca su mikrotubularne strukture koje se razlikuju u svojem broju, obliku i položaju. Nisu slobodna u stanici te mogu biti povezana s plazmatskom membranom, adhezijskim diskom ili kaudalnim bičevima. Prisutna su u otprilike 80% stanica (PIVA i BENCHIMOL, 2012.). Trofozoiti su češće prisutni u životinja s proljevom, nego u onih s oblikovanim izmetom (HENDRIX i ROBINSON, 2023.). Nositelj u okoliš izlučuje okrugle ili ovalne ciste veličine 8-15 x 7-10 µm. One sadrže četiri jezgre, fragmente medijanih tjelešaca i bičeva (DEPLAZES i sur., 2016.). Nezrele ciste predstavljaju nedavno encistirane

pokretne oblike te sadrže dvije jezgre (HENDRIX i ROBINSON, 2023.). Nakon konzumacije, ciste putuju kaudalno. U želucu dolazi do razgradnje ciste pod utjecajem niskog pH te žuči u duodenumu. Oslobođeni trofozoiti se umnažaju binarnom diobom. Hrane se na mikroresicama tankog crijeva pa uzrokuju i mikroskopska oštećenja. Prepatentni period iznosi od 4 do 16 dana, ali može potrajati i nekoliko tjedana ili mjeseci. Encistacija se odvija u jejunumu stvaranjem stijenke ciste. Stijenka je izgrađena od fibrilarnih proteina i ugljikohidrata, L-acetilgalaktozamina.



Slika 1. Prikaz građe trofozoita giardije. Izvor: (TAYLOR i sur., 2007.)

### 2.1.2. Epizootiologija giardioze

Invazija se širi pomoću velikog broja cisti koje nositelj izlučuje izmetom. Broj izlučenih cisti u teladi iznosi otprilike  $3.8 \times 10^7$  (NYDAM i sur., 2001.). Izlučivanje često potraje tjednima ili mjesecima, varira u intenzitetu te se može privremeno i prekinuti. Ciste invazijsku sposobnost zadržavaju čak tri mjeseca u vlažnom okolišu, ali svega tri tjedna u vodi. Za razliku

od cisti, trofozoiti vrlo brzo ugibaju izvan nositelja. Životinja se invadira preko hrane ili vode onečišćene cistama. Minimalna invazijska doza za ljude i laboratorijske životinje iznosi 10-100 cista (DEPLAZES i sur., 2016.).

Domaće životinje, uključujući preživače, svinje i mesojede, često su invadirane giardijama. U pasa mlađih od godinu dana javlja se u 12-18% slučajeva, a u pasa starijih od godinu dana u 4-5.5% (ZHAO i sur., 2022.; KURNOSOVA i sur., 2024.) slučajeva. Najučestalije su giardije iz skupine A. Spol ne utječe na učestalost pojave (ZHAO i sur., 2022.). U mladih mačaka se javlja u 8% slučajeva, a u mačaka starijih od godinu dana u 3,5% slučajeva (KURNOSOVA i sur., 2024.). U drugom istraživanju protozoon *Giardia* se javlja u 15% pasa te u 12% mačaka (BOUZID i sur., 2015.). Prevalencija u teladi i janjadi iznosi otprilike 30%. Divlje životinje također mogu biti invadirane. U istraživanju provedenom u Norveškoj, prevalencija u jelena običnog (*Cervus elaphus*) iznosi 1,7%, a u srne (*Capreolus capreolus*) u 15,5% (HAMNES i sur., 2006.). Pronađeno je da prevalencija u okolišu iznosi 23,5% te se s godinama povećava (ZHAO i sur., 2022.; PAVLOVIC, 2023.). Na pojavnost može utjecati i geografska lokacija.

### **2.1.3. Patogeneza giardioze**

Patogeneza giardioze još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Dokazano je da crijevna sluznica može podnijeti opsežne invazije trofozoitima bez vidljivih poremećaja. Mogu se javiti promjene poput oštećenja epitela, atrofije mikroresica, upale sluznice, povećane epitelijalne propusnosti, poremećaja apsorptivne i probavne funkcije, gubitka tekućine i elektrolita te disbioze u crijevu (DEPLAZES i sur., 2016.). Smatra se da invazija velikim brojem protozoona rezultira debljim slojem trofozoita koji prekriva stjenku crijeva te značajno interferira s apsorpcijom hranjivih tvari. Neprobavljeni ugljikohidrati i ostale hranjive tvari omogućavaju prekomjeren rast bakterija unutar crijeva, što pogoršava stanje i dovodi do profuznog proljeva. Slični znakovi se javljaju i kod skraćivanja resica. Pod utjecajem protozoona dolazi do slabljenja spoja među epitelnim stanicama što povećava propusnost za tekućinu i proteine. Antigeni iz proteina hrane izlaze kroz oslabljene stanične veze i bivaju prezentirani imunom sustavu (SAARI i sur., 2019.) što u imunokompetentnih životinja potiče snažan imunski odgovor i dovodi do djelomičnog ili potpunog uklanjanja giardija iz crijeva. Ovako oblikovani imunski odgovor pruža zaštitu od ponovne invazije, o čemu govori manja prevalencija u starijih pasa (DEPLAZES i sur., 2016.). U normalnim uvjetima, obnova epitelnih

stanica crijeva se ostvaruje apoptozom, pri čemu nastaju mjesta za nove stanice. Kod giardioze apoptoza je učestalija.

#### **2.1.4. Klinička slika**

Proljev uzrokovan giardijama može biti akutan, kroničan ili povremen (SAARI i sur., 2019.). Proljev se često javlja i u subkliničkom obliku. Inkubacija u pravilu traje više od 10 dana (DEPLAZES i sur., 2016.). U pasa se proljev može javiti već petog dana nakon izlaganja cistama. Ciste u izmetu nalazimo nakon tjedan dana (HENDRIX i ROBINSON, 2023.). Može se javiti akutan vodenasti proljev sa ili bez primjesa sluzi. Ponekad se javlja steatoreja, (povećana količina masti u izmetu). U imunokompromitiranih životinja te onih sa konkurentnim infekcijama može se uočiti kroničan ili intermitentan proljev te gubitak tjelesne mase (SCORZA i LAPPIN, 2021.). Karakteristike proljeva odgovaraju onima prilikom poremećaja u debelom crijevu. Pri invaziji velikim brojem giardija ili u slučaju stresa dolazi do enteritisa s flatulencijom i dugotrajnog proljeva koji se donekle može liječiti antibioticima i dijetnom prehranom. Najčešće nakon prestanka liječenja i dijetne prehrane proljev recidivira (HARAPIN i sur., 2011.). Proljev koji je najčešći u štenadi u većini slučajeva je sluzav, bezbojan te intenzivnog mirisa. Vrućica i krvavi proljev se rijetko javljaju. U imunokompetentnih životinja proljev je samoograničavajući. Ostali znakovi koji prate bolest su anoreksija, povraćanje, letargija i gubitak tjelesne mase (SAARI i sur., 2019.). U osjetljivih životinja može se razviti dehidracija, gubitak tjelesne mase i posljedično loše gojno stanje (RANA, 2024.).

#### **2.1.5. Dijagnostika giardioze u ljudi i životinja**

Uspješna dijagnostika se temelji na pravilnom uzimanju uzoraka izmeta. S obzirom da vlasnici većinom donose uzorke, nužno je objasniti im kako pravilno prikupiti uzorak i to u tri navrata (svaki drugi dan), jer je poznato da ciste povremeno izlaze izmetom. Pri ovakvom prikupljanju mogućnost pronalaska giardija je veća od 90% (DEPLAZES i sur., 2016.). Od svakog izmeta se uzima uzorak veličine ljudskoga palca. Izmet se prikuplja u dobro zatvorenu plastičnu ili staklenu posudu (HENDRIX i ROBINSON, 2023.). Dok traje proces prikupljanja uzoraka, izmet se čuva u hladnjaku, jer pri sobnoj temperaturi dolazi do oštećenja giardija. Izmet se nikako ne smije pohraniti u zamrzivaču (ZAJAC i sur., 2021.). Nakon što se uzorci prikupe, potrebno ih je što prije dostaviti u laboratorij. Osoba koja pregledava uzorak treba oprezno postupati s izmetom zbog potencijalnog prijenosa uzročnika na ljude (zoonoza). Analitičar mora svakako koristiti zaštitne rukavice. Treba se zaštititi i kutom. Ako rukavice nisu

dostupne, nakon završene pretrage treba temeljito oprati ruke (HENDRIX i ROBINSON, 2023.).

#### **2.1.5.1. Mikroskopska pretraga bez koncentracije**

Pretraga izmeta je relativno jeftin, neinvazivan i vrlo pouzdan način dijagnostike parazita (ZAJAC i sur., 2021.). Koristi se za pronalazak cista i trofozoita. Trofozoiti se rjeđe nalaze u uzorku (HARAPIN i sur., 2011.) jer su vrlo osjetljivi. Osjetljivost ove pretrage ovisi o upotrebi izravne ili koncentracijske metode, broju pretraženih uzoraka izmeta te stručnosti osoblja (HOOSHYAR i sur., 2019.). Pretraga započinje pravilnim uzimanjem uzoraka izmeta. Izmet treba biti svjež i dostavljen na pretragu u što kraćem vremenu. Ako se želi dokazati trofozoite, potrebno je izmet ili stolicu pretražiti unutar 30 minuta od uzimanja (ZAJAC i sur., 2021.).

Kod izravnog mikroskopiranja u humanim laboratorijima koristi se priprema s otopinom prikladne soli ili fiksacija pomoću natrij-acetat-octene kiseline-formalina (SAF). Uzorak se može pregledati obojen jodom (od 2 do 5%-tna Lugolova otopina) ili neobojen. Trofozoiti su pokretni ako se za pripremu svježeg uzorka izmeta koristi sol, dok će pri upotrebi SAF-a biti nepokretni. Pokretni trofozoiti pod mikroskopom imaju karakteristično kretanje koje podsjeća na list koji pada (SAARI i sur., 2019.). Ako uzorak bez fiksacije ili konzervansa predugo stoji, dolazi do degeneracije trofozoita. Kod asimptomatskih jedinki ili zdravih pacijenata bez proljeva češće se nalaze ciste u uzorku. Što je veći broj uzoraka, veća je mogućnost pronalaska uzročnika. Kod tri uzorka vjerojatnost pronalaska je veća od 90% (HOOSHYAR i sur., 2019.). Prednosti ove metode su svakako minimalna oprema i kratko vrijeme izvođenja kao i očuvanost cista i trofozoita. Nedostaci su nečistoća i nedovoljna reprezentativnost (HENDRIX i ROBINSON, 2023.).

#### **2.1.5.2. Mikroskopska pretraga s koncentracijom**

Koncentracijske metode su preporučene i uobičajene metode koje omogućavaju pronalazak manjeg broja cista koje su mogle biti previđene metodom bez koncentracije. Ovom se metodom ciste lakše uočavaju ukoliko su obojene Lugolovom otopinom. Metoda nije posebno osjetljiva te zahtjeva stručnost osoblja koje pretražuje uzorak s obzirom da mnoge čestice pod mikroskopom mogu podsjećati na ciste. Zasićene otopine soli i šećera mogu oštetiti ciste (SAARI i sur., 2019.) pa one uslijed toga mogu izgledati poput polumjeseca. Prednost ove metode je koncentracija, pa je samim time i veća mogućnost pronalaska uzročnika (HENDRIX

i ROBINSON, 2023.). Koncentracija se može postići sedimentacijom i flotacijom. Flotacija se temelji na plutanju elemenata manje specifične težine dok se preostali materijal izmeta taloži na dnu. Kod sedimentacije dolazi do taloženja cista na dno posude s vodom.

#### **2.1.5.2.1. Flotacija**

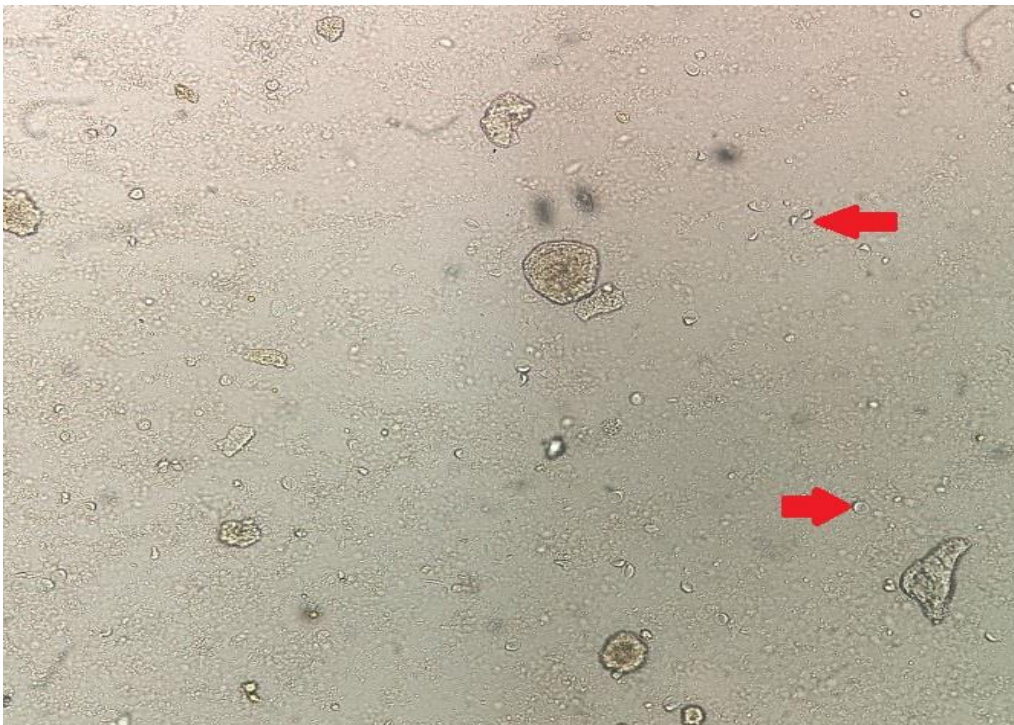
Ova metoda se koristi za koncentriranje jajašca i cista parazita te ih izdvaja od ostalog sadržaja uzorka. Temelji se na principu da su parazitski elementi lakši od flotacijske tekućine pa će plutati na površini (ZAJAC i sur., 2021.). U stvari, postoji razlika između specifične težine parazitskih elemenata i ostalih čestica u izmetu. Većina jajašaca ima specifičnu težinu između 1,1 i 1,2 g/mL, dok voda ima specifičnu težinu tek nešto iznad 1 g/mL. To znači da su jajašca preteška da bi plutala na površini vode. Iz tog razloga, potrebno je koristiti tekućine s većom specifičnom težinom. Takve tekućine koje nazivamo flotacijskim otopinama ili flotacijskim tekućinama sastoje se od šećera ili raznih soli i imaju specifičnu težinu između 1,2 i 1,25 g/mL. Kako većina čestica u izmetu ima specifičnu težinu iznad 1,3 g/mL, iste neće plutati i time onečistiti preparat (HENDRIX i ROBINSON, 2023.). Što je veća specifična težina otopine više će parazitskih elemenata plutati, ali i ostalih čestica. Flotacijske tekućine visoke specifične težine oštećuju parazitske elemente (ZAJAC i sur., 2021.).

Najčešće korištene flotacijske tekućine su zasićene otopine šećera, kuhinjske soli, magnezijeva sulfata, cinkova sulfata i natrijeva nitrata (HENDRIX i ROBINSON, 2023.). Za naglasiti je da otopina kuhinjske soli nije prikladna za flotaciju cista (HARAPIN i sur., 2011.). Ako se koristi otopina kuhinjske soli, uzorak je potrebno što prije pregledati jer se stvaraju kristali pa dolazi do oštećenja cista (ZAJAC i sur., 2021.), kao i korozije laboratorijske opreme. Za flotaciju cista bolja je zasićena otopina šećera (HARAPIN i sur., 2011.). Šećer je lako dostupan, jeftin, ne uništava ciste, ali je istodobno ljepljiv (HENDRIX i ROBINSON, 2023.). Za pronalaženje giardija preporučljivo je koristiti 33%-tnu otopinu cinkova sulfata jer ne uzrokuje brzo propadanje cisti, kao što je slučaj s drugim flotacijskim otopinama (ZAJAC i sur., 2021.).

Flotacija može biti jednostavna i izvedena bez specijalne opreme. Uzorak izmeta se pomiješa s flotacijskom tekućinom, procijedi u drugu posudu te se doda flotacijska otopina do ruba posude. Na površinu se stavlja pokrovno stakalce i pričekava 10 do 15 minuta. Nakon toga se pokrovno stakalce skida i stavlja na predmetno stakalce te pretražuje pod mikroskopom. Osjetljivost ove metode je mnogo manja od one s centrifugiranjem (HENDRIX i ROBINSON, 2023.).

Drugi način izvođenja flotacije je pomoću centrifugiranja. Ovaj način je bolji, jer je veća učinkovitost izdvajanja cista, a i potrebno je manje vremena za izvođenje (HENDRIX i ROBINSON, 2023.). Postupak izvođenja je isti do trenutka postavljanja pokrovnog stakalca. Nakon postavljanja, pripremljeni uzorak se centrifugira. Nakon centrifugiranja pokrovno stakalce se stavlja na predmetno stakalce te mikroskopira.

Uzorak se pregledava bez bojenja, odnosno nativno (Slika 2) ili nakon bojenja Lugolovom otopinom. Bojenje Lugolovom otopinom olakšava vizualizaciju unutarnjih struktura cista i trofozoita (HENDRIX i ROBINSON, 2023.).



Slika 2. Nativna pretraga nakon flotacije. Crvenim strelicama označene su ciste giardije, povećanje 40x

### 2.1.5.3. Entero test

Ovaj test se uglavnom koristi u dijagnostici u humanoj medicini. Za izvođenje se koristi želatinska kapsula i najlonska nit odgovarajuće duljine. Osoba proguta kapsulu koja se razgradi pri prolasku kroz probavni sustav pa samo nit dolazi do duodenuma. Nit se iz probavnog sustava izvlači nakon minimalno četiri sata, a može i nakon duljeg vremenskog razdoblja (ANDERSON, 2020.). Uzorak koji se uzima s niti pretražuje se pod mikroskopom ili se pak koristi za kultivaciju. Ovim se postupkom mogu dokazati trofozoiti (BARR i sur., 1992.; HOOSHYAR i sur., 2019.; GUNN i PITT, 2022.).

#### **2.1.5.4. Imunodijagnostički testovi**

Temelje se na različitim metodama otkrivanja antigena ili protutijela. U ove testove se ubraja imunoenzimski test (ELISA) za dokazivanje protutijela, kao i takozvani antigenski testovi. Smatra se da kombinacija imunodijagnostičkih testova s mikroskopskom pretragom nakon flotacije daje najpouzdanije rezultate (HENDRIX i ROBINSON, 2023.).

Poznato je da giardije potiču stvaranje protutijela IgM, IgG te najviše onih IgA razreda. U tu se svrhu mogu koristiti razni testovi, poput ELISA-e, imunofluorescencije ili Western blotting testa. Nedostatak navedenih metoda je što protutijela mogu biti prisutna dugo vremena nakon liječenja akutne invazije, pa ne govore nužno o trenutnom stanju (HOOSHYAR i sur., 2019.).

Postoje metode koje se koriste za otkrivanje fekalnih antigena u svježim uzorcima izmeta te uzorcima konzerviranim formalinom. Među njima su najpopularnije imunokromatografske metode koje traju vrlo kratko, svega od 10 do 15 minuta. Ovi se testovi vrlo često koriste u veterinarskoj dijagnostici jer zahtijevaju kratko vrijeme izvođenja. Za naglasiti je da ih treba oprezno koristiti kod provjere učinkovitosti liječenja, jer pokazuju samo prisutnost antigena koji može biti prisutan u izmetu i tjednima nakon liječenja (SAARI i sur., 2019). Prikladni su i testovi kojima se dokazuje prisutnost antigena u izmetu pomoću monoklonskih protutijela (HARAPIN i sur., 2011.).

##### **2.1.5.4.1. Imunofluorescencija**

Imunofluorescencija je posebno prikladan imunodijagnostički test koji se u posljednje vrijeme smatra zlatnim standardom. Kod ovog testa reakcija antigen - protutijelo se vizualizira pomoću raznih označivača. Najčešće su to fluorokromi. Fluorokromi su boje koje apsorbiraju zračenje, odnosno ultraljubičasto svjetlo, pobuđuju i emitiraju vidljivu svjetlost. Da bi djelovali kao označivači, trebaju sadržavati kemijske skupine sposobne za formiranje kovalentnih veza s proteinskim molekulama, emitirajući visoku fluorescenciju u vidljivom spektru. Boja treba biti različita od boje koju emitira ostatak uzorka. Jedan od najčešćih fluorokroma je fluorescein izotiocijanat koji je zelene boje (AOKI i sur., 2010.).

Izravna imunofluorescencija se temelji na vezi specifičnih monoklonskih protutijela na ciste giardije (EL-NAHAS i sur., 2012.). Prednost ove metode je specifičnost, dok su nedostaci duže izvođenje te potreba posjedovanja fluorescentnog mikroskopa. Na tržištu je dostupan komercijalni test koji koristi monoklonska protutijela. Ovaj test ima veću osjetljivost od



mikroskopske pretrage i otkriva relativno mali broj giardija (ALLES i sur., 1995.; UEHLINGER i sur., 2017.).

#### **2.1.5.5. Molekularne metode**

Ove se metode ne koriste u rutinskoj dijagnostici, a temelje se na primjeni lančane reakcije polimerazom. Prikladne su za određivanje tipova i podtipova giardija, što nije potrebno u rutinskoj dijagnostici. Koriste se i za dokazivanje prisutnosti giardija u okolišu, vodi i kanalizaciji (HOOSHYAR i sur., 2019.), kao i za potencijal zoonotskog prijenosa (UEHLINGER i sur., 2017.). Molekularne metode su skuplje, zahtjevnije za izvođenje te je potrebna posebna oprema za njihovo provođenje (JEREZ PUEBLA i sur., 2017.).

#### **2.1.5.6. Ostale metode**

**Kultivacija** je korisna u preciznoj dijagnostici, no ne koristi se u rutini. Upotrebljava se u laboratorijima kada je potrebna velika količina trofozoita (HOOSHYAR i sur., 2019.). **Aspiracija** sadržaja duodenuma prilikom endoskopije može također poslužiti za dokaz trofozoita (HARAPIN i sur., 2011.). Trofozoiti se mogu dokazati i u **biopsatu** te **strugotini** crijevnog epitela.

### **2.2. Liječenje**

Ponekad giardioza u pasa prolazi sama od sebe te nije potrebno liječenje (RANA, 2024.). Najčešće korišteni lijekovi su fenbendazol, metronidazol, ronidazol i albendazol (GUNN i PITT, 2022.). Trajanje terapije je različito. Fenbendazol se često daje jednom dnevno tijekom tri do pet uzastopnih dana, a ronidazol dva puta dnevno tijekom sedam dana (DEPLAZES i sur., 2016.). Mnogi proizvodi sadrže kombinaciju nekoliko aktivnih tvari, među kojima je često febantel koji se inače metabolizira u fenbendazol te pirantel i prazikvantel (SAARI i sur., 2019.). Pri sumnji na infekciju klostridijama uputno je koristiti metronidazol (RANA, 2024.) koji ima antimikrobno djelovanje na anaerobe. Prikladan je i neomicin (HARAPIN i sur., 2011.). Tijekom liječenja dobro je psima dati hranu s vlakninom i probiotike što ujedno potiče i brže ozdravljenje (ZAJAC i sur., 2021.).

### **2.3. Profilaksa**

U pasa se vrlo često uočavaju reinvazije iz cistama kontaminiranog okoliša pa je vrlo važna provedba higijenskih mjera. Ciste uništava suša i temperatura iznad 60°C (DEPLAZES i sur., 2016.). Po liječenju važno je oprati psa pripravcima koji sadrže klorheksidin. Nakon

pranja, potrebno je osušiti psa, posebno stražnji kraj, jer vlaga pogoduje preživljavanju cista pričvršćenih za dlaku. Unutarnji prostori se trebaju temeljito očistiti od bilo kakve kontaminacije izmetom. Površine se trebaju čistiti natrijevim hipokloritom ili kvarternim amonijevim spojevima i za vrijeme trajanja liječenja. Giardije zadržavaju virulenciju na sobnoj temperaturi otprilike tjedan dana te im pogoduje vlaga. Temperature ispod ništice ubijaju većinu cista, dok neke preživljavaju. Potrebno je ukloniti sve izmetom zaprljane tkanine, a one koje se čuvaju, peru se pri temperaturi od 60°C, nakon čega se temeljito suše. Zdjelice treba svakodnevno prati toplom vodom (SAARI i sur., 2019.).

Vjerojatnost okolišne invazije smanjuje se samim držanjem životinja u kući. U prevenciji je najbitnije uklanjanje izmeta iz okoliša što je prije moguće. Područja kontaminirana izmetom koji sadrži giardije je potrebno očistiti pomoću pare ili kvarternih amonijevih spojeva. Psima je potrebno omogućiti čistu pitku vodu te zabraniti pijenje iz vanjskih izvora. Invadirani psi trebaju izbjegavati kontakt s drugim psima i plivanje u vodi dok ne prođu svi klinički znakovi. Iako postoji, komercijalno cjepivo nije pokazalo potrebnu razinu zaštite (DEPLAZES i sur., 2016.; SAARI i sur., 2019.; RANA, 2024.).

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Uzorci**

Za potrebe istraživanja prikupljeno je 78 uzoraka izmeta pasa, veličine oraha. Uzorci su prikupljeni u razdoblju od 30. travnja 2023. do 12. svibnja 2023. i to trokratno prema protokolu. Do pretrage su uzorci pohranjeni u hladnjaku. Od ukupnog broja izmeta u istraživanju, njih 38 je prikupljeno u radu Zavoda za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Iz Laboratorija za parazitologiju Hrvatskog veterinarskog instituta je korišteno 27 uzoraka izmeta. Suradnjom s Veterinarskom ambulantom Bibino bili smo u mogućnosti pretražiti šest uzoraka. Preostalih šest uzoraka je prikupljeno od pasa u vlasništvu prijatelja i poznanika. Uzorci su sakupljeni neovisno o dobi, spolu i pasmini psa, te je riječ o prigodnom uzorkovanju.

#### **3.2. Flotacija**

Za izvođenje flotacije potrebno je:

- Uzorak izmeta – 3 uzastopne defekacije, od svakog po 2 do 3 grama
- Zasićena otopina šećera
- Plastične čašice zapremine 120 ml
- Sito
- Drvena špatula
- Epruvete za centrifugiranje zapremine 15 ml
- Pokrovnice
- Predmetnice

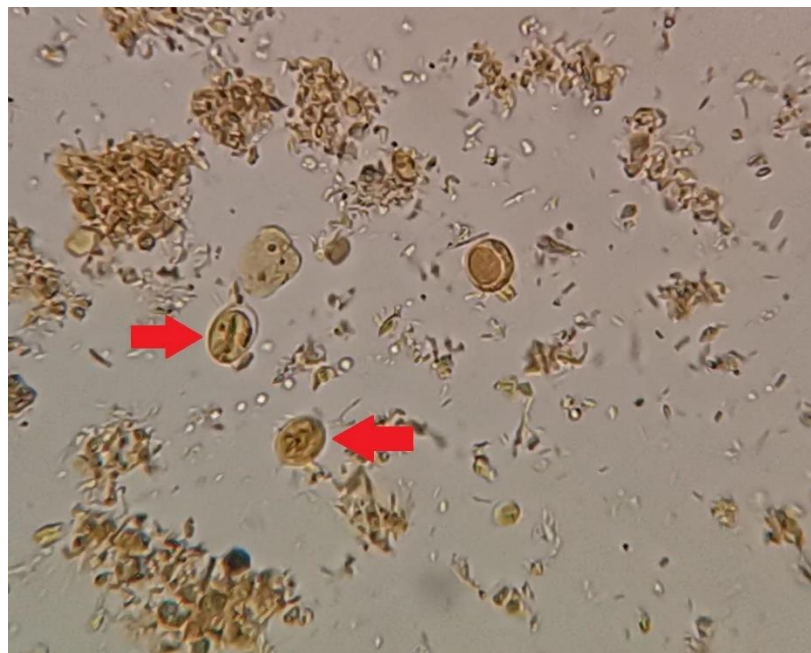
Postupak izvođenja flotacije:

1. Uzorak izmeta se temeljito izmiješa pomoću drvene špatule
2. Drvenom špatulom se uzima uzorak izmeta veličine oraha (5 do 10 grama)
3. Uzorak se stavlja u plastičnu čašicu i prelije zasićenom otopinom šećera
4. Dobro se promiješa uzorak dok se ne dobije homogena smjesa
5. Dobivena smjesa se prelije preko sita u drugu plastičnu čašicu
6. Uzorak se iz plastične čašice ulije u epruvetu za centrifugiranje
7. Dodaje se flotacijska tekućina dok ne nastane na koju se stavlja pokrovnica
8. Epruveta s pokrovnicom se oprezno stavlja u centrifugu

9. Uključuje se centrifuga na 1500 okretaja u minuti, u trajanju od 5 minuta
10. Nakon završenog centrifugiranja, pokrovnica se pažljivo uklanja s epruvete
11. Stavlja se na predmetnicu na način da strana koja je dodirivala tekućinu naliježe na predmetnicu
12. Preparat se pregledava pod mikroskopom pod povećanjem 400 puta

### 3.3. Pretraga uz bojenje Lugolovom otopinom

Postupak pretrage uz bojenje Lugolovom otopinom izvodi se na isti način kao i metoda flotacije s centrifugiranjem uz iznimku da se nakon centrifugiranja odstranjuje pokrovnica pa se pomoću mikropipete uzima 25  $\mu$ L tekućine sa površine. Uzorak se stavlja na predmetnicu te mu se dodaje 25  $\mu$ L Lugolove otopine. Plastičnim nastavkom na pipeti se lagano pomiješaju uzorak i Lugolova otopina. Takva mješavina se nanosi na predmetnicu, prekriva pokrovnicom te mikroskopira (Slika 3).

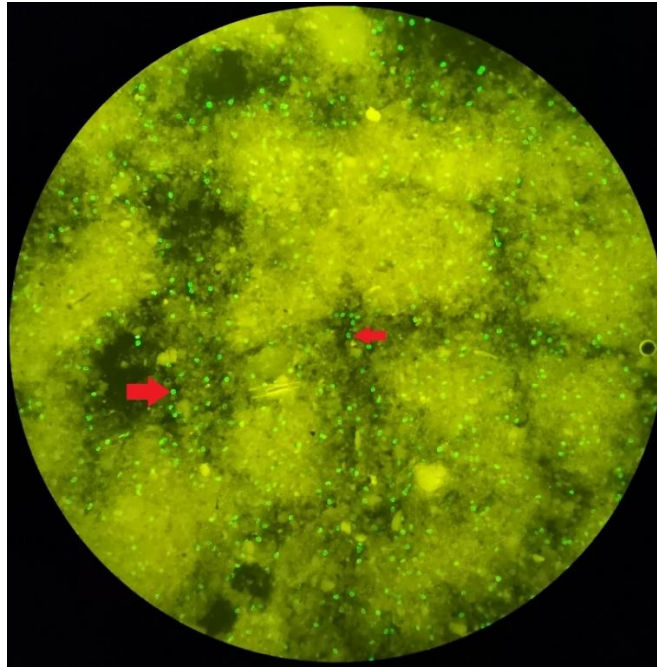


Slika 3. Prikaz giardije nakon bojenja Lugolovom otopinom, crvene strelice označavaju ciste giardije, povećanje 400x

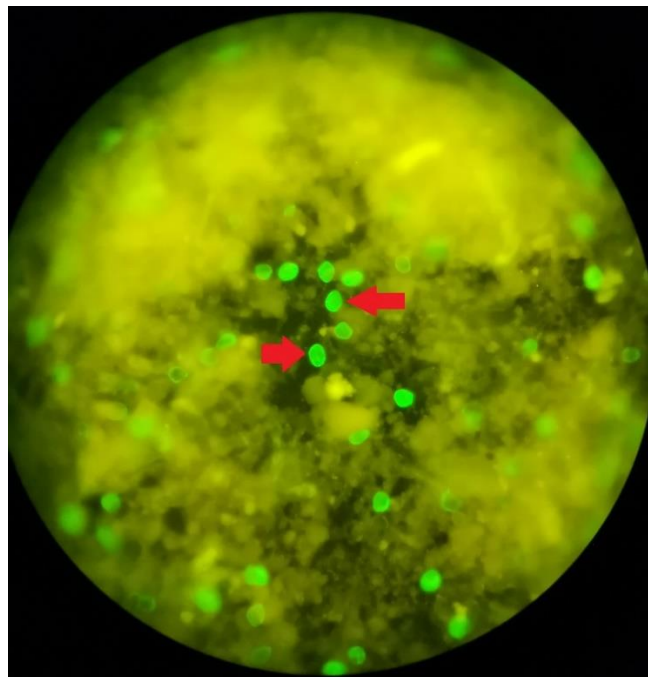
### 3.4. Izravna imunofluorescencija

Za izvođenje testa izravne imunofluorescencije koristi se komercijalni test MERIFLUOR® *Cryptosporidium/Giardia* test (Meridian bioscience, SAD). Temelj ovog testa je izravno vezanje specifičnih protutijela na površinske antigene cista *Giardia* spp. i oocista *Cryptosporidium* spp. U kitu se nalaze monoklonska protutijela koja su obilježena fluorescein

izotiocijanatom (FITC). Nakon što se vežu za antigene, reakcija se vizualizira fluoresciranjem koje je vidljivo pod ultraljubičastim svjetlom. Podloga se oboji crveno narančasto, a ciste fluorescirajuće zelenom bojom (Slika 4 i 5).



Slika 4. Izravna imunofluorescencija giardije, crvene strelice prikazuju ciste giardije, povećanje 40x



Slika 5. Prikaz giardije metodom izravne imunofluorescencije, crvene strelice označavaju ciste giardije, povećanje 100x

### 3.4.1. Postupak

Najprije se pripremi radna otopina tako da se pomiješa 400  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera (PBS) čiji pH iznosi 7,2, 80  $\mu\text{L}$  detekcijskog reagensa te 50  $\mu\text{l}$  kontrastnog sredstva u Eppendorf epruveti zapremine 2 ml. Vezujući medij se već nalazi u komercijalnom kitu, a ako ga ponestane može se samostalno pripremiti. Za pripremu je potrebno 900  $\mu\text{l}$  glicerina i 100  $\mu\text{l}$  fosfatnog pufera.

Priprema uzorka :

1. Nakon flotacije uzorka sa zasićenom otopinom šećera uz centrifugiranje se uzima 10 ml tekućine sa vrha epruvete zapremine 15 ml i unosi u epruvetu zapremine 50 ml
2. Kako bi se isprala flotacijska tekućina dodaje se vodovodna voda do oznake 50 ml
3. Slijedi centrifugiranje na 1500 okretaja u minuti u trajanju od 5 minuta
4. Supernatant se odlijeva u jednom potezu, a sediment se temeljito pomiješa na tresilici te se ponovno dodaje vodovodna voda do oznake 50 ml na epruveti
5. Ponavlja se centrifugiranje na 1500 okretaja u minuti u trajanju od 5 minuta
6. Supernatant se opet odlijeva u jednom potezu te se sediment temeljito mijesha na tresilici i koristi za daljnji postupak

Nanošenje uzorka i mikroskopiranje

1. Najprije se predmetnice koje se koriste za imunofluorescenciju moraju odmastiti metanolom i obilježiti
2. Pipetom se uzima 12  $\mu\text{L}$  sedimenta te se nanosi na polje predmetnice za imunofluorescenciju. Preporučljivo je uzorke nanositi samo u gornji red kako bi se spriječilo miješanje uzoraka
3. Pozitivna kontrola koja u sebi sadrži ciste gijardije u količini od 12  $\mu\text{L}$  se nanosi na posljednje polje na predmetnici
4. Tako pripremljeni uzorci na predmetnici se suše u temostatu
5. Na sve uzorke se nanosi 12  $\mu\text{L}$  radne otopine
6. Predmetnice za imunofluorescenciju na kojima se nalaze uzorci se poslažu u vlažnu komoru s prikladnim stalkom i vlažnim papirom. Slijedi inkubacija tijekom 60 minuta na 37°C

7. Kada se inkubacija završi, uzorci se ispiru s fosfatnim puferom te ponovo suše u termostatu
8. Nanosi se kap vezujućeg medija na svaki uzorak koji će se pretraživati te se pokrije velikom pokrovnicom (24 x 60 mm). Tako pripremljeni uzorci se mikroskopiraju uz pomoć fluorescentnog mikroskopa

### 3.5. Statistička obrada podataka

S obzirom da je metoda imunofluorescencije prihvaćena kao zlatni standard u dijagnostici parazita *Giardia* spp. (BARRERA i sur., 2024.), u ovome radu su s navedenim testom uspoređeni nalazi dobiveni metodom nativne flotacije i metodom flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom. Vrijednosti dobivene analizom podataka dobivenih iz ukupnog uzorka, uzorka prema spolu ukupno, te uzorka prema dobi, raspodijeljene su kao stvarno pozitivne (TP), stvarno negativne (TN), lažno pozitivne (FP) i lažno negativne (FN). Prevalencija je označena slovom P. Interval pouzdanosti (CI) je postavljen na 95%. Izračunata je osjetljivost (Sn; sposobnost testa da prepozna invadirane jedinke) i specifičnost (Sp; sposobnost testa da prepozna neinvadirane jedinke) testova na temelju sljedećih jednadžbi:

$$SN = TP / TP + FN$$

$$SP = TN / TN + FP$$

Pozitivne (PPV) i negativne prediktivne vrijednosti (NPV) govore nam koliko možemo biti sigurni da su životinje koje je test prepoznao kao invadirane uistinu i invadirane (PPV), odnosno da su one koje je test prepoznao kao neinvadirane uistinu i neinvadirane (NPV), a izračunate su na temelju sljedećih jednadžbi:

$$PPV = P \times osjetljivost / (P \times osjetljivost) + [(1-P) \times (1-specifičnost)]$$

$$NPV = (1-P) \times specifičnost / [(1-P) \times specifičnost] + (P \times (1-osjetljivost))$$

Youdenov indeks dobiven je na temelju jednadžbe:

$$J = (a/a+c) + (d/b+d) - 1$$

Pored toga testovi nativne flotacije i flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom uspoređeni su međusobno pomoću Cohen Kappa testa. Ovaj test ne govori nužno koja metoda je bolja, već samo daje njihovu međusobnu podudarnost.

Cohen Kappa test izračunat je za provjeru podudarnosti testova na temelju sljedeće jednadžbe:

$$OP = (a+d) / n$$

Gdje je: OP – opažena proporcija podudarnosti

$$n = (a+b+c+d)$$

$$EP = [(a+b) / n ] x [(a+c) / n] + [(c+d) / n ] x [(b+d) / n]$$

Gdje je: EP - očekivana proporcija podudarnosti.

$$Kappa\ test = OP - EP / (1 - EP)$$

Svi izračuni napravljeni su u WinEpi programu.



#### 4. REZULTATI

Rezultati pretraga izmeta pasa pomoću tri različite metode kumulativno prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Kumulativni prikaz nalaza u uzorcima izmeta pasa dobivenih različitim metodama.

	<b>Pozitivni</b>	<b>Negativni</b>
<b>Flotacija</b>	20	58
<b>Lugol</b>	24	54
<b>IF</b>	34	44

Iz Tablice 1 vidljivo je da je najveći broj pozitivnih pasa otkriven metodom imunofluorescencije, dok su metode flotacije nativno i flotacije s Lugolovom otopinom dali određeni broj lažno negativnih pasa, ukoliko usporedimo rezultate s imunofluorescencijom.

Tablica 2. Nalazi u uzorcima izmeta pasa u odnosu na dob dobivenih različitim metodama.

	<b>1 – 7 mj</b>	<b>7 mj – 2 god</b>	<b>2 – 5 god</b>	<b>5 – 8 god</b>	<b>&gt;8 god</b>
<b>Flotacija +</b>	8	5	1	1	5
<b>Flotacija -</b>	14	10	20	9	5
<b>Lugol +</b>	10	6	4	0	4
<b>Lugol -</b>	12	9	17	10	6
<b>IF +</b>	19	5	4	2	4
<b>IF -</b>	3	10	17	8	6

Prema rezultatima u Tablici 2 vidljive su varijacije u specifičnosti i osjetljivosti prema dobi, iako se to najvjerojatnije može pripisati razlikama u veličini uzorka te potencijalno u jačini invazije.

Tablica 3. Nalazi u uzorcima izmeta pasa u odnosu na spol.

	<b>Ženke</b>	<b>Mužjaci</b>
<b>Flotacija +</b>	10	10
<b>Flotacija -</b>	21	37
<b>Lugol +</b>	14	10
<b>Lugol -</b>	17	37
<b>IF +</b>	18	16
<b>IF -</b>	13	31

Tablica 3 prikazuje rezultate sva tri testa te je razvidna sličnost rezultata između obje metode flotacije, posebice u mužjaka. I ovoga puta obje metode daju više lažno negativnih rezultata.

#### **4.1. Usporedba testa IF i flotacije te IF i bojenja Lugolovom otopinom ukupno**

U Tablici 4 prikazana je usporedba metode flotacije nativno s imunofluorescencijom kao metodom odabira. Usporedba je provedena na temelju ukupno dobivenih rezultata.

Tablica 4. Prikaz usporedbe testa imunofluorescencije i flotacije nativno, ukupno.

Osjetljivost	58,8% (CI 95% 42,3% do 75,4%)
Specifičnost	100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%)
PPV	100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%)
NPV	75,9% (CI 95% 64,8% do 86,9%)
Prevalencija	38,6% (CI 95% 28,5% do 48,8%)
Testna prevalencija	25,6% (CI 95% 16,0% do 35,3%)
Youdenov indeks	58,8% (CI 95% 42,3% do 75,4%)

Kao što je ukazivala i Tablica 1, i ovdje je vidljivo da je specifičnost flotacije nativno 100% (CI 95% 100,0% do 100,0%), čime su ujedno i veće pozitivne prediktivne vrijednosti, PPV = 100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%). Osjetljivost je razmjerno niskih 58,8% (CI 95% 42,3% do 75,4%).

Tablica 5. Prikaz usporedbe testa imunofluorescencije i flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom ukupno.

Osjetljivost	70,6% (CI 95% 55,3% do 85,9%)
Specifičnost	100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%)
PPV	100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%)
NPV	81,5% (CI 95% 71,1% do 91,8%)
Prevalencija	43,6% (CI 95% 32,6% do 54,6%)
Testna prevalencija	30,8% (CI 95% 20,5% do 41,0%)
Youdenov indeks	70,6% (CI 95% 55,3% do 85,9%)

I ovdje (Tablica 5) je vidljiva visoka specifičnost metode bojenja Lugolovom otopinom,  $Sp = 100,0\%$  (CI 95% 100,0% do 100,0%). Za razliku od flotacije nativno, ovdje je osjetljivost nešto viša,  $Sn = 70,6\%$  (CI 95% 55,3% do 85,9%). Time ujedno nalazimo i više negativne prediktivne vrijednosti,  $NPV = 81,5\%$  (CI 95% 71,1% do 91,8%).

Rezultati dobiveni metodom flotacije nativno i flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom uspoređeni su međusobno pomoću Cohen Kappa testa. Dobivena je opažena proporcija podudarnosti od 90,2%, te očekivana proporcija podudarnosti od 58,6%. Na temelju prethodno navedene jednadžbe izračunat je Kappa koeficijent koji iznosi 0,764. Prema tablici ovakav koeficijent označava dobru podudarnost ova dva testa.

#### 4.2. Usporedba testa IF i flotacije te IF i bojenja Lugolovom otopinom prema spolu

U Tablici 6 prikazana je usporedba metode flotacije nativno s imunofluorescencijom kao metodom odabira. Usporedba je provedena na temelju ukupno dobivenih rezultata prema spolu.

Tablica 6. Prikaz usporedbe testa imunofluorescencije i flotacije nativno u mužjaka

Osjetljivost	62,5% (CI 95% 38,8% do 86,2%)
Specifičnost	100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%)
PPV	100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%)
NPV	83,8% (CI 95% 71,9% do 95,7%)
Prevalencija	34,0% (CI 95% 20,5% do 47,6%)
Testna prevalencija	21,3% (CI 95% 9,6% do 33,0%)
Youdenov indeks	62,5% (CI 95% 38,8% do 86,2%)

Rezultati analize ukazuju i dalje na visoku specifičnost,  $Sp = 100,0\%$  (CI 95% 100,0% do 100,0%) te samim time visoke pozitivne prediktivne vrijednosti,  $PPV = 100,0\%$  (CI 95% 100,0% do 100,0%). Osjetljivost je iznosila  $Sn = 62,5\%$  (CI 95% 38,8% do 86,2%), što je u konkretnom slučaju nešto više od osjetljivosti iste metode na primjeru ukupnog uzorka.

U Tablici 7 prikazani su rezultati usporedbe metode imunofluorescencije i flotacije nativno u uzorcima podrijetlom od ženki.

Tablica 7. Prikaz usporedbe testa imunofluorescencije i flotacije u ženki

Osjetljivost	55,6% (CI 95% 32,6% do 78,5%)
Specifičnost	100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%)
PPV	100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%)
NPV	61,9% (CI 95% 41,1% do 82,7%)
Prevalencija	58,1% (CI 95% 40,7% do 75,4%)
Testna prevalencija	32,3% (15,8% do 48,7%)
Youdenov indeks	55,6% (CI 95% 32,6% do 78,5%)

Rezultati ukazuju i dalje na visoku specifičnost,  $Sp = 100,0\%$  (CI 95% 100,0% do 100,0%) te samim time visoke pozitivne prediktivne vrijednosti,  $PPV = 100,0\%$  (CI 95% 100,0% do 100,0%). Osjetljivost je u ovome slučaju nešto niža od osjetljivosti dobivene pretragom ukupnog uzorka te iznosi  $Sn = 55,6\%$  (CI 95% 32,6% do 78,5%).

U Tablici 8 prikazane su usporedbe metoda imunofluorescencije i flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom u mužjaka.

Tablica 8. Prikaz usporedbe testa imunofluorescencije i bojenja Lugolovom otopinom u mužjaka

Osjetljivost	62,5% (CI 95% 38,8% do 86,2%)
Specifičnost	100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%)
PPV	100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%)
NPV	83,8% (CI 95% 71,9% do 95,7%)
Prevalencija	34,0% (CI 95% 20,5% do 47,6%)
Testna prevalencija	21,3% (CI 95% 9,6% do 33,0%)
Youdenov indeks	62,5% (CI 95% 38,8% do 86,2%)

I ovom usporedbom dobivena je visoka specifičnost,  $Sp = 100,0\%$  (CI 95% 100,0% do 100,0%) te samim time i visoke pozitivne prediktivne vrijednosti,  $PPV = 100,0\%$  (CI 95% 100,0% do 100,0%). Osjetljivost je u ovome slučaju istovjetna onoj pri flotaciji nativno.

U Tablici 9 prikazane su usporedbe metoda imunofluorescencije i flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom u ženki.

Tablica 9. Prikaz usporedbe testa imunofluorescencije i bojenja Lugolovom otopinom u ženki

Osjetljivost	77,8% (CI 95% 58,6% do 97,0%)
Specifičnost	100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%)
PPV	100,0% (CI 95% 100,0% do 100,0%)
NPV	76,5% (CI 95% 56,3% do 96,6%)
Prevalencija	58,1% (CI 95% 40,7% do 75,4%)
Testna prevalencija	45,2% (CI 95% 27,6% do 62,7%)
Youdenov indeks	77,8% (CI 95% 58,6% do 97,0%)

I ovom usporedbom dobivena je visoka specifičnost flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom,  $Sp = 100,0\%$  (CI 95% 100,0% do 100,0%) te samim time i visoke pozitivne prediktivne vrijednosti,  $PPV = 100,0\%$  (CI 95% 100,0% do 100,0%). Osjetljivost je u ovome slučaju viša negoli u mužjaka, ali i kod flotacije nativno, i iznosi  $Sn = 77,8\%$  (CI 95% 58,6% do 97,0%). Time su ujedno dobivene i nešto više negativne prediktivne vrijednosti,  $NPV = 76,5\%$  (CI 95% 56,3% do 96,6%).

Rezultati dobiveni metodom flotacije nativno i flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom uspoređeni su prema spolu pomoću Cohen Kappa testa. Na uzorcima podrijetlom od mužjaka dobiven je Kappa koeficijent 1, odnosno visoka podudarnost testova. Usporedbom testova provedenih na uzorcima podrijetlom od ženki dobivena je opažena proporcija podudarnosti od 77,1%, odnosno očekivana proporcija podudarnosti od 52,0%. Izračunom je dobiven Kappa koeficijent od 0,524, što označava zadovoljavajuću podudarnost.

### **4.3. Ograničenja**

Postoji nekoliko potencijalnih izvora limitiranosti ovoga istraživanja. Među njima je svakako veličina uzorka, ali i neujednačenost uzorka po spolu i dobi za pojedinačni dio testiranja.

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju su uspoređeni dijagnostički rezultati dobiveni korištenjem tri različita testa i to; flotacije s centrifugiranjem, flotacije s centrifugiranjem i bojenjem Lugolovom otopinom te izravne imunofluorescencije. Prve dvije tehnike se najčešće koriste u rutinskim uvjetima pored imunokromatografskog testa koji nije korišten u ovom istraživanju. Izravna imunofluorescencija je metoda koja se koristi uz upotrebu sofisticirane optičke opreme i izvodi se uglavnom u specijaliziranim laboratorijima veterinarske dijagnostike. Treba naglasiti da u literaturi postoje različita razmišljanja o zlatnom standardu dijagnostike giardioze u pasa. Neki autori za zlatni standard koriste test flotacije zasićenom otopinom cinkova sulfata (ZSCT), dok pak drugi ističu prikladnost izravne imunofluorescencije i to prvenstveno zbog njene visoke specifičnosti i osjetljivosti u istraživanjima na ljudima i opće prihvaćenog mišljenja da je riječ o metodi postavljenoj kao zlatni standard (GARCIA i sur., 1992.; GARCIA i SHIMIZU, 1997.; MARKS i sur., 2004.; JOHNSTON i sur., 2003.; BARRERA i sur., 2024.). Iako se neko vrijeme primjena ZSCT testa smatrala zlatnim standardom za dijagnozu bičšaša *G. duodenalis* u pasa (DRYDEN i sur., 2006.), RISHNIW i sur. (2010.) su to nedavno doveli u pitanje. Oni su naime utvrdili da je ZSCT imao loše rezultate, čak i kada su rezultati uzastopnih uzoraka objedinjeni. S druge strane, iako ZSCT i SNAP® Giardia test nisu bili tako osjetljivi kao IFA, imali su vrlo slične rezultate. Ovo je potkrijepljeno usporednim studijama koje koriste Bayesovu analizu, gdje je IFA bila osjetljivija od jednostavne mikroskopije ili SNAP® Giardia testa u pasa (GEURDEN i sur., 2008.; TRAUB i sur., 2009.). Kada je ZSCT test pozitivan na bičšaša *G. duodenalis*, obično se smatra da su PPV 100% (BARR i sur., 1992.). Centrifugiranje u gradijentu saharoze praćeno IFA prilično je skupo u usporedbi s tim i stoga nije praktično niti se naširoko koristi kao dijagnostička tehnika u veterinarskim klinikama.

Međutim, pokazalo se da je to osjetljiva metoda, otkrivajući *G. duodenalis*-pozitivne uzorke pasa i kada je bilo prisutno samo 10 cista po 1 g izmeta. U ovom istraživanju nije korišten cinkov sulfat, već zasićena šećerna otopina pa su rezultati analizirani u odnosu na izravnu imunofluorescenciju. Usporedbom oba testa s rezultatima testa izravnom imunofluorescencijom utvrđeno je da imaju izrazito visoku specifičnost (100%), dok je osjetljivost niža i iznosi 70,6% za test flotacije s bojenjem Lugolovom otopinom, odnosno 58,8% za test flotacije. Ovakav rezultat je u suglasnosti s rezultatima MEKARU i sur. (2007.) koji su u slučaju flotacije utvrdili specifičnost od 99,7% (CI 95% 98,2 - 100,0), te nešto višu osjetljivost od 85,3% (CI 95% 68,9 - 95,1). Utvrđena specifičnost od 100% ujedno ukazuje na činjenicu da će testom sve negativne jedinice biti otkrivene, ali zbog pojave većeg udjela lažno

negativnih jedinki, oba testa daju veću dijagnostičku sigurnost u pozitivan nalaz testa. Drugim riječima dobivamo visoke pozitivne prediktivne vrijednosti i visoku sigurnost da su životinje proglašene ovim testovima kao pozitivne uistinu i pozitivne. Kako je i očekivano, metoda flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom je nešto pouzdanija metoda samim time što je vizualizacija parazita lakša, te uz visoku specifičnost daje i nešto višu osjetljivost (70,6% vs. 58,8%) u odnosu na običnu metodu flotacije. To ujedno znači i nešto višu sigurnost da su jedinke koje su proglašene testom kao negativne uistinu i negativne (NPV iznosi 81,5%). Youdenov indeks kombinira specifičnost i osjetljivost u jednu vrijednost koja se kreće između -1 (obje vrijednosti su jednake 0%) i 1 (obje vrijednosti su jednake 100%). U ovom slučaju on iznosi 0,706.

Do danas je u nizu studija objavljena uspješnost različitih dijagnostičkih testova za ovog protozoona u pasa (ZIMMER i BURRINGTON, 1986.; DECOCK i sur., 2003.; CIRAK i BAUER, 2004.; DRYDEN i sur., 2006.; GEURDEN i sur., 2008.; TRAUB i sur., 2009.; COSTA i sur., 2016.). COSTA i sur. (2016.) istraživanjima prikladnosti brzog testa SNAP<sup>®</sup> Giardia utvrdili su izvrsne vrijednosti PPV za sve stope prevalencije, ali odličan NPV samo za nisku prevalenciju. Epidemiološki gledano ovakav nalaz je i očekivan. Naime, prediktivne vrijednosti su ovisne o prevalenciji i niža prevalencija zapravo očekivano podiže negativne prediktivne vrijednosti. Budući da je prevalencija vjerojatno niska (<15%) u kliničkim uvjetima, COSTA i sur. (2016.) predlažu da ovi testovi mogu biti od pomoći, iako posebno naglašavaju značajno manju osjetljivost od kombinacije flotacije cinkovim sulfatom i brzog testa. Za napomenuti je da se lančana reakcija polimerazom sve više koristi kao jedini dijagnostički test za procjenu prevalencije *G. duodenalis* (SANTÍN i sur., 2006.; YANG i sur., 2009.; NG i sur., 2011.). Njegova osjetljivost u otkrivanju protozoona u pasa u usporedbi s mikroskopiranjem je dokazana detaljnim istraživanjima (SCARAMOZZINO i sur., 2009.; TRAUB i sur., 2009.). U mačaka, istraživanja kojima je procijenjena prevalencija protozoona lančanom reakcijom polimerazom su pokazala "veću invadiranost" u usporedbi bilo s ELISA testom ili mikroskopiranjem, a slični rezultati dobiveni su i u istraživanjima u goveda i pasa (MCGLADE i sur., 2003.; SANTÍN i sur., 2009.; PAPINI i sur., 2013.).

Rezultati ovog istraživanja, potkrijepljeni su sličnim istraživanjem prisutnosti protozoona u djece, gdje nisu svi mikroskopski pozitivni uzorci potvrđeni PCR-om (DAVID i sur., 2011.). Pregledom literature smo uočili brojne kontradiktornosti, kao i ograničenja u analizi rezultata. To je posebno vidljivo u studiji koju su proveli UEHLINGER i sur. (2017). Moguće je da je broj cista u PCR-pozitivnim, a IFA-negativnim uzorcima bio premali da bi se



mogao otkriti mikroskopskim tehnikama ili da tehnike flotacije nisu otkrile puknute. Nadalje, antigen se može izlučiti u situacijama kada ciste nisu intaktne. Stoga se specifičnost PCR-a može podcijeniti zbog usporedbe s nesavršenim testom. Međutim, u okolnostima kada je koncentracija cista niska, testovi koji se temelje na detekciji antigena, kao što su SNAP® Giardia i ProSpecT® testovi, ipak bi trebali biti osjetljiviji od mikroskopije i trebali bi se barem približiti rezultatima PCR-a, kao što su pokazali MCGLADE i sur. (2003.).

Nadalje, svi PCR-negativni, IFA-pozitivni uzorci također su bili pozitivni na jedan ili više drugih testova što je rezultiralo visokom stopom lažno negativnih rezultata za PCR test i sugeriralo smanjenu osjetljivost PCR metode. Nehomogena distribucija cista unutar uzorka, neuspjeh lize ciste tijekom obrade i inhibitori, koji su česti u uzorcima izmeta, mogli bi dovesti do neuspjeha umnažanja DNK *G. duodenalis* pomoću PCR-a i mogli bi rezultirati nepodudarnim rezultatima između testova (DAVID i sur., 2011.). Poseban zahtjev za metodu flotacije je da ista uz svoju jednostavnu primjenu ipak zahtijeva stručno i iskusno osoblje, što najviše utječe na rezultat testa.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Usporedbom rezultata flotacije i flotacije sa bojenjem s rezultatima testa izravnom imunofluorescencijom utvrđeno je da imaju izrazito visoku specifičnost (100%), dok je osjetljivost niža i iznosi 70,6% za test flotacije s bojenjem Lugolovom otopinom, odnosno 58,8% za test flotacije.

2. Utvrđena specifičnost izravne imunofluorescencije od 100% ujedno ukazuje na činjenicu da će testom sve negativne jedinice biti otkrivene, ali zbog pojave većeg udjela lažno negativnih jedinica, oba testa daju veću dijagnostičku sigurnost u pozitivan nalaz testa.

3. Kako je i očekivano, metoda flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom je nešto pouzdanija metoda samim time što je vizualizacija parazita lakša, te uz visoku specifičnost daje i nešto višu osjetljivost (70,6% vs. 58,8%) u odnosu na metodu flotacije bez bojenja.

## 7. LITERATURA

- ALLES, A. J., M. A. WALDRON, L. S. SIERRA, A. R. MATTIA (1995): Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1632-1634.
- ANDERSON, A. (2020): The Parasite *Giardia*. Thesis, University of Nebraska-Lincoln, Veterinary science, College of Agriculture and Natural Resources, Lincoln, Nebraska.
- AOKI, V., L. M. I. FUKUMORI, E. L. FREITAS, J. X. SOUSA Jr., A. M. PÉRIGO, Z. N. P. OLIVEIRA (2010): Direct and indirect immunofluorescence. *An. Bras. Dermatol.* 85, 490-499.
- BARR, S. C., D. D. BOWMAN, H. N. ERB (1992): Evaluation of two test procedures for diagnosis of giardiasis in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 53, 2028-2031.
- BARRERA, J. P., G. MIRÓ, D. CARMENA, C. FONCUBIERTA, J. SARQUIS, V. MARINO, E. ESTÉVEZ-SÁNCHEZ, B. BAILO, R. CHECA, A. MONTOYA (2024): Enhancing diagnostic accuracy: Direct immunofluorescence assay as the gold standard for detecting *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in canine and feline fecal samples. *BMC Vet. Res.* 20, 445-456.
- BOUZID, M., K. HALAI, D. JEFFREYS, P. R. HUNTER (2015): The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Vet. Parasitol.* 207, 181-202.
- CIRAK, V. Y., C. BAUER (2004): Comparison of conventional coproscopical methods and commercial coproantigen ELISA kits for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dogs and cats. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 117, 410-413.
- COSTA, M., C. CLARKE, S. MITCHELL, K. PAPASOULIOTIS (2016): Diagnostic accuracy of two point-of-care kits for the diagnosis of *Giardia* species infection in dogs. *J. Small. Anim. Pract.* 57, 318-322.
- DAVID, E. B., S. T. CORADI, T. C. G. OLIVEIRA-SEQUEIRA, P. E. M. RIBOLLA, S. KATAGIRI, S. GUIMARÃES (2010): Diagnosis of *Giardia* infections by PCR-based methods in children of an endemic area. *J. Venom. Anim. Toxins. incl. Trop. Dis.* 17, 209-215.
- DECOCK, C., M. C. CADIERGUES, M. LARCHER, S. VERMONT, M. FRANC (2003): Comparison of two techniques for diagnosis of giardiasis in dogs. *Parasite.* 10, 69-72.
- DEPLAZES, P., J. ECKERT, A. MATHIS, G. von SAMSON-HIMMELSTJERNA, H. ZAHNER (2016): *Parasitology in Veterinary Medicine*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, str. 47-571.

DRYDEN, M. W., P. A. PAYNE, V. SMITH (2006): Accurate diagnosis of *Giardia* spp and proper fecal examination procedures. *Vet. Ther.* 7, 4-14.

EL-NAHAS, H. A., D. A. SALEM, A. A. EL-HENAWY, H. I. EL-NIMIR, H. A. ABDEL-GHAFFAR, A. M. EL-MEADAWY (2013): *Giardia* diagnostic methods in human fecal samples: A comparative study. *Cytometry B Clin. Cytom.* 84, 44-49.

GARCIA, L. S., A. C. SHUM, D. A. BRUCKNER (1992): Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 30, 3255–3257.

GARCIA, L. S., R. Y. SHIMIZU (1997): Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1526–1529.

GEURDEN, T., D. BERKVEN, S. CASAERT, J. VERCRUYSSSE, E. CLAEREBOUT (2008): A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 157, 14-20.

GUNN, A., S. J. PITT (2022): *Parasitology, An Integrated Approach*. 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd, Oxford, UK, str. 687-738.

HAMNES, I. S., B. K. GJERDE, L. J. ROBERTSON (2007): A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the dogs during their first year of life. *Acta Vet. Scand.* 49, 248-258.

HAMNES, I. S., B. GJERDE, L. ROBERTSON, T. VIKØREN, K. HANDELAND (2006): Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in free-ranging wild cervids in Norway. *Vet. Parasitol.* 141, 30-41.

HARAPIN, I., LJ. BEDRICA, V. MRLJAK, N. KUČER, V. MATIJATKO, I. KIŠ, M. BRKLJAČIĆ, M. TORTI, D. GRAČNER, D. POTOČNJAK, M. CRNOGAJ, I. ŠMIT, I. MAYER, D. GRDEN, D. CAPAK, B. PIRKIĆ, M. KRESZINGER, M. STEJSKAL, H. BOROŠAK, A. MUSULIN, M. PEĆIN, D. VNUK, A. GUDAN KURILJ, A. BECK, F. BOŽIĆ, D. SAKAR, J. ŠURAN, E. SREBOČAN, A. PREVENDAR CRNIĆ, Ž. MIKULEC, V. ŠERMAN, N. MAS, T. KARADJOLE, N. MAČEŠIĆ, V. BUTKOVIĆ, D. STANIN, M. ŠEHIĆ, Z. VRBANAC, V. STEVANOVIĆ, J. HABUŠ, T. ŽIVIČNJAK (2011): Bolesti i liječenje pasa i mačaka, Veterinarski fakultet Zagreb, Zagreb, str. 115-481.

HENDRIX, C. M., E. ROBINSON (2023): *Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians*. 6th ed., Elsevier. Inc., Missouri, str. 139-285.

HOOSHYAR, H., P. ROSTAMKHANI, M. ARBABI, M. DELAVARI (2019): *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench.* 12, 3-12.

JOHNSTON, S. P., M. M. BALLARD, M. J. BEACH, L. CAUSER, P. P. WILKINS (2003): Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41, 623–626.

JEREZ PUEBLA, L. E., F. A. NÚÑEZ, L. ROJAS RIVERO, Y. ROBAU HERNÁNDEZ, I. ATENCIO MILLÁN, N. MÜLLER (2017): Prevalence of intestinal parasites and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from dogs in La Habana, Cuba. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* 8, 107-112.

KURNOSOVA, O. P., O. A. PANOVA, M. V. ARISOV (2024): Prevalence of *Giardia duodenalis* in dogs and cats: Age-related predisposition, symptomatic, and asymptomatic cyst shedding. *Vet. World.* 17, 379-383.

LÓPEZ-ARIAS, Á., D. VILLAR, S. LÓPEZ-OSORIO, D. CALLE-VÉLEZ, J. J. CHAPARRO-GUTIÉRREZ (2019): *Giardia* is the most prevalent parasitic infection in dogs and cats with diarrhea in the city of Medellín, Colombia. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* 18, 328-331.

MARKS, S. L., T. E. HANSON, A. C. MELLI (2004): Comparison of direct immunofluorescence, modified acid-fast staining, and enzyme immunoassay techniques for detection of *Cryptosporidium* spp. in naturally exposed kittens. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225, 1549–1553.

McGLADE, T. R., I. D. ROBERTSON, A. D. ELLIOT, R. C. A. THOMPSON (2003): High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Vet. Parasitol.* 110, 197-205.

MEKARU, S. R., S. L. MARKS, A. J. FELLE, N. CHOUICHA, P. H. KASS (2007): Comparison of direct immunofluorescence, immunoassays, and fecal flotation for detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in naturally exposed cats in 4 Northern California animal shelters. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 959–965.

NG, J., R. YANG, S. McCARTHY, C. GORDON, N. HIJAWI, U. RYAN (2011): Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. *Vet. Parasitol.* 176, 145-50.

NYDAM, D. V., S. E. WADE, S. L. SCHAAF, H. O. MOHAMMED (2001): Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp cysts shed by dairy calves after natural infection. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1612-1615.

ORTEGA-PIERRES, M. G., S. CACCIÓ, R. FAYER, T. MANK, H. SMITH, R. C. A. THOMPSON (2009): *Giardia* and *Cryptosporidium* From Molecules to Disease, CABI, Oxfordshire, UK, str. 1-4.

PAPINI, R., G. CARRERAS, M. MARANGI, F. MANCIANTI, A. GIANGASPERO (2013): Use of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of *Giardia duodenalis* in dog stools in the environment: a Bayesian evaluation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25, 418-422.

PAVLOVIC, I. N. (2023): The influence of climatic factors on the prevalence of contamination of green areas in Belgrade by dog parasites. *J. Int. Sci. Publ.* 17, 211-216.

PIVA, B., M. BENCHIMOL (2004): The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol. Cell.* 96, 735-746.

RANA, T. (2024): Principles and Practices of Canine and Feline Clinical Parasitic Diseases, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, str. 20-247.

RISHNIW, M., J. LIOTTA, M. BELLOSA, D. BOWMAN, K. W. SIMPSON (2010): Comparison of 4 *Giardia* diagnostic tests in diagnosis of naturally acquired canine chronic subclinical giardiasis. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 293-297.

ROJAS-LÓPEZ, L., R. C. MARQUES, S. G. SVÄRD (2022): *Giardia duodenalis*. *Trends Parasitol.* 38, 605-606.

SAARI, S., A. NÄREAHO, S. NIKANDER (2019): Canine parasites and parasitic diseases, Elsevier. Inc., Missouri, str. 29-254.

SANTÍN, M., J. M. TROUT, R. FAYER (2009): A longitudinal study of *Giardia duodenalis* genotypes in dairy cows from birth to 2 years of age. *Vet. Parasitol.* 162, 40-45.

SANTÍN, M., J. M. TROUT, J. A. C. VECINO, J. P. DUBEY, R. FAYER (2006): *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. *Vet. Parasitol.* 141, 334-339.

SCARAMOZZINO, P., D. Di CAVE, F. BERRILLI, C. D'ORAZI, A. SPAZIANI, S. MAZZANTI, F. SCHOLL, C. De LIBERATO (2009): A study of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting kennelled dogs. *Vet. J.* 182, 231-234.

SCORZA, V., M. R. LAPPIN (2021): Giardiasis, U: Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat. 5th ed. (SKYES J. E.), Elsevier. Inc., Missouri, str. 1263-1277.

TAYLOR, M. A., R. L. COOP, R. L. WALL (2007): Veterinary parasitology, 3rd ed., Blackwell publishing Ltd., Garsington Road, Oxford, str. 75.

TRAUB, R. J., T. INPANKAEW, S. A. REID, C. SUTTHIKORNCHAI, Y. SUKTHANA, I. D. ROBERTSON, R. C. A. THOMPSON (2009): Transmission cycles of *Giardia duodenalis*

in dogs and humans in Temple communities in Bangkok--a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop.* 111, 125-132.

UEHLINGER, F. D., S. A. NAQVI, S. J. GREENWOOD, J. T. McCLURE, G. CONBOY, R. O'HANDLEY, H. W. BARKEMA (2017): Comparison of five diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in fecal samples from young dogs. *Vet. Parasitol.* 244, 91-96.

YANG, R., C. JACOBSON, C. GORDON, U. RYAN (2009): Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia. *Vet. Parasitol.* 161, 19-24.

ZAJAC, A. M., G. A. CONBOY, S. E. LITTLE, M. V. REICHARD (2021): *Veterinary Clinical Parasitology*. 9th ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, str. 2-379.

ZHAO, Z.-Y., M.-H. LI, C. LYU, X.-Z. MENG, Y.-F. QIN, X.-B. YANG, N. MA, Q. ZHAO, Y. ZHANG, J. JIANG (2022): Prevalence of *Giardia duodenalis* among dogs in China from 2001 to 2021: A systematic review and meta-analysis. *Foodborne Pathog. Dis.* 19, 179-191.

ZIMMER, J. F., D. B. BURRINGTON (1986): Comparison of four protocols for the treatment of canine giardiasis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 22, 168-172.

## 8. SAŽETAK

### Usporedba dijagnostičkih postupaka u pretrazi izmeta pasa na prisutnost cisti *Giardia duodenalis*

Romana Tikvić

U ovom istraživanju uspoređeni su rezultati tri dijagnostička testa za giardiozu pasa pretraživanjem izmeta. Uzorci izmeta prikupljeni su od 78 uzoraka pasa. Uzorci su od svakog pas prikupljeni u tri navrata. Uzorci su sakupljeni neovisno o dobi, spolu i pasmini psa. Nakon izvršene pretrage provedena je statistička analiza. S obzirom da je metoda imunofluorescencije prihvaćena kao zlatni standard u dijagnostici giardioze pasa, u ovome radu su s navedenim testom uspoređeni nalazi dobiveni metodom native flotacije i metodom flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom. Vrijednosti dobivene analizom podataka dobivenih iz ukupnog uzorka, uzorka prema spolu te uzorka prema dobi, raspodijeljene su kao stvarno pozitivne (TP), stvarno negativne (TN), lažno pozitivne (FP) i lažno negativne (FN). Izračunata je osjetljivost i specifičnost svakog testa. Pored toga rezultati flotacije i flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom uspoređeni su međusobno pomoću Cohen Kappa testa. Izračunat je i Youdenov indeks. Usporedbom rezultata flotacije i flotacije sa bojenjem s rezultatima testa izravnom imunofluorescencijom utvrđeno je da imaju izrazito visoku specifičnost (100%), dok je osjetljivost niža i iznosi 70,6% za test flotacije s bojenjem Lugolovom otopinom, odnosno 58,8% za test flotacije. Utvrđena specifičnost izravne imunofluorescencije od 100% ujedno ukazuje na činjenicu da će testom sve negativne jedinice biti otkrivene, ali zbog pojave većeg udjela lažno negativnih jedinki, oba testa daju veću dijagnostičku sigurnost u pozitivan nalaz testa. Kako je i očekivano, metoda flotacije uz bojenje Lugolovom otopinom je nešto pouzdanija metoda samim time što je vizualizacija parazita lakša, te uz visoku specifičnost daje i nešto višu osjetljivost (70,6% vs. 58,8%) u odnosu na metodu flotacije bez bojenja.

Ključne riječi: giardioza, izmet, imunofluorescencija, specifičnost, osjetljivost



## 9. SUMMARY

Comparison of diagnostic procedures in the search of dog feces for the presence of *Giardia duodenalis* cysts

Romana Tikvić

In this study, the results of three diagnostic tests for canine giardiasis by fecal examination were compared. Fecal samples were collected from 78 dog samples. Samples were collected from each dog on three occasions. Samples were collected regardless of age, sex and breed of dog. After the examination, a statistical analysis was performed. Since the immunofluorescence method is accepted as the gold standard in the diagnosis of canine giardiasis, in this study, the findings obtained by the native flotation method and the flotation method with Lugol's solution staining were compared with the aforementioned test. The values obtained by analyzing the data obtained from the total sample, sample by sex and sample by age were distributed as true positive (TP), true negative (TN), false positive (FP) and false negative (FN). The sensitivity and specificity of each test were calculated. In addition, the results of flotation and flotation with Lugol's solution staining were compared with each other using the Cohen Kappa test. The Youden index was calculated. Comparing the results of flotation and flotation with staining with the results of the direct immunofluorescence test, it was found that they have an extremely high specificity (100%), while the sensitivity is lower (70.6%) for the flotation test with Lugol's solution staining and 58.8% for the flotation test. The determined specificity of direct immunofluorescence (100%) indicates that all negative individuals will be detected by the test, but due to the occurrence of a higher proportion of false-negative individuals, both tests provide greater diagnostic certainty in a positive test result. As expected, the flotation method with Lugol's solution staining is a slightly more reliable method simply because visualization of the parasite is easier, and in addition to high specificity, it also provides a slightly higher sensitivity (70.6% vs. 58.8%) compared to the flotation method without staining.

Key words: giardiasis, feces, immunofluorescence, specificity, sensitivity

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 29.04.1998. godine u Malom Lošinj u gdje sam i odrasla. Osnovnu školu Maria Martinolića u Malom Lošinj završila sam 2013. Iste godine upisujem srednju školu Ambroza Haračića, smjer Opća gimnazija, također u Malom Lošinj.

Prvu godinu integriranog preddiplomskog i diplomskog studija veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisujem 2017. godine. Na petoj godini se opredjeljujem za usmjerenje Kućni ljubimci.

Sudjelujem na Danu karijera u Malom Lošinj 2023. te predstavljam fakultet Veterinarske medicine u Zagrebu. Prisustvovala na 8. Kongresu veterinarima male prakse Hrvatske održanom u Zadru 2023. godine. Kroz 2023. i 2024. godinu pohađam razna cjelodnevna predavanja i seminare. Sudjelovala sam na Danu anestezije i menadžmenta boli u Zagrebu 2024. godine.