

# UTJECAJ BIČAŠA GIARDIA DUODENALIS NA POJAVNOST I INTENZITET PROBAVNIH SIMPTOMA U PASA

---

Šmit, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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:178:135939>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Iva Šmit

**UTJECAJ BIČAŠA *GIARDIA*  
*DUODENALIS* NA POJAVNOST I  
INTENZITET PROBAVNIH SIMPTOMA U  
PASA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Dalibor Potočnjak

dr. sc. Relja Beck

Zagreb, 2015



University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb

Iva Šmit

**THE INFLUENCE OF PROTOZOA  
GIARDIA DUODENALIS ON  
APPEARANCE AND INTENSITY OF  
GASTROINTESTINAL SYMPTOMS IN  
DOGS**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

prof. dr. sc. Dalibor Potočnjak

dr. sc. Relja Beck

Zagreb, 2015

*Zahvaljujem svojim dragim mentorima, prof. dr. sc. Daliboru Potočnjaku i dr. sc. Relji Becku. Bili ste inspiracija, podrška i oličenje strpljenja i razumijevanja u ovom dugom, dugom procesu nastanka moje doktorske disertacije. Hvala Vam na nesebičnom angažmanu i velikodušnosti.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Vesni Matijatko i dr. sc. Mirni Brkljačić. Hvala Vam što se na Vaše savjete i bezgraničnu podršku uvijek mogu osloniti.*

*Zahvaljujem svim svojim fantastičnim kolegicama i kolegama koji su preuzeli teret stručnog posla u ambulanti i omogućili mi da pišem i koji su me svakodnevno bodrili i davali mi vjetar u leđa. Mirna, Ivana, Jelena, Ines, Iva, Gabi, Martina, Karol, Darko i Marin; ponosna sam i sretna što vas imam za kolege i prijatelje.*

*Također, veliko hvala prof. dr. sc. Borisu Habrunu i dr. sc. Miri Beniću sa Hrvatskog veterinarskog instituta na stručno pruženoj pomoći.*

*Veliko hvala i svima ostalima koji su s namjerom, ili pak posve slučajno pridonijeli nastanku moje doktorske disertacije. Prof. dr. sc. Ljubo Barbić, doc. dr. sc. Suzana Hađina, Valentina Gusak, Tihana Brkljačić, ....hvala vam!*

*I na kraju, ogromno hvala mojoj obitelji, Ariani, Loti i Damiru te bakama, tetama, dedama i ujacima što su me junački podnosili, podržavali i pomagali. Bez svih vas bi ova avantura bila nemoguća.*

## SAŽETAK

### Utjecaj bičaša *Giardia duodenalis* na pojavnost i intenzitet probavnih simptoma u pasa

Ključne riječi: *Giardia duodenalis*, genske skupine, pas, probavni simptomi

Kako paraziti (naročito iz roda *Giardia*) pripadaju u izrazito česte uzročnike probavnih simptoma u pasa vrlo je važno odrediti utjecaj *G. duodenalis* na pojavnost i intenzitet probavnih simptoma u pasa. U ovo istraživanje su bila uključena 82 psa. Svi uzorci stolice pretraženi su na postojanje parazita metodom flotacije te neposrednom imunofluorescencijom, a tipizacija svih giardija provedena je izdvajanjem ukupne DNA, umnažanjem specifičnog odsječka DNA i određivanjem nukleotidnog sljeda pročišćenog proizvoda za svaki pojedini izolat. Psi su podijeljeni na dvije osnovne skupine: psi s probavnim simptomima (simptomatski, n=42) i psi bez prisutnih probavnih simptoma (asimptomatski, n=40). Formirane su skupine pasa ovisno o pojedinom genskom tipu *G. duodenalis*. U svrhu kliničke procjene intenziteta bolesti korišten je bodovni sustav koji obuhvaća 12 kliničkih simptoma.

U pretraživanih pasa dokazane su giardije vrsno specifičnih genskih skupina C i D. Nije utvrđena statistički značajna razlika u pojavnosti *G. duodenalis* između pasa sa simptomima i pasa bez kliničkih simptoma, kao niti razlike u učestalosti pojedinih kliničkih simptoma između skupine simptomatskih pasa u kojih je izolirana *G. duodenalis* genske skupine C ili D, osim učestalosti pojave sluzi u stolici koja je učestalija u pasa invadiranih genskom skupinom C. Intenzitet kliničkih simptoma statistički se značajno ne razlikuje između pasa s i bez utvrđene giardije. U skupini pasa invadiranih giardijom veći je udio slučajeva kroničnog tijeka bolesti. Statistički je bila značajna povezanost istovremenih invazija *G. duodenalis* s *Cryptosporidium spp* (<0.0001). Vrijednosti intenziteta kliničkih simptoma vrlo slabo su povezane s pojavom različitih parazita u stolici pasa, a psi s giardijom istovremeno su invadirani većim brojem drugih parazita, nego psi bez giardije. Nađena je statistički značajno viša aktivnost lipaze i CPK te statistički značajno niža koncentracija ureje i aktivnosti ALT u serumu pasa invadiranih s *G. duodenalis*. Opažene razlike u vrijednostima hematoloških i biokemijskih pokazatelja krvi između pasa invadiranih genskim C i D skupinama nisu statistički značajne.

## SUMMARY

### **The influence of protozoa *Giardia duodenalis* on appearance and intensity of gastrointestinal symptoms in dogs**

#### Introduction

*Giardia* has a wide range of host species and is a common cause of diarrheal disease in humans and animals. Molecular data have defined seven genetic assemblages of *Giardia duodenalis*, named A-G. Humans are infected with assemblages A and B, dogs primarily with C and D, but dogs can also be infected with assemblages A and B, and are able to transmit these zoonotic assemblages to their owners. The epidemiology and clinical impact of infections with this parasite in dogs is still not completely understood due to variable results across different studies. The aim of this study was to analyze giardia assemblage prevalence in dogs and influence of giardia assemblage on clinical symptoms and its intensity. The aim of this study was also to analyze whether co-invasion of different giardia assemblages with other parasites/pathogens has influence on clinical symptoms and its intensity.

#### Materials and methods

This research included 82 dogs (older than one year) that were admitted to the Clinic for Internal Medicine, University of Zagreb. The dogs were symptomatic (n=42) and asymptomatic (n=40). All fecal samples were examined for intestinal parasites by direct microscopic examination after the flotation technique and by immunofluorescence, and giardia positive samples were subjected to further genetic characterization by using PCR of small subunit ribosomal DNA (*Ssu rRNA* gene) genes. Stool samples were examined for the presence of *C. perfringens* by fecal culture in 5% sheep blood agar. Data on clinical symptoms, blood hematology and biochemistry were collected from the database of the Clinic for Internal Medicine, and a scoring system for the intensity of 12 gastrointestinal symptoms was constructed.

Statistical analysis was done by Stata 13.1 (Stat Corp. USA).

## Results

Prevalence rates for giardia were 30.4% (25/82) in all dogs: 30% in asymptomatic dogs, and 31% in symptomatic dogs. Giardia was more prevalent in younger animals, and there was no sex predisposition for giardia infection. Ten dogs were molecularly positive for *G. duodenalis* assemblage C, and 15 dogs were positive for *G. duodenalis* assemblage D. Zoonotic assemblages A or B were not found.

The following parasites/pathogens were found: *Giardia duodenalis* (30.4%), *Trichuris vulpis* (9.76%), *Cryptosporidium spp* (12.19%), *Isospora canis* (4.88%), *Ancylostoma spp/Uncinaria spp* (2.44%); *Toxocara canis* (7.32%), *Toxascaris leonina* (1.21%); *Clostridium perfringens* (70.73%). Co-invasion of two or more parasites/pathogens was found in 35.9% of dogs with diarrhea, and giardia positive dogs were more often infected with *Cryptosporidium spp* than giardia negative dogs. There was no correlation between the presence of giardia or its different assemblage and the intensity and appearance of gastrointestinal symptoms in dogs, with the exception of symptoms duration: giardia positive dogs had chronic symptoms more often than giardia negative dogs. Statistically relevant co-invasion of giardia and cryptosporidium was found.

Statistically important differences in concentration of BUN and activity of lipase, CPK and ALT were found in giardia positive dogs.

## Discussion/conclusions

Almost the same prevalence of giardia in symptomatic and asymptomatic dogs shows the need to test all dogs for giardia, and also to perform treatment on all positive dogs.

In our research we found only host adapted assemblages C and D with the explanation being that host adapted assemblages replicate faster and “push out” other assemblages. The offered hypothesis is that transmission of host adapted species may be favored by intensive contact between animals and that these prevail over other non-host adapted species.

Although some research of human giardiasis showed correlation between giardia assemblage and intensity or appearance of gastrointestinal symptoms in humans, according to our research these models can not be translated to dogs. However, in this research we found only assemblages C and D, so this conclusion can not be accepted for assemblages A and B without further investigation.

This study has identified an increased risk in dogs of *Giardia* spp. and co-infections with *Cryptosporidium* spp, probably due to their life cycle and contamination of same invasion reservoirs (water). From that comes the need to test all giardia positive dogs for *Cryptosporidium* spp.



## POPIS OZNAKA I KRATICA

ALT – alanin-aminotransferaza

ALP – alkalna fosfataza

AMY - amilaza

AST – aspartat-aminotransferaza

*bg* -  $\beta$ - giardin

CHOL - kolesterol

CPK – kreatin-kinaza

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)

rDNA – ribosomska deoksiribonukleinska kiselina (engl. ribosomal deoxyribonucleic acid)

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

g - gram

GDH – glutamat dehidrogenaza

gGT – gama-glutamil transferaza

GILRP – protein vezan za lipoprotein male gustoće u *G. lamblia* (engl. *Giardia lamblia* low density lipoprotein receptor-related protein)

HCT - hematokrit

IL - interleukin

LIP – lipaza

mg – miligram

ml – mililitar

pb – parovi baza (engl. base pairs)

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

po – peroralno

RFLP – usporedba veličine produkata nastalih enzimatskim cijepanjem (engl. Restriction fragment length polymorphism)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. ribonucleic acid)

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina (engl. ribosomal ribonucleic acid)

*ssu*-rRNA – mala podjedinica ribosomske RNA (engl- small subunit ribosomal RNA)

*tpi*- trioza fosfat izomeraze

TRIG – trigliceridi

VSP – površinski protein specifičan za gensku skupinu (engl. variant-specific surface protein)

μl - mikrolitar

1. UVOD .....	1
2. DOSADAŠNJE SPOZNAJE .....	2
2.1. OSNOVE ANATOMIJE I FIZIOLOGIJE PROBAVNOG TRAKTA .....	2
2.2. NAJČEŠĆE BOLESTI PROBAVNOG SUSTAVA .....	5
2.3. SIMPTOMATOLOGIJA BOLESTI PROBAVNOG SUSTAVA .....	5
2.3.1. Povraćanje .....	5
2.3.2. Proljev .....	7
2.3.3. Ostali simptomi .....	11
2.4. KLINIČKA PROCJENA INTENZITETA UPALNIH PROMJENA PRI KRONIČNIM ENTEROPATIJAMA U PASA .....	14
2.5. GIARDIJE OPĆENITO .....	18
2.5.1. <i>Giardia duodenalis</i> : povijest, nomenklatura i sistematizacija .....	18
2.5.2. Genska raznolikost giardija u ljudi i giardijoza .....	21
2.5.3. Genska raznolikost i učestalost giardija u životinja .....	23
2.5.4. Morfologija i životni ciklus giardija .....	29
2.5.5. Patogeneza .....	34
2.5.6. Klinička slika .....	35
2.5.7. Dijagnostika, liječenje i profilaksa giardioze pasa .....	36
2.5.8. Učestalost i značaj invazija najčešćim crijevnim parazitima u pasa .....	37
2.5.9. Uloga klostridija u patogenezi bolesti probavnog trakta .....	42
3. OBRAZLOŽENJE TEME .....	45
4. MATERIJALI I METODE .....	46
4.1. KLINIČKA PROCJENA INTENZITETA BOLESTI .....	48
4.2. METODE PRETRAŽIVANJA UZORAKA STOLICE PASA .....	50
4.2.1. Flotacija .....	51
4.2.2. Imunofluorescencija .....	51
4.2.3. Molekularna karakterizacija .....	53
4.2.4. <i>Clostridium perfringens</i> .....	57
4.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	59
5. REZULTATI .....	60
5.1. OSNOVNI PRIKAZ CJELOVITE SKUPINE ISTRAŽIVANIH PASA .....	60
5.2. UČESTALOST <i>G. duodenalis</i> U ISTRAŽIVANIM SKUPINAMA PASA .....	61
5.2.1. Učestalost <i>G. duodenalis</i> u simptomatskih i asimptomatskih pasa .....	61
5.3. ZASTUPLJENOST SPOLOVA .....	63
5.3.1. Zastupljenost spolova u svih istraživanih pasa .....	64
5.3.2. Zastupljenost spolova u pasa s giardijama (n=25) .....	65
5.3.3. Zastupljenost spolova u pasa s giardijama s obzirom na gensku skupinu <i>G. duodenalis</i> .....	66
5.4. DOB ISTRAŽIVANIH PASA .....	66

5.5. UČESTALOST POJAVE RAZLIČITIH PARAZITA/PATOGENA U ISTRAŽIVANOJ POPULACIJI PASA (n=82)	67
5.6. UČESTALOST POJAVE KLINIČKIH SIMPTOMA U SKUPINAMA PASA U KOJIM SU IZOLIRANE <i>G. duodenalis</i> GENSKE SKUPINE C i D	69
5.7. POVEZANOST POJAVLJIVANJA <i>G. duodenalis</i> S POJAVLJIVANJEM OSTALIH PARAZITA/PATOGENA	71
5.8. INTENZITET KLINIČKIH SIMPTOMA I ZBROJ SVIH PARAZITA/PATOGENA U PASA S I BEZ <i>G. duodenalis</i>	73
5.9. POVEZANOST INVAZIJE PARAZITOM <i>G. duodenalis</i> S KLINIČKIM SIMPTOMIMA PROMATRANO U SKUPINI SIMPTOMATSKIH PASA (n=42)	74
5.10. INTENZITET KLINIČKIH SIMPTOMA I BROJ OSTALIH UTVRĐENIH PARAZITA/PATOGENA U ODNOSU NA GENSKU SKUPINU <i>G. duodenalis</i>	76
5.11. TRAJANJE KLINIČKIH SIMPTOMA (IZRAŽENO U DANIMA) S OBZIROM NA PRIPADNOST GENSKOJ SKUPINI <i>G. duodenalis</i>	77
5.12. POVEZANOST INVAZIJE PARAZITOM <i>G. duodenalis</i> S ISTRAŽIVANIM POKAZATELJIMA HEMATOLOŠKIH I BIOKEMIJSKIH PRETRAGA KRVI	78
5.13. POVEZANOST INVAZIJE POJEDINOM GENSKOM SKUPINOM <i>G. duodenalis</i> S ISTRAŽIVANIM POKAZATELJIMA HEMATOLOŠKIH I BIOKEMIJSKIH PRETRAGA KRVI	80
6. RASPRAVA	83
6.1. EPIZOOTIOLOŠKI PODATCI	84
6.2. UČESTALOST POJEDINIH PARAZITA/PATOGENA U ISTRAŽIVANIM PASA	85
6.3. OPAŽENE RAZLIKE U POJAVNOSTI I INTENZITETU KLINIČKIH SIMPTOMA	86
6.4. POVEZANOST INVAZIJE PARAZITOM <i>G. duodenalis</i> S POKAZATELJIMA HEMATOLOŠKIH I BIOKEMIJSKIH PRETRAGA KRVI i POVEZANOST INVAZIJE POJEDINOM GENSKOM SKUPINOM <i>G. duodenalis</i> S POKAZATELJIMA HEMATOLOŠKIH I BIOKEMIJSKIH PRETRAGA KRVI	90
7. ZAKLJUČCI	94
8. LITERATURA	95
9. PRILOZI	119
10. ŽIVOTOPIS	122
POPIS RADOVA	125

## 1. UVOD

Probavni simptomi među najučestalijim su problemima zbog kojih vlasnici dovode životinje na pregled. Najčešći probavni simptomi koji se javljaju u pasa su povraćanje i proljev, a njihovi uzroci su mnogobrojni. Najčešći uzroci probavnih simptoma u pasa su invazije parazitima, infekcije bakterijama, virusima, uzroci idiopatske upale (upalna bolest crijeva), intoksikacije, pogreške pri hranjenju, te bolesti jetre, bubrega, gušterače, kao i endokrinopatije.

Klinička slika bolesti probavnog trakta može izrazito varirati od pacijenta do pacijenta, kao i intenzitet bolesti, ovisno o etiološkim čimbenicima bolesti, individualnoj dispoziciji, lokalizaciji i intenzitetu promjena u probavnom traktu. Ova raznolikost kliničkih simptoma i njihovog intenziteta predstavlja ozbiljnu poteškoću pri procjeni intenziteta bolesti i uspješnosti pojedinih terapijskih čimbenika na patološke promjene u probavnom traktu.

Kako su paraziti (naročito *Giardia duodenalis*) česti uzročnici probavnih simptoma u pasa vrlo je važno odrediti utjecaj *G. duodenalis* na pojavnost i intenzitet probavnih simptoma u pasa.

Giardioza je parazitarna bolest ljudi i brojnih vrsta domaćih i divljih životinja uzrokovana bičošima iz roda *Giardia*. Čest je parazit probavnog sustava životinja uključujući i domaće životinje, pse i mačke. Prenosi se neposredno te ingestijom kontaminirane vode i hrane.

Bičoš *G. duodenalis* nije genetski jedinstven i sastoji od 7 genetskih tipova, od kojih čak 4 nalazimo u pasa. Zanimljivo je bilo istražiti uvjetuje li pojedini genski tip različiti intenzitet kliničkih simptoma u pasa. U pasa su česte i istovremene invazije nekoliko različitih vrsta parazita te je jedan od ciljeva istraživanja bilo utvrditi postoji li utjecaj istovremene invazije različitim parazitima na intenzitet kliničkih simptoma u pasa.

Ideja za ovo istraživanje razvila se zbog globalne proširenosti ove bolesti u brojnih vrsta životinja i u čovjeka, te zbog boljeg identificiranja nepoznanica u kliničkoj manifestaciji ove bolesti. Također, do sada nije provedeno niti jedno istraživanje koje bi proučavalo utjecaj genskog tipa giardija na klinički oblik bolesti, stanje pacijenta te mogući ishod bolesti.

Svi prije navedeni razlozi, kao i očekivana korist za veterinare kliničare i eventualna daljnja istraživanja giardioze u pasa u Hrvatskoj potakle su nas na ovo istraživanje.

## 2. DOSADAŠNJE SPOZNAJE

### 2.1. OSNOVE ANATOMIJE I FIZIOLOGIJE PROBAVNOG TRAKTA

Probavni sustav domaćih mesoždera sastoji se od primarnih probavnih organa (usta, ždrijelo, jednjak, želudac, tanka i debela crijeva), egzokrine gušterače, jetre i žučnog sustava. Osnovne funkcije probavnog sustava čine osiguravanje probave zbog nutritivnih potreba organizma i održavanja ravnoteže energije u organizmu, metabolizam i ekskretorna funkcija. Kako bi se ovi procesi odvijali fiziološki postoji 6 osnovnih djelatnosti probavnog sustava: motilitet, sekrecija, digestija, resorpcija, djelatnost krvožilnog sustava i metabolička djelatnost. Motilitet osigurava kretanje zalogaja od usta pa sve do anusa, pri čemu se zalogaj miješa, a reducira mu se volumen. Brzina kretanja zalogaja mora osigurati vrijeme potrebno za sekreciju, probavu i resorpciju tvari u probavnom sustavu, ali i vrijeme dostatno za aktivaciju enzima u probavnom traktu. Fiziološki motilitet zasniva se na funkciji živčanih vlakana i receptora probavnog trakta koji su inervirani ograncima autonomnog živčanog sustava. Auerbachov pleksus smješten je između dva sloja mišićnih vlakana i prima podražaje iz receptora smještenih u sluznici i mišićnici crijeva, ali i iz centralnog živčanog sustava, putem parasimpatičkog i simpatičkog sustava. Ovako podražena vlakna Auerbachovog pleksusa stimuliraju glatku muskulaturu crijeva, epitelne, endokrine i stanice imunosnog sustava. Glavni neurotransmiteri ovog procesa su acetilkolin, norepinefrin, vazoaktivni intestinalni peptid i dušikov oksid. Fiziološki razlikujemo nekoliko oblika peristaltičkih kontrakcija crijeva: peristaltički valovi, mjestimične kontrakcije, masovne aboralne kontrakcije, "rojevi" kontrakcija i migrirajući motorni kompleksi. Opisana su i dva patološka oblika kontrakcija crijeva: gigantske kontrakcije i antiperistaltički valovi (TAMS, 2003.; WASHABAU, 2012.a)

Hranjive tvari probavljaju se u probavnom traktu uz djelovanje probavnih enzima, a veliku važnost imaju i bakterije koje se fiziološki nalaze u probavnom traktu. Sluznica crijeva pokrivena je specijaliziranim epitelom koji sudjeluje u resorpciji hranjivih tvari, elektrolita, minerala, vitamina i vode. Osnovna funkcija krvožilnog sustava splanhikusa je osiguravanje mnogobrojnih metaboličkih procesa. Krvožilni sustav splanhikusa predstavlja i rezervoar krvi koja se u slučaju potrebe, kao na primjer pri izrazitom tjelesnom naporu mobilizira u cirkulaciju.

Osnovnu metaboličku aktivnost probavnog sustava ima tkivo jetre koje sudjeluje u metabolizmu ugljikohidrata, proteina, masti i nukleinskih kiselina. U jetri se također sintetiziraju faktori grušanja, žučne kiseline, a odvija se i metabolizam vitamina, glutaciona, hormona i različitih imunoloških čimbenika (WASHABAU, 2012.a).

Ulogu sekrecije u probavnom sustavu ima nekoliko skupina egzokrinih žlijezdi: žlijezde slinovnice, žlijezdano tkivo želuca i crijeva, pankreas, jetra i bilijarni sustav koji osiguravaju fiziološki promet elektrolita, tekućine (vode), bikarbonata, sluzi i žučnih kiselina. Primarni organi probavnog sustava građeni su od nekoliko slojeva tkiva: mukoze (sluznice), submukoze, l. muscularis externa i seroze. Sluznica probavnog trakta građena je od epitela, lamine propriae i muscularis mucosae. Epitelne stanice obavljaju probavnu, sekretornu i absorptivnu funkciju, a sudjeluju i u imunskim zbivanjima. *Lamina propria* sastoji se od vezivnog tkiva, krvnih i limfnih žila, a *muscularis mucosae* je građena od glatke muskulature. Submukoza je građena od kolagenih i elastičnih vlakana te sekretornih žlijezdi i krvnih žila. Jednjak predstavlja vezu između orofarinksa i želuca. Glavna funkcija jednjaka je prenošenje zalogaja od usne šupljine do želuca. Stjenka jednjaka građena je od nekoliko slojeva: adventicija, muscularis, submucosa i mucosa. Mišićnica jednjaka sastoji se od dva sloja kosih poprečno prugastih mišićnih vlakana. Gastroezofagealni sfinkter sastoji se od vanjskog sloja longitudinalnih poprečnoprugastih mišićnih vlakana i unutarnjeg sloja cirkularne glatke muskulature. Sloj submukoze sadrži brojne sluzne žlijezde. Sluznica jednjaka građena je od višeslojnog pločastog epitela (MOORE, 2008.; WASHABAU, 2012.a).

Želudac je mišićno žlijezdani organ koji se anatomski dijeli na proksimalni i distalni dio. Proksimalni dio želuca dijelimo na tri područja: kardiju, fundus i tijelo želuca, a distalni dio želuca dijelimo na pilorični kanal, pilorični antrum i pilorus. Osnovna funkcija želuca je mješanje zalogaja i produkcija želučanog soka. Mišićnica želuca građena je od tri sloja mišićnih vlakana: podužni, kružni i kosi sloj. Sluznica želuca sadrži nekoliko različitih tipova žlijezdi: kardijačne (sekrecija sluzi), fundusne (sekrecija pepsinogena 1 i 2, hidroklorne kiseline, R-proteina, unutarnjih faktora, želučane lipaze) i pilorične žlijezde (sekrecija sluzi i gastrina). Želučana sekrecija regulirana je pomoću nekoliko mehanizama: acetilkolinški, histaminski i gastrinski receptori koji nakon što bivaju podraženi stimuliraju sekreciju želučane kiseline. Sluznica želuca otporna je na djelovanje želučane kiseline, kao i na mehaničke podražaje i djelovanje probavnih enzima. To je omogućeno specifičnom građom epitela koji na svojoj

površini ima hidrofobne fosfolipide, a unutarstanično se nalazi velika koncentracija bikarbonata što je štiti od djelovanja želučane kiseline. Tome pridonosi i kapilarni tok krvi između epitelnih stanica koji održava lokalnu acidobaznu ravnotežu, velika sposobnost regeneracije mukoze i zaštitni sloj sluzi (SUCHODOLSKI, 2008.; WASHABAU, 2012.a).

Enterociti tankih crijeva specijalizirani su za sekreciju vode i elektrolita te absorpciju hranjivih tvari. Resičaste stanice epitela tankih crijeva imaju primarno resorptivnu ulogu te resorbiraju vodu, elektrolite, aminokiseline, slobodne masne kiseline, monosaharide, vitamine i minerale i ostale nutrijente. Kriptoidne stanice epitela tankih crijeva posjeduju sekretornu funkciju i luče vodu i elektrolite u sadržaj lumena crijeva u svrhu omekšavanja sadržaja i neutralizacije želučane kiseline. Pod regulacijom autonomnog živčanog sustava kriptoidne stanice sluznice tankih crijeva izlučuju kloride koje prati i sekrecija vode. Parasimpatički neuroni stimuliraju sekreciju vode iz kriptoidnih stanica pod utjecajem vazoaktivnog intestinalnog peptida i acetilkolina, a simpatički neuroni pod utjecajem norepinefrina inhibiraju sekreciju vode. Kolinergična regulacija sekrecije klorida povezana je sa signalizacijom  $Ca^{2+}$  iona, a regulacija vazoaktivnog intestinalnog peptida povezana je sa stimulacijom adenilat ciklaze, cikličkog adenozin monofosfata i aktivacijom proteun kinaze A. Također, i opioidni neuroni u stijenci crijeva osiguravaju dodatnu regulaciju i inhibiciju sekrecije vode iz kriptoidnih stanica tankih crijeva. Tanka crijeva posjeduju tri osnovne funkcije motiliteta: miješanje sadržaja crijeva s probavnim enzimima i sekretima, miješanje sadržaja crijeva u svrhu ostvarivanja kontakta sa sluznicom crijeva te kaudalno pokretanje sadržaja. Kontraksije tankih crijeva dobro su koordinirane kako se sadržaj crijeva prilikom kontrakcija ne bi kretao i proksimalno i distalno. Sluznica duodenuma posjeduje i Brunnerove žlijezde čija funkcija je lučenje lužnatog sekreta bogatog sluzi koji štiti sluznicu duodenuma od djelovanja želučane kiseline, osigurava lužnatost sadržaja za optimalnu aktivaciju lipaze i inaktivira i regulira bakterije u lumenu crijeva (WASHABAU, 2012.a).

Kolon posjeduje dvije osnovne funkcije: absorpcija vode i elektrolita u uzlaznom i poprečnom kolonu i pohranjivanje fecesa u silaznom kolonu do kontrolirane defekacije. Ovakva specijalizacija pojedinih segmenata kolona omogućena je regionalnim razlikama u motilitetu kolona. Ritmične faze kontrakcija sporije se odvijaju u uzlaznom kolonu te omogućuju dovoljno vremena za absorpciju vode i elektrolita, a retrogradne gigantske kontrakcije i antiperistaltički



valovi pospiješuju miješanje sadržaja crijeva u lumenu kolona. Motilitet poprečnog i silaznog kolona karakteriziran je snažnim kontrakcijama koje potiskuju sadržaj u rektum. U debelom crijevu odvija se regulacija sadržaja elektrolita i vode. U kolonu aldosteron potiče stvaranje Na kanala koji dovode do zadržavanja iona Na i sekreciju iona K. U kolonu kao posljedica staničnih mehanizama nastaju i bikarbonati koji imaju važnu ulogu u neutralizaciji kiselina nastalih bakterijskom fermentacijom (WASHABAU, 2012.a).

## **2.2. NAJČEŠĆE BOLESTI PROBAVNOG SUSTAVA**

Probavni simptomi (proljevi i povraćanje) najučestaliji su problemi zbog kojih vlasnici dovode pse kod veterinara. Uzroci proljeva mogu biti raznoliki i mnogobrojni, a najčešće su uzrokovani parazitima (helminti i protozoi), virusima, bakterijama i gljivicama. Osim infektivnih proljeva mogu prouzročiti i neinfektivni uzroci: idiopatske upale (upalna bolest crijeva), intoksikacije (otrovanja hranom), pogreške pri hranjenju te bolesti gušterače, jetre, bubrega i endokrinopatije (GASHEN, 2010.).

Najčešći uzročnici proljeva u pasa su bakterije iz roda *Clostridium* te *Giardia duodenalis* (HACKETT i LAPPIN, 2003.). Broj bakterija iz roda *Clostridium* u fecesu, međutim, nije adekvatan pokazatelj patogenosti tih bakterija, te se stoga dokazuje postojanje enterotoksina ovih uzročnika (WEESE, 2011.).

Najčešći paraziti koji u pasa uzrokuju probavne simptome su paraziti *Giardia duodenalis*, *Ancylostoma caninum*, *Isospora canis*, *Uncinaria stenocephala* i *Trichuris vulpis*, a vrlo su česte i njihove istovremene invazije (OLIVIERA i sur., 2002.; RAMIREZ-BARRIOS i sur., 2004.; FONTANARROSSA i sur., 2006.).

## **2.3. SIMPTOMATOLOGIJA BOLESTI PROBAVNOG SUSTAVA**

### **2.3.1. Povraćanje**

Povraćanje predstavlja aktivno izbacivanje hrane i/ili tekućine iz želuca ili proksimalnih dijelova tankih crijeva kroz usta, a popraćeno je naprezanjem i aktivnim kontrakcijama abdominalne stijenke. Uvijek ga je potrebno razlikovati od regurgitacije koja predstavlja

pasivno, retrogradno gibanje hrane/tekućine. Povraćanje je često predhodeno simptomima mučnine: pojačanom salivacijom, gutanjem i izraženim nemirom životinje. Povraćeni sadržaj osim više ili manje probavljene hrane može sadržavati i žuč te svježu ili probavljenu krv (hematemeza). Povraćanje se može javiti nedugo nakon uzimanja obroka, ali i više sati nakon istog. Najčešći uzroci povraćanja u pasa navedeni su u tablici 1. (CADORÉ, 2010.; TWEDT, 2010.).

S obzirom na tijek bolesti povraćanje dijelimo na akutno i kronično. Kroničnim povraćanjem smatra se svako povraćanje koje traje duže od dva tjedna. Pri parazitarnim invazijama probavnog trakta u pasa često se javlja kronično intermitentno povraćanje (TAMS, 2003.; TANGTRONGSUP i SCORSA, 2010.).

Tablica 1 - Najčešći uzroci povraćanja u pasa

Hrana	Nagla promjena hrane Ingestija stranih materijala (smeće, bilje) Netolerancija na pojedine sastojke hrane Alergija na hranu
Lijekovi i toksini	Antikolinergici Nesteroidni protuupalni lijekovi Olovo Etilen glikol Cink
Metaboličke bolesti	Diabetes mellitus Hipoadrenokorticism Bolesti bubrega i/ili jetre Sepsa Acidoza Hiperkalemija i hipokalemija Hiperkalcemija i hipokalcemija Hipomagnezemija Toplinski udar
Bolesti želuca	Obstrukcija (strana tijela, hipertrofija pilorusa) Gastritis Parazitarne invazije Dilatacija i torzija želuca
Bolesti tankih crijeva	Parazitarne invazije Enteritis Opstrukcija (strana tijela, promjene položaja crijeva, neoplazije) Upalna bolest crijeva

	Gljivična oboljenja Promjene položaja crijeva
Bolesti debelog crijeva	Kolitis Opstipacija
Ostale bolesti	Upala gušterače Peritonitis  Opstrukcija žučovoda  Upala prostate  Urinarna opstrukcija  Dijafragmatska hernija  Neoplazije  Piometra

### 2.3.2. Proljev

Proljev je najčešći simptom bolesti probavnog sustava pasa (TAMS, 2003.).

Pod proljevom podrazumijevamo povećanu količinu fekalnog sadržaja uzrokovanu povećanom količinom vode i/ili suhe tvari u stolici najčešće uz povećanu frekvenciju defekacije. Mehanizam nastanka proljeva prema nekim autorima (WILLARD, 2010.) temelji se na dva mehanizma: povećana propustnost sluznice crijeva (upalni procesi, neoplastične infiltracije) i povećana sekrecija u lumen crijeva (kemijski i infektivni toksini), a TAMS (2003.) mehanizme nastanka proljeva dijeli na 4 skupine: osmotski (smanjena absorpcije tekućine u lumenu crijeva; sekretorni (povećana sekrecija iona u lumen crijeva); abnormalni motilitet i eksudativni mehanizam (povećana propustnost).

Proljeve s obzirom na tijek bolesti dijelimo na akutne (trajanje do 14 dana) i kronične (trajanje 15 ili više dana), a s obzirom na lokalizaciju patološkog procesa na proljeve koji potječu od patoloških procesa u tankim, odnosno debelom crijevu (tablica 2.). Oni se međusobno razlikuju i klinički. Za proljeve porijeklom od patoloških procesa u tankim crijevima karakteristična je pojava većeg volumena stolice, pojava melene, neprobavljenih sastojaka hrane, a ponekad se može javiti i flatulencija i povraćanje. Za proljeve karakteristične za debelo crijevo svojstvena je pojava sluzi i svježe krvi u stolici, tenezam i povećana frekvencija defekacije (HERNOT i sur., 2005.; OWENS i GREENSON, 2007.).

Proljev može biti posljedica bolesti probavnog sustava (invazije parazitima, upalni procesi, zarazne bolesti, neoplazije, bolesti jetre i gušterače koje utječu na funkciju probavnog trakta, reakcije na hranu ili lijekove) ili posljedica sistemskih bolesti (npr. zatajenje bubrega, hipoadrenokorticism) (TAMS, 2003.). Najčešći uzroci akutnog proljeva u pasa navedeni su u tablici 3., a najčešći uzroci kroničnog proljeva u pasa navedeni su u tablici 4.

Tablica 2 - Diferencijacija proljeva karakterističnog za tanko crijevo i proljeva karakterističnog za debelo crijevo

	<b>Tanko crijevo</b>	<b>Debelo crijevo</b>
<b>Karakteristike fecesa</b>		
Sluz	Rijetko prisutna	Učestalo prisutna
Svježa krv	Odsutna	Često prisutna kao tračci sviježe krvi na površini stolice
Volumen	Povećani	Normalan do smanjen
Konzistencija fecesa	Vodenasta, kašasta ili mekoformirana, ponekad s elementima neprobavljene hrane	Meko formirana do formirana, bez elemenata neprobavljene hrane
Veličina/oblik fecesa	Ovisi o količini tekućine u fecesu	Ponekad fiziološki ili umanjenog promijera
Steatoreja	Prisutna pri maldigestiji/malabsorpciji	Odsutna
Melena	Ponekad prisutna	Odsutna
Boja fecesa	Od vrlo svijetle do gotovo potpuno crne	Najčešće smeđa
<b>Defekacija</b>		
Učestalost	Uglavnom učestala, 2-4 puta u 24 sata	Učestala, 3-10 puta u 24 sata
Tenezam	Odsutan	Učestao
<b>Ostali klinički simptomi</b>		
Gubitak tjelesne težine	Prisutan u kroničnom tijeku bolesti	Uglavnom nije prisutan
Povraćanje	Ponekad	Ponekad
Apetit	Uobičajen do smanjen	Uglavnom uredan
Flatulencija	Ponekad prisutna	Odsutna

Tablica 3. Najčešći uzroci akutnog proljeva u pasa

Prehrana	Intolerancija/alergija Hrana loše kvalitete Nagle promjene hrane
Paraziti	Helmini Protozoarni organizmi ( <i>Giardia</i> , <i>Coccidia</i> )
Zarazne bolesti	Parvovirusna infekcija Koronavirusna infekcija Štenećak <i>Salmonella spp.</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>E.coli</i> (verotoksin) <i>Campylobacter jejuni</i>
Ostalo	Hemoragični gastroenteritis Intususcepcija Sindrom iritabilnih crijeva Akutni pankreatitis Hipoadrenokorticism Ingestija toksina (kemikalije, teški metali, lijekovi)

Tablica 4. Najčešći uzroci kroničnog proljeva u pasa

Hrana	Alergija na hranu Intolerancija na hranu
Paraziti	Helminti Protozoarni organizmi: <i>G. duodenalis</i> , kokcidije
Bakterijske infekcije	<i>Clostridium perfringens</i> - upitan značaj
Neoplastične bolesti	Limfom Adenokarcinom
Ostale bolesti	Upalna bolest crijeva Sindrom iritabilnih crijeva

Tablica 5. Najčešći uzroci malapsorpcije u pasa

Hrana	Intolerancija na hranu Alergija na hranu
Parazitarne invazije	<i>G. duodenalis</i> Oblici
Enteropatija zbog upotrebe antibiotika	
Upalna bolest crijeva	
Neoplazije	Limfom

### 2.3.3. Ostali simptomi

Anoreksija se definira kao djelomični ili potpuni gubitak apetita. Česti je i nespecifični simptom u bolesnih ili ozljeđenih pasa te je jedan od glavnih razloga zašto vlasnici dovode životinje u veterinarsku ordinaciju. Regulacija uzimanja hrane složena je i uključuje brojne

vanjske i unutarnje čimbenike. To su senzorni signali (npr. miris i okus), metabolički signali (neuropeptid Y čija produkcija se odvija pod utjecajem snižene koncentracije inzulina te stimulira apetit dok upalni citokini smanjuju produkciju ovog neuropeptida), okolišni signali i naučeno vladanje (naučena rutina prilikom davanja obroka, uzimanje hrane samo od određene osobe, uloga zvukova ambijenta i sl.) (WILLARD, 2009.).

Gubitak tjelesne težine izrazito je nespecifičan simptom i javlja se kod velikog broja bolesti u pasa. S aspekta problematike invazije probavnog sustava u pasa važno je napomenuti da je gubitak tjelesne težine uz fiziološki apetit uglavnom znak maldigestije i malapsorpcije hranjivih tvari u probavnom traktu. Objektivna procjena gubitka tjelesne težine najčešće se izražava u postocima tjelesne mase ili kao promjena indeksa tjelesne kondicije (eng. *Body condition system*). Ovaj sustav razvijen u sklopu Nestle Purina Pet Care Center, formiran je na temelju nekoliko istraživanja mjerenja tjelesne kondicije, a temelji se na 9 kategorija tjelesne kondicije u koje se pas svrstava na temelju prominencije rebara i ostalih koštanih izbočina te oblika tijela dorzalno. Sustav je jednostavan za primjenu jer omogućuje vlasnicima i veterinarima da samo na temelju inspekcije i palpacije kategoriziraju životinju u skupinu 1-9, odnosno da procjene i opišu gubitak tjelesne težine svoga psa (WILLARD, 2009.; FORMAN, 2010.).

Melena je tamna obojenost stolice (gotovo crna boja) koja je uzrokovana krvarenjem u proksimalne dijelove probavnog trakta (jednjak, želudac, tanka crijeva) (DOSSIN, 2008.). Najčešći uzroci melene navedeni su u tablici 6.



Tablica 6. Najčešći uzroci melene u pasa

Parazitarne invazije	Oblici
Erozije ili ulceracije u probavnom traktu	
Neoplazije	
Lezije u usnoj šupljini, jednjaku ili nosnim šupljinama	Limfom, adenokarcinom, leiomiom, leiomiosarkom
Ostalo	Hipoadrenokorticism Poremećaji zgrušavanja krvi

Hematohezija se definira kao prisutnost svježe krvi u stolici, a najčešće je posljedica bolesti koje zahvaćaju debela crijeva, naročito ako se javlja uz pojavu proljeva. Također, kao i svim slučajevima krvarenja potrebno je isključiti poremećaje zgrušavanja krvi (WILLARD, 2009.). Najčešći uzroci hematohezije navedeni su u tablici 7.

Tablica 7. Najčešći uzroci hematohezije u pasa

Bolesti anusa i rektuma	Upalni procesi Neoplazije Analna fistula Prolaps rektuma Strana tijela
Bolesti kolona i tankih crijeva	Parazitarne invazije Hrana (alergija i intolerancija) Hemoragijski gastroenteritis Parvovirusna infekcija Intususcepcija Upalna bolest crijeva
Ostale bolesti	Poremećaji zgrušavanja krvi

Ascites se definira kao nakupljanje tekućine u trbušnoj šupljini, najčešće je uzrokovan hipoalbuminemijom, portalnom hipertenzijom, neoplazijama ili peritonitisom, a karakterizira se kao transudat, modificirani transudat ili eksudat. U dijela pasa s malapsorpcijom i hipoalbuminemijom javlja se ascites (WILLARD, 2009.).

## **2.4. KLINIČKA PROCJENA INTENZITETA UPALNIH PROMJENA PRI KRONIČNIM ENTEROPATIJAMA U PASA**

Numerički sustavi bodovanja pružaju mogućnost objektivnog klasificiranja težine bolesti te time omogućuju predviđanje pozitivnog ili negativnog ishoda za pacijenta. Takvi sustavi se već dulje vrijeme koriste u humanoj medicini, a postupno nalaze svoje mjesto primjene i u veterinarskoj medicini. Primjena ovakvih sustava pomaže i u objektivnom uspoređivanju rezultata pri istraživanju neke bolesti te se uz primjenu ovakvih sustava može provoditi i kontrola kvalitete unutar i između medicinskih institucija. Među numeričke sustave bodovanja ubrajaju se i dva sustava za procijenu određenih kroničnih bolesti probavnog sustava u pasa.

Kronične enteropatije u pasa skupina su kroničnih bolesti koje se dijele na bolesti koje su uzrokovane reakcijom na određene sastojke hrane, idiopatsku upalnu bolest crijeva (UBC) ili se javljaju kao proljev koji nastaje kao posljedica reakcije na antibiotike. Ovi poremećaji kao uzrok kronične enteropatije uglavnom se dijagnosticiraju isključivanjem ostalih bolesti, kao što su parazitarne invazije te ovisno o uspješnosti terapije (ALLENSPACH i sur., 2007.).

Najčešća kronična enteropatija koja se javlja u pasa je upalna bolest crijeva (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*), a očituje se spontanim egzacerbacijama i remisijama kliničkih simptoma te ju je vrlo teško odrediti prognostički, odnosno procijeniti uspješnost terapije (JERGENS i sur., 2003.).

Etiologija nastanka UBC-a u pasa kao najčešće kronične enteropatije pasa još nije u potpunosti razjašnjena, ali se genetika, okolišni čimbenici i neadekvatni odgovor imunološkog sustava na kroničnu stimulaciju od strane različitih antigena (hrana, paraziti, bakterije) u crijevnoj sluznici smatraju glavnim čimbenicima nastanka ove bolesti (HALL i sur., 2008.).

Klinička slika može izrazito varirati od pacijenta do pacijenta, kao i intenzitet bolesti, ovisno o individualnoj dispoziciji, lokalizaciji i intenzitetu promjena u probavnom traktu (JERGENS i sur., 2003.).

Najčešći klinički simptomi su proljev od strane tankih ili debelih crijeva, povraćanje, anoreksija, gubitak na tjelesnoj težini, tenezam, abdominalna bol, melena, ascites i/ili edemi, a rjeđe se mogu javiti i poliartritis, nefrolitijaza, hepatobilijarne bolesti, dermatološki simptomi (pruritus), imunosno uvjetovana anemija, uveitis i bronhopulmonalne bolesti. Rezultati laboratorijskih pretraga krvi su uglavnom nespecifični i uključuju hipoalbuminemiju i hipoproteinemiju (JERGENS, 1999.).

Ta raznolikost kliničkih simptoma i njihovog intenziteta predstavlja ozbiljnu poteškoću pri procjeni intenziteta bolesti i uspješnosti pojedinih terapijskih čimbenika na upalne promjene u probavnom traktu. Iz tog razloga pojavila se potreba za numeričkom validacijom pojedinih parametara kliničke slike te posljedično izračunavanje, odnosno procjena intenziteta upalnih promjena (JERGENS i sur., 2003.).

Dva su osnovna načina procjene intenziteta upalnih promjena pri kroničnim enteropatijama: CIBDAI sustav bodovanja (JERGENS i sur., 2003.) i CCECAI sustav bodovanja (ALLENSPACH i sur., 2007.).

CIBDAI sustav bodovanja (engl. *Canine inflammatory bowel disease activity index*) odnosi se na procjenu intenziteta upalnih promjena pri upalnoj bolesti crijeva, a sačinjen je od šest osnovnih parametara: aktivnosti životinje, apetita, povraćanja, konzistencije stolice, učestalosti stolice i gubitka tjelesne težine (JERGENS i sur., 2003.) (tablica 8).

Nakon konačnog zbrajanja bodova CIBDAI intenzitet bolesti se označava kao:

**bez kliničkog značaja** (0-3 boda),

**blagi** (4-5 bodova),

**umjeren** (6-8 bodova) i

**izraziti** ( $\geq 9$  bodova)

Upotreba CIBDAI sustava u pasa s IBD-om kao jedine metode procjene intenziteta bolesti i učinka terapije može dovesti do pogrešne interpretacije. Puno bolji rezultati postižu se kombinacijom CIBDAI sustava i koncentracije albumina u serumu te histološke pretrage uzetih uzoraka sluznice crijeva (MÜNSTER i sur., 2006.).

CCECAI (engl. *canine chronic enteropathy activity index*) odnosi se na sve kronične enteropatije pasa i osim upalne bolesti crijeva obuhvaća i bolesti uzrokovane reakcijama na hranu te proljev koji nastaje kao posljedica reakcije na antibiotike. Taj sustav bodovanja uz aktivnost životinje, apetit, povraćanje, konzistenciju stolice, učestalost stolice i gubitak tjelesne težine obuhvaća još i eventualnu pojavu i gradaciju koncentracije albumina u serumu, pojavu ascitesa i edema i pojavu i gradaciju pruritusa (ALLENSPACH i sur., 2007.). (Tablica 8).

Nakon konačnog zbrajanja bodova CCECAI intenzitet bolesti se označava kao:

**bez kliničkog značaja** (0-3 boda),

**blagi** (4-5 boda),

**umjereni** (6-8 bodova),

**povećani** (9-11 bodova) i

**izraziti**- najčešće ukazuje na negativni ishod bolesti ( $\geq 12$  bodova) (ALLENSPACH i sur., 2007.).

Tablica 8. CIBDAI i CCECAI sustavi bodovanja

Parametar	CIBDAI sustav	CCECAI sustav
Tjelesna aktivnost pacijenta	0-normalna 1-blago smanjena 2-umjereno smanjena 3-izrazito smanjena	0-normalna 1-blago smanjena 2-umjereno smanjena 3-izrazito smanjena
Apetit	0-normalan 1-blago smanjen 2-umjereno smanjen 3-izrazito smanjen	0-normalan 1-blago smanjen 2-umjereno smanjen 3-izrazito smanjen
Povraćanje	0-ne povraća 1-rijetko (1x tjedno) 2-umjereno (2-3 x tjedno) 3-učestalo (> 3 x tjedno)	0-ne povraća 1-rijetko (1x tjedno) 2-umjereno (2-3 x tjedno) 3-učestalo (> 3 x tjedno)
Konzistencija stolice	0-normalna 1-meka stolica 2-vrlo mekana stolica 3-vodenasta dijareja	0-normalna 1-meka stolica 2-vrlo mekana stolica 3-vodenasta dijareja
Učestalost defekacije	0-normalna 1-blago učestala (2-3/d, ili krv/sluz u stolici) 2-umjereno učestala (4-5/d) 3-izrazito učestala (>5/d)	0-normalna 1-blago učestala (2-3/d, ili krv/sluz u stolici) 2-umjereno učestala (4-5/d) 3-izrazito učestala (>5/d)
Gubitak tjelesne težine	0-nema gubitka tj. težine 1-blagi (do 5% tj težine) 2-umjereni (5-10% tj. tež.) 3-izraziti (>10 % tj. težine)	0-nema gubitka tj. težine 1-blagi (do 5% tj težine) 2-umjereni (5-10% tj. tež.) 3-izraziti (>10 % tj. težine)
Koncentracija albumuna u serumu		0-albumin >20 g/L 1-albumin 15-19,9 g/L 2-albumin 12-14,9 g/L 3-albumin <12 g/L
Ascites i periferni edemi		0-nema 1-blagi ascites ili periferni edemi 2-umjereni ascites ili periferni edemi 3-izraziti ascites ili periferni edemi
Pruritus		0-nema pruritusa 1-povremeni pruritus 2-izraziti pruritus, ali prestaje za vrijeme sna 3-izraziti pruritus i za vrijeme sna

## 2.5. GIARDIJE OPĆENITO

### 2.5.1. *Giardia duodenalis*: povijest, nomenklatura i sistematizacija

Posljednja tri stoljeća paraziti iz roda *Giardia* intrigiraju brojne biologe i kliničare. Bičaća *Giardia duodenalis* prvi je otkrio Antonie van Leewenhock, 1681. godine, pretražujući vlastitu stolicu, što se smatra prvim otkrivenim protozoarnim organizmom. Slijedeći opis ovog parazita nalazimo 1859. godine, kada ga je Vilem Dusan Lambl opisao kao *Cercomonas intestinalis*. Grassi, je 1879. godine pomno morfološki opisao ovaj organizam, a Raphael Anatole Emile Blancharda ovom organizmu 1888. godine nadijeva ime *Giardia intestinalis*. Godine 1882. Kunstler je utvrdio protozoona u punoglavca kojeg je nazvao *Giardia agilis*, što je je ujedno i prvo spominjanje roda *Giardia*. Charles Wardell Stiles 1915. godine na komemoraciji u čast rada profesora A. Giarda i V. Lamblina uvodi naziv *Giardia lamblia* (FORD, 2005.).

Filice 1952. godine utvrđuje da rod *Giardia* sačinjava više vrsta ovog bičaća, te se danas uglavnom koriste nazivi *Giardia duodenalis*, a rjeđe *G. lamblia* i *G. intestinalis* (FORD, 2005.).

Godinama se patogenost giardija smatrala upitnom jer uzročnik nije zadovoljavao sve kriterije Kochovih postulata. Do definitivne potvrde da je *Giardia duodenalis* patogena dolazi se tek u 70-im godinama dvadesetog stoljeća kada je dokazana u mnogih povratnika iz tadašnjeg Sovjetskog Saveza (BRODSKY i sur., 1974.; WALZER i sur., 1971.).

U 80-im godinama 20. stoljeća započinju opsežnija molekularna istraživanja ovog organizma. BERTAM i sur. (1983.) uz pomoć zimodemske analize metaboličkih enzima utvrđuju tri različita izoenzimska profila, a NASH i sur. (1985.) analiziraju genom *G. duodenalis* izoliranih iz ljudi i životinja i utvrđuju da postoji više od dvije skupine ovog organizma. Zimodemska analiza korištena je i u brojnim budućim istraživanjima (MELONI i sur., 1988.; ANDREWS i sur., 1989.; PROCTOR i sur., 1989.; STRANDĚN i sur., 1990.; ABAZA i sur., 1991.), a metoda određivanja polimorfizma duljine restrikcijskih ulomaka nasumično umnoženih dijelova DNA omogućila je daljnja istraživanja (DE JONCHKHERE i sur., 1990.; EY i sur., 1992.; HOMAN i sur., 1992.; EY i sur., 1993.).

EY i sur. (1993., 1997.) su korištenjem PCR-a i RFLP konzervativnih odsječaka obitelji VSP gena *G. duodenalis* utvrdili postojanje genetske skupine I i II i novu skupinu izoliranu u goveda.

MONIS i sur. (1996.) izolate *G. duodenalis* po prvi puta svrstavaju u skupine A i B temeljem analize PCR- RFLP-om glutamat dehidrogenaze gena.

VAN KEULEN i sur. (1993.) odredili su slijed nukleotida cijelog gena *18S rDNA* bičaća *G. ardeae*, *G. muris* i *G. duodenalis* te su izolate podijelili u tri skupine.

HOPKINS i sur. (1997.) koristili su odsječak od 292 parova baza *18S rDNA* za usporedbu giardija podrijetlom iz ljudi i pasa, dokazali su četiri skupine te zaključuju da su izolati iz pasa vrsno specifični, a da su genske skupine 1 i 2 (A i B) dokazane samo u ljudi.

HOPKINS i sur. (1999.) razlikuju četiri osnovne genske skupine analizirajući međugensku ribosomsku DNA razmaknicu.

HOMAN i sur. (1992.) su razvrstali izolate *G. duodenalis* u dvije skupine: u Europi na "poljsku" i "belgijsku", dok su NASH i sur. (1995.) u Sjevernoj Americi izolate podijelili na skupine 1, 2 i 3, a MAYRHOFER i sur. (1995.) su izolate u Australiji podijelili na skupine A i B. Brojna kasnija istraživanja bavila su se otkrivanjem i dokazivanjem različitih genskih skupina *G. duodenalis* u ljudi i životinja (HOMAN i sur., 1998.; MCINTYRE i sur., 2000.; CACCIO i sur., 2002.; READ i sur., 2004.).

U pasa su genske skupine *G. duodenalis* prvi dokazali MONIS i sur. (1998). Oni su određivali nukleotidne sljedove *gdh* gena *G. duodenalis* iz pasa. Izdvojili su dvije skupine: C i D, vrsno specifične za pse. EY i sur. (1997.) su utvrdili postojanje genske skupine E, vrsno specifične za papkare.

MONIS i sur. (1999.) svojim istraživanjem predlažu sadašnju podjelu *G. duodenalis* na sedam skupina (A, B, C, D, E, F i G).

Članovi roda *Giardia* pripadaju porodici *Hexamitidae*, red *Diplomonadida*, razred *Zoomastigophorea*, koljeno *Metamonada*. Rod *Giardia* sadrži šest vrsti, a podjela je temeljena na morfološkim i ultrastrukturnim razlikama trofozoita (ADAM, 2001.):

*G. agilis*- dokazana u vodozemaca

*G. ardeae* i *G. psittaci*- dokazana u ptica

*G. muris* i *G. microti*- dokazana u glodavaca

### *G. duodenalis*- dokazana u sisavaca

Od navedenih vrsta samo *Giardia duodenalis* (sin. *G. intestinalis*, *G. lamblia*) parazitira u crijevima domaćih i divljih sisavaca te čovjeka, a invazija nastupa ingestijom cistama invadirane hrane ili vode (THOMPSON i MONIS, 2004.; FENG I XIAO, 2011.).

Molekularnom analizom izolata *G. duodenalis* otkriveno je najmanje osam genetski različitih skupina od kojih skupine A i B nalazimo u ljudi i brojnih drugih sisavaca pa tako i u pasa, skupinu C i D u pasa i divljih mesojeda, skupinu E u goveda, ovaca, koza, svinja, vodenih bizona i muflona, skupinu F u mačaka, a skupinu G u štakora (HOPKINS i sur., 1997.; LALLE i sur. 2005.a; LALLE i sur., 2005.b; CACCIO i RYAN, 2008.). Novija istraživanja otkrila su i skupinu H u morskih sisavaca (LASEK-NESELQUIST i sur., 2010.).

Osim razlikovanja genskih skupina A-H, novije molekularne metode, tehnike genske tipizacije omogućile su razlikovanje izolata unutar genskih skupina. Molekularne metode imaju veću osjetljivost i specifičnost od mikroskopskih metoda i imunoloških metoda pri identifikaciji genske skupine i/ili podskupine *G. duodenalis* (CACCIO I RYAN, 2008.). Ove tehnike temelje se na analizi podjedinice ribosomske RNA (*ssu-rDNA*), čimbenika produživanja 1-alfa (*ef-1α*), β-giardina (*bg*), glutamat dehidrogenaze (*gdh*), trioza fosfat izomeraze (*tpi*) i GLORF-C4 (*C4*) (CACCIO i sur., 2005.). *Tpi* je gen s najviše varijacije te je kao takav dokazano najpogodniji za razlikovanje izolata unutar genskih skupina, veliki broj varijacija pokazuju i geni *gdh* i *bg*, a mali broj varijacija u nukleotidnim slijedovima posjeduje *ssu-rRNA* gen, što ga čini pogodnim za filogenetske analize (WIELINGA i THOMPSON, 2007.).

Zahvaljujući tim metodama genske skupine A i B podijeljene su u podskupine AI, AII, BIII i BIV (MONIS i sur., 1999.), odnosno 8 podskupina unutar genske skupine A, 6 podskupina unutar genske skupine B, 2 podskupine unutar genske skupine D, 3 podskupine unutar genske skupine E. A1, A2, A3, A4 i B3 utvrđene su u ljudi, pasa i teladi te se smatra da predstavljaju mogući zoonotski potencijal (LALLE i sur., 2005.).

SULAIMAN i sur. (2003.) su analizirali *tpi* gen te su potvrdili i dokazali podskupine unutar skupine B i C, a podskupine unutar skupine E dokazali su FENG i sur. (2008.).

S obzirom na izrazite genetičke razlike između pojedinih genskih skupina *G. duodenalis* predlaže se uvođenje nove nomenklature kojom bi se sadašnja genska skupina A preimenovala u *G. duodenalis*, skupina B u *G. enterica*, skupine C i D činile bi vrstu *G. canis*, skupina E *G.*



*bovis*, skupina F *G. cati*, a skupina H *G. simondi* (THOMPSON i MONIS, 2004.; THOMPSON i sur., 2008.; MONIS i sur., 2009.).

Pokušaji uvođenja nove nomenklature, odnosno pokušaji proglašavanja genskih skupina *G. duodenalis* zasebnim vrstama kompleksno su pitanje te zahtijevaju daljnja istraživanja ovog bičaša (THOMPSON i MONIS, 2012.).

CACCIO i sur. (2008.) predlažu uvođenje nomenklature koja bi uključivala i arapski broj kao podskupinu genske skupine *G. duodenalis* (npr AII-1, AII-2 itd.), no s obzirom na veliku varijabilnost utvrđenu u istraživanjima izolata iz različitih životinjskih vrsta ova nomenklatura nije najbolje prihvaćena (LEBBAD i sur., 2010.; GÓMEZ-MUÑOZ i sur., 2012.).

### **2.5.2. Genska raznolikost giardija u ljudi i giardijoza**

Giardijoza u ljudi može biti izazvana invazijom *G. duodenalis*, genske skupine A ili B (MAYRHOFER i sur., 1995.). Brojna molekularna istraživanja ukazala su na veću učestalost genske skupine B u ljudi, neovisno o stupnju razvoja društva i ekonomije. Učestalost istovremenih invazija skupinama A i B veća je u zemljama u razvoju. Genska skupina A dijeli se na 4 podskupine (AI-AIV), pri čemu su AI i AII izolirane u ljudi, a AI, AIII i AIV u životinja. Također, skupina B dijeli se na 4 podskupine (BI-BIV) pri čemu su podskupina BIII i BIV izolirane u ljudi, a BI i BII u životinja (COOPER i sur., 2007.; GELANEW i sur., 2007.; RYAN, 2013.).

FORONDA i sur. (2008.) su analizirali izolate iz ljudi *tpi* genom u Egiptu i prvi su molekularnim metodama dokazali gensku skupinu E u ljudi. Skupina B je bila najučestalija (80%), skupina E (15%), a skupini A bila je najmanje zastupljena (5%).

Neka od istraživanja ukazuju na mogućnost rekombinacije unutar genskih skupina A i B (TEODOROVIĆ i sur., 2007.), kao i na mogućnost rekombinacije genskih podskupina AII (COOPER i sur., 2010.) i podskupina unutar genske skupine B (SIRIPATTANAPIPONG i sur., 2011.).

Giardijoza ljudi značajna je bolest, kako u industrijski razvijenim zemljama, tako i u zemljama u razvoju, a prijenos s čovjeka na čovjeka odvija se preko cistama kontaminirane hrane ili vode ili kao posljedica neadekvatnih sanitarnih uvjeta. Prevalencija bičaša *Giardia duodenalis* u razvijenim zemljama kreće se od 2-5% dok se u nerazvijenim zemljama kreće 20-

30% (FARTHING, 1997.). Simptomi giardioze su raznovrsni, a najčešće uključuju akutni ili kronični proljev te dehidraciju, abdominalne bolove, nadam, povraćanje i gubitak tjelesne težine (ECKMANN, 2003.). Kronična giardioza u djece povezuje se i s slabijim priraštanjem, kržljivošću i sporijim razvojem kognitivnih funkcija (BERKMAN i sur., 2002.).

Čimbenici koji utječu na varijabilnost kliničke slike giardioze u ljudi slabo su objašnjeni, a pretpostavlja se da su čimbenici ovisni o domaćinu (imunološki status, status uhranjenosti), kao i čimbenici vezani za uzročnika (genska skupina, virulencija) mogući uzroci različitosti kliničke slike giardioze u ljudi (HAQUE i sur., 2005.; BURET, 2007.).

HOMAN I MANK (2001.) su u istraživanju utvrdili *Giardiju duodenalis* genske skupine A u pacijenata s intermitentnim proljevom, a gensku skupinu B u pacijenata s perzistirajućim, dugotrajnim proljevom. Za razliku od toga, GEURDEN i sur. (2009.) su na temelju svog istraživanja utvrdili invaziju genskom skupinom B u pacijenata s proljevom, ali i veliki broj mješanih invazija genskim skupinama A i B. Razlog tome, pretpostavili su, je u činjenici da je određivanje pojedine genske skupine vezano za izbor metode utvrđivanja genske skupine.

Brojna istraživanja giardija ljudi provedena su diljem svijeta u svrhu utvrđivanja pripadnosti izolata pojedinoj genskoj skupini.

KOHLI i sur. (2008.) su u svom istraživanju obuhvatili uzorke stolice djece iz Brazila s proljevom te su utvrdili veću učestalost skupina B (74%) u odnosu na skupinu A (16%) te istovremenu invaziju genskim skupinama A i E (10%). Nije utvrđena povezanost intenziteta kliničkih simptoma ovisno o invaziji s pojedinom genskom skupinom.

SAHAGUN i sur. (2007.) su utvrdili da je skupina B učestalija u asimptomatske djece mlađe od 5 godina.

SUZUKI i sur. (2010.) opisali su slučaj žene iz Japana s izraženim sistemskim simptomima (edem lica, otežano disanje, eritem kože) te izrazitom eozinofilijom (ukupan broj leukocita  $27,1 \times 10^9/L$  s 82,1% eozinofila). Koprološkom pretragom utvrdili su ciste *G. duodenalis*, a nakon uspješne terapije metronidazolom došlo je do nestanka kliničkih simptoma.

LEBBAD i sur. (2008.) su u svom istraživanju analizirali 119 izolata *G. duodenalis* izoliranih iz stolica ljudi iz Nikaragve te su utvrdili 79% (94) genske skupine B i 21% (25) skupine A.

ELIGO- GARCIA i sur. (2008.) su genskom tipizacijom *Giardije duodenalis* iz 12 uzoraka stolice djece iz Meksika utvrdili samo gensku skupinu A (AI 52,6%, AII 47,4%).

IGNATIUS i sur. (2012.) su svojim istraživanjem obuhvatili 622 uzoraka stolice djece iz Ruande te su utvrdili prevalenciju *G. duodenalis* od 59,7%. Genskom tipizacijom izolata genska skupina B bila je zastupljena u 85,9% tipiziranih uzoraka (179/208), genska skupina A2 u 12,7% uzoraka (27/208), te po jedan uzorak genske skupine A1 i mješovite invazije A i B genskom skupinom. Utvrdili su i povezanost bolova u abdomenu i povraćanja s invazijom genskom skupinom A te gubitka tjelesne težine i malnutricije s invazijom genskom skupinom B.

ASHER i sur. (2014.) su svoje istraživanje usmjerili na domorodačku djecu u Australiji te su na temelju analize 87 uzoraka stolice utvrdili prevalenciju *G. duodenalis* u 66,7% uzoraka stolice. Genskom tipizacijom izolata 75,6% pripadalo je genskoj skupini B, a 24,4% izolata genskoj skupini A.

### **2.5.3. Genska raznolikost i učestalost giardija u životinja**

#### **2.5.3.1. *G. duodenalis* u domaćih papkara**

Giardije u papkara dobro su istražene te je dokazano da je najčešći oblik prijenosa neposredno s krave na telad, ali i da kohabitacija velikog broja papkara pogoduje širenju invazije. Dokazana je i kontaminacija zemlje i vode kao mogući izvor invazije *G. duodenalis* (XIAO i sur., 1994.; O'HANDLEY i sur., 1999.; WADE i sur., 2000.; BARWICK i sur., 2003.). Uz vrsno specifične genske tipove, ove životinje mogu biti rezervoari i zoonotskih genskih skupina *G. duodenalis* koje se međusobno ne razlikuju morfološki te su za njihovu identifikaciju potrebne sofisticirane molekularne metode (RYAN, 2013.).

U papkara se najčešće izolira genska skupina E *G. duodenalis*, ali u novijim istraživanjima i genska skupina A (XIAO, 1994.; O'HANDLEY 1999.; BARIGYE i sur., 2008.; XIAO i FAYER, 2008.; SANTIN i sur., 2009.; FAYER i sur., 2012.). Dokazano je da životinje sa skupinom A mogu predstavljati značajan javno zdravstveni rizik, naročito za osobe koje rukuju sa životinjama, a mogu i izmetom kontaminirati vodu što predstavlja potencijalni izvor invazije za ljude (XIAO I FAYER, 2008.; FENG I XIAO, 2011., NG i sur., 2011.; LIU i sur, 2012.; WANG i sur., 2014.). FENG i sur. (2008.) su analizirali razlike skupine E u goveda te su izolirali 11 izolata (E-I- do E-XI) i time dokazali gensku različitost skupine E.

Novijim multicentričnim ispitivanjem izolata *G. duodenalis* iz papkara u Njemačkoj, Velikoj Britaniji, Francuskoj i Italiji utvrđena prevalencija *G. duodenalis* od 45,5%, uz učestalost genske skupine A od čak 61% (Francuska), 41% (Njemačka), 29% (Velika Britanija), 28% (Italija), a učestalost miješane invazije skupinom A i E od 32% (GEURDEN i sur., 2012.).

U koza i ovaca su uglavnom izolirane genske skupine E i A, kao i miješane invazije, a nekolicinom istraživanja izolirane su i *G. duodenalis* genske skupine B (RUIZ i sur., 2008.; YANG i sur., 2009.; LEBBAD i sur., 2010.; ROBERTSON i sur., 2010.; FENG I XIAO, 2011.; ZHANG i sur., 2012.a, TZANIDAKIS i sur., 2014.), a u svinja je najčešće izolirana *G. duodenalis* genskih skupina E, A (najčešće AI i AII) i B te stoga također postoji zoonotski potencijal (SPRONG i sur., 2009.; FARZAN i sur., 2011.).

U nekoliko istraživanja utvrđena je povezanost invazije određenih dobnih skupina teladi giardijama s pojavom proljeva (O'HANDLEY i sur., 1999.; GILLHUBER i sur., 2014.)

### **2.5.3.2. Giardije u pasa i mačaka**

Zoonotski potencijal giardije u pasa i mačaka kontroverzno je i aktualno pitanje, a stupanj rizika ovisi o prevalenciji i načinima izlučivanja te invazije ovog bičša. Međutim, zoonotski potencijal posjeduju samo giardije iz genske skupine A i B (CACCIO i sur., 2005.).

U pasa su najčešće izolirane giardije genske skupine C i D, te rijede genske skupine A i B (PONCE-MACOTELA i sur., 2002.; TRAUB i sur., 2004.; LALLE i sur., 2005.b; ELIGIO-GARCIA i sur., 2008.; UPJOHN i sur., 2010.; BECK i sur., 2012.; LIANG i sur., 2012.).

Smatra se da u urbanim sredinama postoje dva različita ciklusa prijenosa *G. duodenalis*: prijenos genskih skupina specifičnih za pse među psima i prijenos genske skupine A između ljudi i pasa. U brojnim istraživanjima giardioze u pasa *G. duodenalis* izolirana je u simptomatskih i asimptomatskih životinja i u razvijenim zapadnim zemljama, kao i u brojnim zemljama u razvoju. CLAEREBOU i sur. (2009.) su u svom istraživanju koje je obuhvatilo *G. duodenalis* izoliranu iz različitih populacija pasa u Belgiji zaključili da se prijenos genskih skupina *G. duodenalis* C i D među psima češće javlja u uvjetima skupnog držanja većeg broja pasa dok je genska skupina A učestalija u pasa držanih u kućanstvima. Analizom izolata *G. duodenalis* izolirane iz pasa u Americi (SULAIMAN i sur., 2003.) izdvojena je isključivo genska

skupina C, a SOUZA i sur. (2007.) analizom izolata iz pasa u Brazilu nalaze genske skupine C i D.

PALMER i sur. (2008.) su u svrhu utvrđivanja mogućeg zoonotskog potencijala u svojem istraživanju genski tipizirali 88 izolata *G. duodenalis* izolirane iz pasa i mačaka u Australiji te su u pasa analizama *ssu-rRNA* i *bg* utvrdili genske skupine C i D uz jedan izolat genske skupine A. U izolata iz stolice mačaka utvrdili su gensku skupinu F te jedan izolat genske skupine D.

BARUTZKI i SCHAPER (2011.) su retrospektivnom studijom obuhvatili rezultate parazitoloških pretraga stolica 8560 mačaka i 24677 pasa učinjene u Njemačkoj u razdoblju od siječnja 2003. godine do prosinca 2010. godine. U navedenom istraživanju 30,4% pasa te 22,8% mačaka bili su invadirani endoparazitima. U pasa utvrđena je *G. duodenalis* (18.6 %), *Toxocara canis* (6.1 %), *Toxascaris leonina* (0.6 %), *Ancylostomatidae* (2.2 %), *Trichuris vulpis* (1.2 %), *Capillaria spp.* (1.3 %), *Crenosoma vulpis* (0.4 %), *Angiostrongylus vasorum* (0.5 %), *Taeniidae* (0.4 %), *Dipylidiidae* (< 0.1 %), *Mesocestoides spp.* (< 0.1 %), *Isospora spp.* (5.6 %), *I. ohioensis-complex* (3.9 %), *I. canis* (2.4 %), *Sarcocystis spp.* (2.2 %) i *Hammondia heydorni/Neospora caninum* (0.3 %). U mačaka utvrđena je *Giardia duodenalis* (12.6 %), *Toxocara cati* (4.7 %), *Toxascaris leonina* (0.1 %), *Ancylostoma tubaeforme* (0.2 %), *Aelurostrongylus abstrusus* (0.5 %), *Capillaria spp.* (1.0 %), *Taeniidae* (0.6 %), *Dipylidium caninum* (< 0.1 %) *Mesocestoides spp.* (< 0.1 %), *Isospora spp.* (6.0 %), *I. felis* (4.4 %), *I. rivolta* (2.2 %), *Toxoplasma gondii/Hammondia hammondi* (0.8 %) i *Sarcocystis spp.* (0.3 %). Autori su utvrdili veću učestalost *G. duodenalis* u pasa i mačaka mlađih od 6 mjeseci.

HIMSWORTH i sur. (2010.) su u istraživanju provedenom na izolatima *G. duodenalis* iz pasa u naseljima s nižim socioekonomskim razvojem u Kanadi izolirali isključivo gensku skupinu A te su zaključili da je to posljedica načina držanja životinja. Naime, psi su se slobodno kretali te im je bio omogućen kontakt s fecesom ljudi i životinja.

BALLWEBER i sur. (2010.) na temelju analize velikog broja sličnih istraživanja navode postojanje genske skupine A i B u pasa i mačaka mogućim zoonotskim potencijalom koji zahtijeva daljnja detaljna istraživanja.

PAZ E SILVA i sur. (2010.) su na temelju analize 300 uzoraka stolice pasa iz Brazila utvrdili ukupnu učestalost *G. duodenalis* od 17,3%, pri čemu je učestalost invazije *G. duodenalis* u pasa lualica iznosila 28%, a u pasa koji su boravili s vlasnicima 6,2%. 36 izolata genski je tipizirano te je u 20 uzoraka utvrđena genska skupina C, u 11 uzoraka genska skupina D, a u 5

uzoraka utvrđena je mješana invazija genskim skupinama C i D te su autori zaključili da na temelju dobivenih rezultata ne postoji veliki zoonotski potencijal giardioze pasa u Brazilu.

Istraživanje provedeno na izolatima *G. duodenalis* u pasa i mačaka u Italiji (ZANZANI i sur, 2014.) obuhvatilo je uzorke stolice 37 pasa i 17 mačaka u kojih je izolirana *G. duodenalis* pri čemu je utvrđena genska skupina C u 54,5% uzoraka stolice pasa, a genska skupina D u 45,5% uzoraka stolice pasa. U istom istraživanju 83,3% giardia izoliranih iz stolice mačaka bilo je genske skupine A, a 16,6% genske skupine D, genska skupina F u ovom istraživanju nije utvrđena.

IPANKAEW i sur. (2014.) su u istraživanju koje je obuhvatilo uzorke stolice 218 ljudi i 94 pasa iz ruralnih područja Kambodže lančanom reakcijom polimeraze utvrdili učestalost *G. duodenalis* u 18,4% uzoraka stolice ljudi te 10,6% uzoraka stolice pasa. U ljudi je genska skupina BIII bila zastupljena u 72,5% izolata te genska skupina AII u 27,5% izolata. U pasa je genska skupina C bila izolirana iz 40% izolata, genska skupina BIII u 20% izolata, a mješana invazija genskim skupinama C i D u 40% izolata. Autori su prepostavili da u ruralnim područjima postoje dva ciklusa invazije *G. duodenalis*.

AHMED i sur. (2014.) su mikroskopskom metodom pretražili 160 uzoraka stolice policijskih i kućnih pasa u Egiptu te su utvrdili učestalost *G. duodenalis* od 12% no nisu određivali genske skupine izolata. Istraživenjem su obuhvatili pse s i bez kliničkih simptoma.

GIZZI i sur. (2014.) su pretraživali uzorke stolice pasa s proljevom na eventualne bakterijske, protozoarne, virusne uzročnike proljeva, kao i na protozoarne organizme. Utvrdili su učestalost *G. duodenalis* u 13,5% uzoraka. Autori su zaključili da postojanje koinvazije više različitih uzročnika proljeva ne utječe na trajanje proljeva niti na pojavu uginuća pasa.

NEVES i sur. (2014.) su pretraživali stolicu 175 pasa bez kliničkih simptoma i 193 psa s probavnim simptomima. U pasa bez simptoma od strane probavnog trakta utvrdili su učestalost *G. duodenalis* 7,4%, *Isospora canis* 8%, *Toxocara canis* 5,1%, *Trichuris vulpis* 1,1% te mješane invazije 20,6%. U pasa s kliničkim simptomima od strane probavnog trakta utvrdili su učestalost *G. duodenalis* 15,5%, *Isospora canis* 13,5%, *Toxocara canis* 7,8%, *Trichuris vulpis* 2,6% te mješane invazije 33%. Zaključili su da invazija *G. duodenalis* ili barem jednim drugim parazitom predstavlja statistički značajan čimbenik u razvoju probavnih simptoma te da je veliki broj klinički zdravih pasa invadiran jednim ili više parazita te da zbog toga predstavlja potencijalni rizik za zdravlje ljudi i pasa.

U istraživanju koje je obuhvatilo stolice 81 psa iz skloništa te 88 stolica lovačkih pasa metodom flotacije utvrđena je ukupna prevalencija parazita probavnog trakta 71,6%. Prevalencija *G. duodenalis* bila je 37,4%, a lančanom reakcijom polimeraze utvrđene su samo genske skupine C i D (ORTUNO i sur., 2014.).

PIPIA i sur. (2014.) mikroskopski su pretražili uzorke 655 pasa (435 uzoraka porijeklom od pasa s kliničkim simptomima i 220 uzoraka porijeklom od pasa bez kliničkih simptoma) sa Sardinije (Italija), te su utvrdili ukupnu učestalost *G. duodenalis* 26,3%, pri čemu je genskom tipizacijom izolata utvrđena genska skupina D u 49% izolata, genska skupina C u 36,1% izolata i genska skupina A u 4,2% izolata. U skupini pasa s kliničkim simptomima od strane probavnog sustava učestalost *G. duodenalis* je iznosila 29%, a u skupini pasa bez kliničkih simptoma učestalost je iznosila 22%. Autori su zaključili da na Sardiniji postoji mali zoonotski potencijal *G. duodenalis*.

TSENG i sur. (2014.) su metodom lančane reakcije polimeraze na temelju analize 118 uzoraka stolice pasa (Tajvan) utvrdili učestalost *G. duodenalis* 9% (11 pozitivnih uzoraka). Genskom tipizacijom 11 izolata utvrdili su skupinu C u 7 uzoraka te skupinu D u 4 uzorka te su zaključili da nema zoonotskog potencijala.

JOHANSEN i sur. (2014.) su metodom lančane reakcije polimeraze utvrdili *G. duodenalis* u 196 uzoraka stolice od 672 pretraživana uzorka stolice pasa iz Sjedinjenih Američkih Država, savezna država Arizona. Genski su tipizirali 185 izolata i utvrdili genski skupinu C ili D u 154 uzorka, miješanu invaziju genskim skupinama C i D u 10 izolata te u jednog izolata miješanu invaziju genskim skupinama A i C.

MOHAMED i sur. (2013.) su analizirali baze podataka koje su uključivale podatke o izvršenim flotacijama uzoraka stolice oko 2,5 milijona pasa s područja Sjedinjenih Američkih Država i utvrdili ukupnu prevalenciju *G. duodenalis* 0,44%.

YANG i sur. (2014.) su na temelju analize uzoraka stolice 318 pasa s područja Kine metodom lančane reakcije polimeraze i ELISA-om utvrdili prevalenciju *G. duodenalis* 16,04%.

MARK-CAREW i sur. (2013.) su analizom 104 uzorka stolice pasa iz skloništa za nezbrinute životinje s područja države Trinidad i Tobago metodom lančane reakcije polimeraze utvrdili prevalenciju *G. duodenalis* 25%. Genskom tipizacijom izolata utvrdili su gensku skupinu C u 15,4% izolata, gensku skupinu D u 80,8% izolata i gensku skupinu E u 3,8% izolata. Autori su zaključili da nema zoonotskog potencijala.

Istraživanje učestalosti crijevnih i plućnih parazita u pasa i mačaka proveli su i RIGGIO i sur. (2013.). Istraživanje je obuhvatilo 239 pasa i 81 mačku u privatnom vlasništvu s područja središnja Italije, a *G. duodenalis* izdvojena je iz stolice 3,8% pretraživanih pasa i 1,2% pretraživanih mačaka. U pasa su utvrđeni i: *Toxocara canis* (13.0%), *Toxascaris leonina* (1.7%), *Trichuris vulpis* (3.3%), *Ancylostoma caninum* (2.0%), *Uncinaria stenocephala* (1.25%), *Strongyloides stercoralis* (0.8%), *Angiostrongylus vasorum* (0.4%), *Dipylidium caninum* (1.25%) i *Cystoisospora (Isospora) spp.* (7.5%). U mačaka su utvrđeni: *Toxocara cati* (22.2%), *Capillaria aerophila* (1.2%), *Ancylostoma tubaeformae* (1.2%), *U. stenocephala* (3.7%), *Aelurostrongylus abstrusus* (1.2%), *Mesocestoides sp.* (1.2%), *D. caninum* (1.2%), i *Cystoisospora spp.* (4.5%).

QUADROS i sur. (2013.) su na temelju analize 357 uzoraka stolice pasa lualica iz grada Lagasa, Brazil utvrdili prevalenciju *G. duodenalis* 5,3% (metodom flotacije) te 4,8% (metodom sedimentacije).

PALLANT i sur. (2015.) u svom istraživanju tipizirali 60 izolata *G. duodenalis* izolirane iz stolice mačaka te 130 izolata izoliranih iz stolice pasa u Njemačkoj. U mačaka su utvrdili podjednaku zastupljenost *G. cati* (genska skupina F, %) i *G. duodenalis* (genska skupina A, %) te su uočili statistički značajne razlike u zastupljenosti pojedinih genskih skupina s obzirom na pasminu i dob mačaka. Mačke čistokrvnih pasmina, kao i mačke mlađe od godinu dana češće su invadirane genskom skupinom A, što su autori objesnili razlikama u životnim navikama i držanju čistokrvnih mačaka te mladih mačaka. Iz uzoraka stolice pasa uglavnom su izolirane *G. duodenalis* genske skupine C i D te su autori uočili češću učestalost genske skupine D u muških životinja.

Do danas je provedeno nekoliko istraživanja giardioze pasa, ali i drugih životinjskih vrsta u Republici Hrvatskoj.

BECK i sur. (2012.) proveli su tipizaciju izolata *G. duodenalis* izoliranih iz stolica 44 pasa u privatnom vlasništvu te 52 psa iz skloništa za nezbrinute životinje. Provedena je analiza na četiri genetska lokusa: ITS1-5.8S-ITS2 (ITS), glutamat dehidrogenaza (gdh), triosefosfat isomeraza (tpi) i beta-giardin (bg). Analiza odsječaka ukazala je da su genske skupine C i D dominantne skupine *G. duodenalis* u pasa te da postoji mali zoonotski potencijal iste. Međutim, u mnogih pasa iz skloništa za nezbrinute životinje korištenjem različitih odsječaka dobiveni su različiti rezultati te su autori pretpostavili da je to posljedica vjerojatnih mješanih invazija



tipovima C i D, a ne genetske rekombinacije te da dostupne dijagnostičke metode ne omogućuju diferencijaciju između rekombinacije i mješane invazije.

Određivanje prevalencije i molekularnu tipizaciju *Giardia spp.* na sisavcima u zatočeništvu (Zološki vrt grada Zagreba) proveli su BECK i sur. (2011.b). Utvrđena je ukupna prevalencija 29%, (38 pozitivnih uzoraka od 131 pretraživana) te su sve pretražene životinje bile bez kliničkih simptoma. Od 38 pozitivnih uzoraka u 27 je učinjena genska tipizacija ugnježđenom lančanom reakcijom polimeraze (SSU-rDNA,  $\beta$ - giardin, glutamat dehidrogenaza, trioza fosfat izomeraza) te su utvrđene genske skupine A i C u parnoprstasa, B u primata, glodavaca i pećinara i A, B, C i D i *G. microti* u zvijeri. Autori su zaključili kako se izolati podrijetlom od sisavaca u zatočeništvu genetički razlikuju od izolata u ljudi i domaćih životinja.

BECK i sur. (2010.) proveli su opsežno istraživanje prevalencije *G. duodenalis* u divljih životinja u Republici Hrvatskoj. Istraživanje je obuhvatilo ukupno 832 uzorka stolice divljih životinja: obični jelen (*Cervus elaphus*, 374 uzorka), obična srna (*Capreolus capreolus*, 21 uzorak), divlja svinja (*Sus scrofa*, 144 uzorka), lisica (*Vulpes vulpes*, 66 uzoraka), smeđi medvjed (*Ursus arctos*, 19 uzoraka), vuk (*Canis lupus*, 127 uzoraka), čagalj (*Canis aureus*, 8 uzoraka) i obični zec (*Lepus europeus*, 73 uzorka). Uzorci su na prisutnost cisti giardija pretraženi korištenjem fluorescentnog mikroskopa, a utvrđena učestalost cisti giardije kretala se od vrlo niske u običnog jelena (1%), divlje svinje (1,7%) i lisice (4,5%), umjerene u vuka (10%) i čaglja (12,5%) do visoke u obične srne (24%). U uzorcima stolice smeđeg medvjeda i običnog zeca nisu utvrđene ciste *G. duodenalis*. Genskom tipizacijom izolata u jelena i srna je utvrđena genska skupina A1 i A3, vuka i čaglja A1, a uvrđene su i genske skupine B, C i D, kao i *G. microti*.

#### **2.5.4. Morfologija i životni ciklus giardija**

Članovi roda *Giardia* pripadaju porodici *Hexamitidae*, red *Diplomonadida*, razred *Zoomastigophorea*, koljeno *Metamonada*. Red *Diplomonadida* karakterizira sposobnost stvaranja cisti, kao i posjedovanje dvije jezgre i do četiri para bičeva. Pripadnici porodice *Hexamitidae* posjeduju šest do osam bičeva, dvije jezgre i medijano ili parabazalno tjelešće. Pripadnici roda *Giardia* posjeduju dva osnovna stadija: vegetativni stadij (trofozoit) i stadij cisti (ADAM, 2001.).

Članovi roda *Giardia* jednostavne su građe te imaju osnovne karakteristike eukariotske stanice, kao što su dvije jezgre s ovojnica koje su vezane za endoplazmatski retikulum, a nalaze se simetrično u odnosu na medijanu liniju. Posjeduju citoskelet složene građe i lizosomske vakuole. Citoskelet giardija građen je od proteina tubulina i giardina (ADAM, 2001.). U citoplazmi posjeduju i ribosome i zrnca glikogena, a JIMENEZ-GARCIA i sur. (2008.) su dokazali postojanje jezgrića.

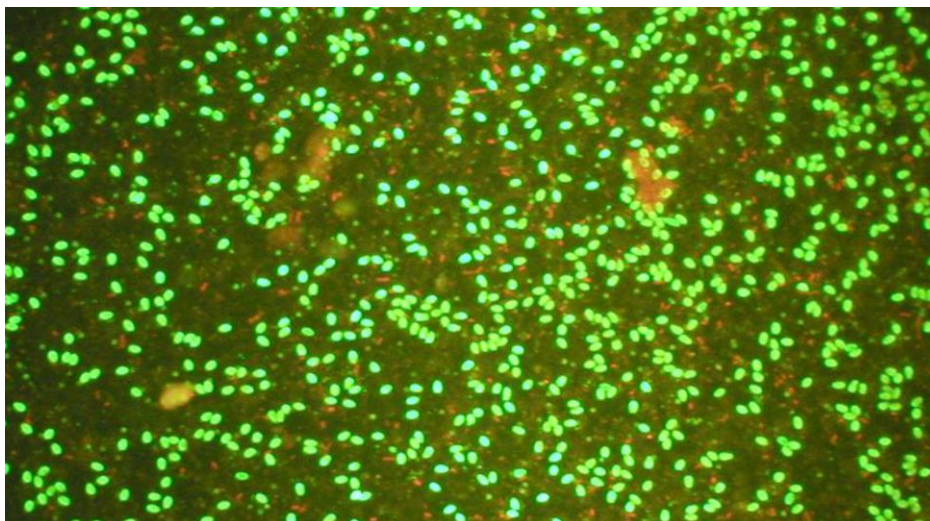
Vegetativni trofozoit kruškolikog je oblika, dugačak 12-15  $\mu\text{m}$ , širok 5-7  $\mu\text{m}$ , debljine 1-2  $\mu\text{m}$ , a posjeduje dvije jezgre s jezgrinom ovojnicom koje tokom diobe ostaju intaktne (ADAM, 2001.; SOLARI i sur., 2003.). Citoskelet trofozoita posjeduje i četiri para bičeva (flagela) koji izlaze iz dvije skupine bazalnih tjelešaca koji su smješteni ventralno, anteriolateralno, posteriolateralno i kaudalno od medijalne linije i ventralnog diska. Ove strukture građene su od mikrotubula, a važne su za pokretanje i prihvaćanje trofozoita za enterocite crijeva, a ta činjenica koristi se i pri izradi lijekova za liječenje giardioze (LUJAN i sur., 1997.; ELMENDORF i sur., 2003.; PALM i sur., 2005.; CARRANZA i sur., 2010.).

Mehanizam prihvaćanja trofozoita za enterocite crijeva objašnjava se nastankom negativnog tlaka ispod ventralnog diska (GHOSH i sur., 2001.; ELMENDORF i sur., 2003.). Ventralni disk građen je od kontraktilnih proteina, a velik je 0,4  $\mu\text{m}$ . Drugi mehanizam prihvaćanja trofozoita za enterocite crijeva je mehanički proces ovisan o kontraktilnim proteinima ventralnog diska i ventrolateralnog okrajka, a treći se temelji na vezi manoze lektinskih receptora epitelnih stanica crijeva domaćina (INGE i sur., 1988.).

Trofozoiti posjeduju i dobro razvijeni endoplazmatski retikulum te sposobnost tvorbe sekretornih vezikula. Bičaći iz roda *Giardia* ne posjeduju mitohondrije i Golgijev aparat, kao ni peroksisome i hidrogenosome (TOVAR i sur., 2003.; GOTTIG i sur., 2006.).

Sposobnost tvorbi cisti omogućuje ovim bičaćima preživljavanje izvan domaćina, nakon tvorbi cisti one bivaju izbačene u okoliš izmetom (Adam, 2001.). Ciste su razvojni stadij sposoban za invaziju (slika 1). Ciste bičaća iz roda *Giardia* ovalnog su oblika, veličine 6 do 10  $\mu\text{m}$ . Ovojnica ciste debljine je 0,3 do 0,5  $\mu\text{m}$  te posjeduje vanjski filamentozni sloj i unutarnji membranozni sloj. Ovojnica ciste sastavljena je od ugljikohidrata, pretežno N-acetil galaktozamina i proteina. Citoplazma ciste sadrži dvije do četiri jezgre, ovisno o stadiju razvoja,

bazalno tijelo, medijana tijela i kontrahirane flagele i fragmente ventralnog diska (ERLANDSEN i sur., 1990.; LUJAN i sur, 1997.).



Slika 1. Ciste giardija obilježene monoklonskim protutijelima pod fluorescentnim mikroskopom. Jezgre su obojene s 4',6'-diamidino-2-phenilindolom (DAPI). (R. Beck)

Brojnim istraživanjima promatrano je preživljavanje cisti u okolišu, kao i njihova invazivnost. GRIT i sur. (2012.) utvrdili su da je nakon 45 dana invazivnost cisti u stajskom gnoju značajno umanjena, dok nakon 90 dana ne postoji invazivna sposobnost cisti iz stajskog gnoja.

ESHAN i sur. (2015.) su pretraživali uzorke pitke vode, kao i uzorke površinskih voda te su utvrdili da u pitkoj vodi ciste giardija nisu pronađene te ne predstavljaju javnozdravstveni rizik. Međutim, u površinskih voda utvrđena je prisutnost cisti *Giardia duodenalis* u 92% uzoraka, utvrđene su genske skupine AI, AII, BIV, BIV i E, te su zaključili da osnovni javnozdravstveni rizik predstavljaju površinske vode kontaminirane životinjskim izlučevinama.

THOMPSON i sur. (1990.) su rod *Giardia* podijelili u tri morfološki različite skupine, ovisno o obliku i veličini i obliku medijanog tjelešca. Prva morfološka skupina je *G. duodenalis*, a karakterizira je izrazito kruškoliki oblik trofozoita, dug 12-15  $\mu\text{m}$  dužine te 6-8  $\mu\text{m}$  širok. *G.*

*muris*čini drugu morfološku skupinu, a karakterizirana je trofozoitima koji su okrugli, 9-12  $\mu\text{m}$  dugi i 5-7  $\mu\text{m}$  široki s okruglimmedijanim tjelešcem. Treću morfološku skupinu čini vrsta *G. agilis* s trofozoitima koji su 20-30  $\mu\text{m}$  dugi te 4-5  $\mu\text{m}$  široki s medijanim tjelešcem oblika kvržice.

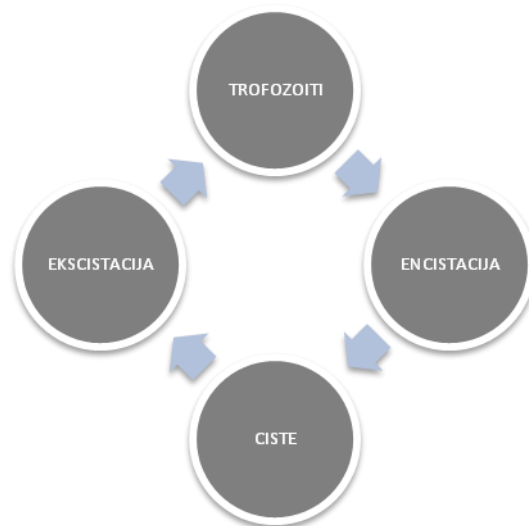
## RAZVOJNI CIKLUS

Razvojni ciklus giardija sastoji se od nekoliko stadija (slika 2):

- a) Zrele ciste giardija predstavljaju invazivni oblik ovog bičaća te su otporne na vanjske okolišne uvjete. BERMUDEZ-CRUZ i sur. (2009.) utvrdili su da u invadiranih pasa 1 g stolice sadrži od 26 do 114 486 cisti *G. duodenalis*
- b) Ingestijom unesenih cisti koje potaknute djelovanjem  $\text{H}^+$  iona, žuči ili ugljičnog dioksida u želucu započinju ekscistacija koja traje kraće od 10 minuta, a završava u duodenumu u blago lužnatom sadržaju. Time se onemogućava oštećenje trofozoita djelovanjem  $\text{HCl}$ -a. Kada bi ekscistacija završila u distalnijim dijelovima tankog crijeva niska koncentracija lipida i ostalih nutrijenata onemogućila bi invaziju (ADAM, 2001.; PALM i sur, 2005.). Nekoliko sekundi nakon puknuća ovojnice ciste nepodjeljeni trofozoit prolazi ekscistaciju te izlazi na flagelarnom polu. Slijedećih 7-8 minuta traje citodiferencijacija, odnosno dioba na dva trofozoita.
- c) Rano ekscistirani trofozoiti još nemaju završenu citokinezu te njihovom citodiferencijacijom nastaju dvije stanice kćeri.
- d) Trofozoit koji slobodno živi u tankom crijevu, a odgovoran je za patogenezu kliničkih simptoma prihvaća se pomoću ventralnog adhezivnog diska za resice enterocita duodenuma i jejunuma te se umnaža podužnim binarnim diobama. Neprihvaćeni trofozoiti bivaju peristaltikom otplavljeni u ileum i kolon te tamo započinje encistacija.
- e) Encistacija traje oko 12-14 sati, a aktivacijski čimbenik koji uzrokuje encistaciju je još uvijek predmet istraživanja. Prema nekim istraživanjima smanjena količina kolesterola potiče encistaciju (LUJAN i sur, 1996.). Naime, trofozoiti giardija ne mogu sintetizirati kolesterol nego koriste kolesterol iz sadržaja crijeva. Crijevo nositelja resorbira kolesterol iz sadržaja jejunuma te je koncentracija ovog lipida u sadržaju cijeva distalno od jejunuma vrlo niska. Mehanizam kojim trofozoiti detektiraju nisku koncentraciju kolesterola u sadržaju crijeva objašnjen je dokazom

membranskih proteina smještenih na endoplazmatskom retikulumu, perifernim vakuolama te staničnoj membrani (engl. *Giardia lamblia low density lipoprotein receptor-related protein; GILRP*) (ADAM, 2001., RIVERO i sur., 2010., RIVERO i sur., 2011.). Oblikovanje ovojnice ciste odvija se u dvije faze, a traje oko 12 sati; prvu fazu čini sinteza dovoljne količine stanične građe, a drugu fazu predstavlja prihvaćanja za crijevni epitel te bivaju fecesom izbačene u okoliš. Unutar cisti odvija se nespolna dioba kojom nastaje cista sa četiri jezgre te prilikom ekscistacije nastanu dva trofozoita sa po dvije jezgre (MEYER, 1985.; ERLANSEN i sur., 1996.) .

Brojni bakterijski, gljivični i protozoarni patogeni razvili su obrambene mehanizme kojima izbjegavaju imunosne odgovore domaćina. Jedan od takvih mehanizama je i antigenska varijacija, a karakterizirana je kontinuiranom promjenom površinskih antigena (NASH i sur., 2002.; DEITSCH i sur., 2009.). Giardija također posjeduje sposobnost varijacije površinskih antigena. Trofozoiti giardije u potpunosti su prekriveni površinskim antigenima poznatih kao varijacijski specifični površinski antigeni (eng. Variant-specific Surface Proteins- VSPs) koji se mijenjaju svakih 6-13 generacija (NASH i sur., 2002.; PRUCCA i sur., 2008.).



Slika 2. Razvojni ciklus giardija

### 2.5.5. Patogeneza

Invazija *G. duodenalis* u pasa uglavnom započinje ingestijom cistama kontaminirane hrane ili vode. U duodenumu nakon encistacije nastaju dva trofozoita koji se ventralnim diskom prihvaćaju za površinu crijevnog epitela. Trofozoiti se umnažaju binarnom diobom te nakon encistacije kao ciste bivaju izbačeni stolicom. Patogeneza nastanka bolesti uzrokovane invazijom *G. duodenalis* nije još u potpunosti razjašnjena, no veliki broj in vitro i in vivo istraživanja dovelo je do zaključka da je patogeneza složena. Smatra se da su mogući mehanizmi produkcija toksina, poremećaj fiziološke mikroflore, indukcija upalne bolesti crijeva, inhibicija enzimske produkcije enterocita, skraćivanje mikrosesica enterocita, indukcija poremećaja motiliteta crijeva i apoptoza epitelnih stanica crijeva. Ovi mehanizmi za posljedicu imaju malapsorpciju i hipersekreciju (TANGTRONGSUP i SCORZA, 2010.).

Smatra se da *G. duodenalis* utječe na smanjivanje sposobnosti sluznice tankih crijeva da absorbira elektrolite, hranjive tvari i vodu. Ovi procesi dovode do malapsorpcije, maldigestije te proljeva (BURET i sur., 2002.).

Gijardije uzrokuju atrofiju i skraćivanje crijevnih resica (WILIAMSON i sur., 2000.; SCOTT i sur., 2002.). Smatra se da postoje i drugi patološki procesi koji pospješuju nastanak proljeva kao što su umanjena aktivnost crijevnih disaharidaza (DANIELS i BELOSEVIC, 1992.) i proteaze (SEOW i sur, 1993.).

BURET i sur. (2002.) su utvrdili da trofozoiti *G. duodenalis* prilikom prihvaćanja za epitel crijeva dovode do oštećenja spojeva među epitelnim stanicama i time povećavaju propustnost epitela crijeva.

JIMENZ i sur. (2004.) su u svom istraživanju utvrdili da pojedini antigeni podrijetlom od *G. duodenalis* potiču infiltraciju sluznice crijeva eozinofilima i deskvamaciju enterocita što pridonosi patogenetskim procesima.

BURET i sur. (2008.) navode nekoliko mehanizama koji utječu na patogenetske procese giardioze. Smatraju da invazija ovim bičlašem uzrokuje proljev kao posljedicu malapsorpcije i pojačane sekrecije u lumenu crijeva. Malapsorpcija i maldigestija posljedica su skraćivanja crijevnih resica, a ova oštećenja enterocita nastaju kao posljedica aktivacije T limfocita domaćina. Patološka aktivacija T limfocita posljedica je oštećenja veza među enterocitima, a gubitak funkcije epitelne barijere rezultat je apoptoze enterocita uzrokovane invazijom giardija.

Novija istraživanja ukazuju da ovi procesi mogu pogodovati nastanku upalne bolesti crijeva, sindroma iritabilnog probavnog trakta i alergijama, no mehanizmi ovih pojava još nisu objašnjeni.

Obrambeni mehanizmi domaćina na invaziju *G. duodenalis* dijele se na imunosne i neimunosne (MÜLLER i ALLMEN, 2005.).

Poznato je da *G. duodenalis* posjeduje sposobnost mijenjanja površinskih antigena. Rein vazije *G. duodenalis* česte su, a razlozi tome su što ne postoji adekvatna stečena imunost, najvjerojatnije kao posljedica nedostatnog imunosnog odgovora domaćina i varijacije površinskih antigena parazita. Rezultati nekoliko istraživanja ukazali su na važnost mastocita kao izvora IL-6 pri eliminaciji *G. duodenalis* (LI i sur, 2004.). Također, mehanizam ovisan o T-limfocitima smatra se od iznimne važnosti u kontroli akutne faze invazije ovim bičašem (SINGER i NASH, 2000.).

ALEY i sur. (1994.) dokazali su citotoksični učinak bioaktivnih peptida u probavnom traktu.

ECKMAN i sur. (2003.) su utvrdili važnost epitelijalnog dušikovog oksida u suzbijanju invazije bičašima iz roda *Giardia*, no i sposobnost ovih bičaša da uvelike umanju produkciju dušikovog oksida u epitelnim stanicama crijeva. Smatra se da je uzrok tome sposobnost giardija da koristi velike količine arginina koji predstavlja substrat za proizvodnju dušikovog oksida.

### **2.5.6. Klinička slika**

*G. duodenalis* najčešći je crijevni parazit u ljudi te uzrokuje akutni ili kronični proljev, mučninu, bolove u abdomenu, dehidraciju, nadam i gubitak tjelesne mase (FARTHING, 1997.; ECKMANN, 2003.).

Invazija pasa bičašima *G. duodenalis* vrlo je česta, ali često i asimptomatske prirode (TANGTRONGSUP i SCORSA, 2010.).

Invazije pasa *G. duodenalis* vrlo su česte, a klinička slika varira od subkliničke, blage do izrazite. Najčešće se javljaju probavni simptomi od kojih je najučestaliji proljev koji varira od mekše formirane stolice pa sve do potpuno profuznog i vodenastog proljeva, te može biti akutnog ili kroničnog tijeka. U stolici može biti prisutna i sluz, te se može javiti i flatulencija. Ponekad je prisutna i steatoreja te vrlo neugodan miris stolice. Većina pasa je afebrilna. U nekih životinja zabilježena je i malabsorpcija s gubitkom tjelesne mase. U imunokompetentnih

životinja proljev je često samoograničavajući. Pri kliničkom pregledu palpacijom abdomena često se mogu palpirati zadebljali zavoji tankih crijeva. U imunosuprimiranih životinja te u prisutnosti koinfekcija klinička slika može biti jačeg intenziteta (HERNOT i sur. 2005.; OWENS i GREENSON, 2007.; TANGTRONGSUP i SCORSA, 2010.).

U životinja invadiranih *G. duodenalis* nalazi hematoloških i biokemijskih pretraga krvi uglavnom su u fiziološkim granicama te u literaturi nisu zabilježena odstupanja koja bi se smatrala patognomoničnima. U pasa s intenzivnim i učestalim proljevom nalazi hematoloških i biokemijskih odrednica mogu upućivati na dehidraciju i gubitak elektrolita. Rendgenološkom pretragom abdomena ponekad se utvrdi prisutnost veće količine plina ili tekućeg sadržaja u tankim crijevima (TANGTRONGSUP i SCORSA, 2010.).

### **2.5.7. Dijagnostika, liječenje i profilaksa giardijoze pasa**

Dijagnostika giardijoze pasa u svakodnevnoj praksi uključuje izravno mikroskopiranje nakon izvođenja pasivne flotacije ili flotacije sa centrifugiranjem, imunofluorescenciju, utvrđivanje antigena uz pomoć imunoenzimnog testa (ELISA) te umnažanje odsječaka DNA PCR metodom. Ove metode koriste se zasebno ili se primjenjuje dijagnostika s više dostupnih metoda.

Liječenje pasa u kojih su utvrđene ciste *G. duodenalis* u fecesu ponekad je frustrirajuće i za veterinare i za vlasnike jer lijekovi s antiprotozoarnim djelovanjem kao što su fenbendazol i metronidazol ne osiguravaju 100%-tnu učinkovitost u liječenju giardijoze pasa te često dolazi do superinfekcija. Lijekovi koji se najčešće koriste u liječenju giardijoze pasa preuzeti su iz humane medicine. Najčešće korišteni lijek u liječenju giardijoze pasa je metronidazol, a ponekad se umjesto metronidazola koriste fenbendazol ili kombinirana terapija pirantelom, prazikvantelom i febantelom (ROSSIGNOL, 2010.; MIRO i sur., 2007.; BOWMAN i sur., 2009.).

U novije vrijeme rađena su istraživanja u svrhu utvrđivanja učinkovitosti nekih drugih lijekova pri suzbijanju giardijoze pasa. FIECHTER i sur. (2012.) istraživali su učinkovitost ronidazola u terapiji giardijoze te su navedeni lijek aplicirali per os psima u dozi od 30-50 mg na kilogram tjelesne težine svakih 12 sati tijekom 7 uzastopnih dana, uz mjere čišćenja i



dezinfekcije okoliša pasa i kupanje pasa u otopini klorheksidina što je rezultiralo da je u svih istraživanih pasa (7) nalaz pretrage stolice na *G. duodenalis* bio negativan minimalno 26 dana po završenoj terapiji.

Nekoliko istraživanja potvrdilo je učinkovitost prehrane hranom bogatom vlakninom ili komercijalno dostupnim pripravcima koji sadržavaju probiotike u kontroli kliničkih simptoma giardioze, najvjerojatnije kao posljedica sprječavanja prihvaćanja giardija za crijevne resice ili ublažavanja patološkog preraštavanja crijeva bakterijama (SIMPSON i sur., 2009.).

Najučinkovitiji način prevencije invazije *G. duodenalis* sprječavanje je ingestije invazivnih cisti onemogućavanjem životinja da piju potencijalno kontaminiranu vodu, odnosno prokuhavanje ili filtriranje vode iz okoliša prije davanja životinjama. Jedna od vrlo važnih i učinkovitih metoda smanjivanja kontaminacije okoliša cistama *G. duodenalis* je i sakupljanje fecesa pasa nakon defekacije (SMITH i sur., 2014.).

Postojeća cijepliva klasificirana su od strane American Animal Hospital Association (Udruženje američkih veterinarskih bolnica) kao nepreporučljive (OLSON i sur., 2001.).

### **2.5.8. Učestalost i značaj invazija najčešćim crijevnim parazitima u pasa**

Parazitarne invazije probavnog trakta učestale su diljem cijelog svijeta, kako u urbanim, tako i u ruralnim sredinama. Invazije probavnog trakta često su asimptomatske ili pak uzrokuju jedan ili više simptoma od strane probavnog sustava. Iz tog razloga prilikom prezentacije svih pacijenata sa simptomima od strane probavnog sustava, ali i s nespecifičnim simptomima kao što je gubitak tjelesne težine potrebno je na listu diferencijalnih dijagnoza uvrstiti i parazitarne invazije te ih isključiti ili potvrditi nekom od dostupnih dijagnostičkih metoda. Neki od parazita koji se često nalaze u probavnom traktu pasa posjeduju i zoonotski potencijal.

ZANZANI i sur. (2014.) su na temelju izvršenih flotacija 253 uzorka stolica pasa s područja Italije utvrdili ukupnu prevalenciju crijevnih parazita u pasa 28.16% (urbana sredina) - 57.41% (ruralna sredina). Utvrdili su sljedeće parazite: *Toxocara canis*, *Toxascaris leonine*, *Ancylostomatidae*, *Trichuris vulpis*, *Strongyloides stercoralis*, *Eucoleus aerophilus*, *Dipylidium*

*caninum*, *Cystoisospora* sp., *Giardia duodenalis*, pri čemu je najveću prevalenciju imala *G. duodenalis* (16,05-25,58%).

LITTLE i sur. (2009.) su obradili podatke izvršenih koproloških pretraga 1,199,293 uzoraka stolice pasa, zaprimljenih u laboratorij "Antech Diagnostics" u Sjedinjenim Američkim Državama tijekom 2006. godine. Uzorci su pretraženi metodom flotacije s cink sulfatom uz centrifugiranje, a utvrđena je sljedeća učestalost parazitarnih invazija: askaridi (2.2%), *Ancylostoma* spp. (2.5%), *Trichuris vulpis* (1.2%), *G. duodenalis* (4.0%), I *Cystoisospora* spp. (4.4%). Autori su utvrdili veću učestalost parazitarnih invazija u maldih pasa starosti do 6 mjeseci (29,6%) u usporedbi s psima starijima od 1 godine (6,1%).

BARUTZKI i SCHAPER (2011.) su retrospektivnom studijom obuhvatili rezultate parazitoloških pretraga stolica 8560 mačaka i 24677 pasa učinjene u Njemačkoj u razdoblju od siječnja 2003. godine do prosinca 2010. godine. 30,4% pasa bilo je invadirano endoparazitima. U pasa utvrđena je *G. duodenalis* (18.6 %), *Toxocara canis* (6.1 %), *Toxascaris leonina* (0.6 %), *Ancylostomatidae* (2.2 %), *Trichuris vulpis* (1.2 %), *Capillaria* spp. (1.3 %), *Crenosoma vulpis* (0.4 %), *Angiostrongylus vasorum* (0.5 %), *Taeniidae* (0.4 %), *Dipylidiidae* (< 0.1 %), *Mesocestoides* spp. (< 0.1 %), *Isoospora* spp. (5.6 %), *I. ohioensis-complex* (3.9 %), *I. canis* (2.4 %), *Sarcocystis* spp. (2.2 %) i *Hammondia heydorni/Neospora caninum* (0.3 %).

U nastavku su ukratko opisana najznačajnije karakteristike crijevnih parazita koji se najčešće pojavljuju u pasa, pa tako i u istraživanju koje je predmet ove disertacije.

*Trichuris vulpis* najčešći je crijevni nematod u pasa u kojih parazitira u debelom crijevu. Spolno zrele jedinke *T. vulpis* parazitiraju u cekumu i kolonu pasa i lisica pri čemu im je dugački, nitasti dio (glava) zabijen u sluznicu crijeva domaćina, a posteriorni okrajak slobodan je u lumenu crijeva. Nakon oplodnje ženka izlučuje jajašca (slika 2) koja izmetom bivaju izbačena u okoliš (slika 3.) te ovisno o vremenskim uvjetima u tlu za 3 do 8 tjedana embrioniraju u infekcioznu larvu u jajašcu. Takva jajašca koja sadržavaju infekciozne larve budu unešena ingestijom u domaćina, larve napuštaju jajašca i smještaju se u sluznicu gdje unutar dva tjedna postižu spolnu zrelost. Prepatentni period iznosi 8-12 tjedana. Odrasle jedinke dugačke su 4,5 – 7,5 cm. Klinička slika varira od asimptomatske invazijedoizrazitih akutnih ili kroničnih proljeva s hipoalbuminemijom, anemijom, letargijom i gubitkom tjelesne težine, kao i pojava imunološke

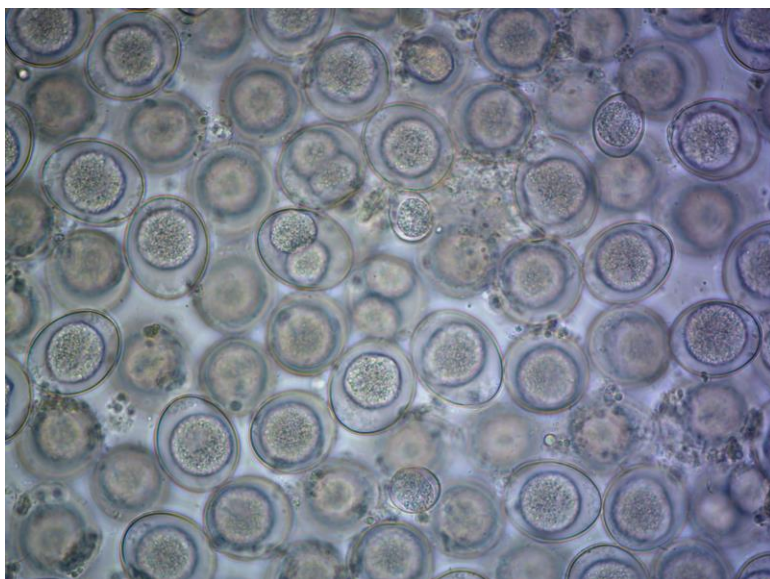
deficijencijete predisponiranost ostalim patogenima. U štenadi se učestalo javlja zastoj u rastu (TRAVERSA, 2011.).



Slika 3. Jajašce *T. vulpis* (R. Beck).

Cryptosporidium spp. kokcidije su koje parazitiraju u tankom crijevu brojnih sisavaca, uključujući i pse, a posjeduju i zoonotski potencijal. Psi su najčešće invadirani s *C. canis* te je invazija ovim protozoarnim organizmima rasprostranjena po cijelom svijetu uz učestalost oko 5% u populaciji pasa. Psi se cistama invadiraju ingestijom kontaminirane hrane ili vode, iz oociste se u probavnom traktu pasa oslobađaju sporozoiti koji prodiru u crijevni epitel gdje se prvo razmnožavaju nespolno, a potom gametogonijom nastaju zigote koje encistiraju u oociste. Oociste mogu imati tanku ovojnica te pucaju u tankom crijevu i uzrokuju autoinvaziju, ili debelu ovojnica te izmetom bivaju izbačene u okoliš. Invazija kriptosporidijama najčešće je asimptomatska, iako u mladih životinja, kao i u životinja koje boluju od neke druge bolesti, često može uzrokovati vodenasti proljev karakterističan za tanko crijevo, gubitak tjelesne mase i gubitak apetita. Ne postoji jedinstveni usvojeni protokol terapije kriptosporidijaze, no najčešće se upotrebljavaju tilozin ili azitromicin. Cilj terapije je zaustavljanje proljeva, a ne eliminacija uzročnika (SCORZA i TANGTRONGSUP, 2010.).

*Isoospora canis* najčešća je kokcidija koja invadira pse. Ovaj protozoarni mikroorganizam vrsno je specifičan za pse. Oociste (slika 4.) sporuliraju tijekom 8 sati te bivaju ingestijom unešene u nositelja ili izvor zaraze može predstavljati tkivo parateničnih nositelja unešeno ingestijom. U crijevu oociste egzistiraju pri čemu izlaze sporozoiti koji invadiraju stanice epitela crijeva. U nositeljima se nastavlja umnažanje a novonastale ciste nesporulirane bivaju izbačene u okoliš gdje sporuliraju za 12 ili više sati. U pasa su invazije *I. canis* vrlo često asimptomatske, a u imunodeficientnih pacijenata česti su dugotrajni proljevi s gubitkom tjelesne mase, gubitak apetita, dehidracija te tragovi krvi u stolici. Prisutnost spora *I. canis* u pasa najčešće se dokazuje flotacijom, a liječenje se temelji na aplikaciji sulfonamida i potpornoj terapiji (LAPPIN, 2010.).



Slika 4. Oociste *I. canis* (R. Beck)

#### *Uncinaria* spp./ *Ancilostoma* spp.

Oblici iz rodova *Ancylostoma* (*A. caninum*, *A. braziliense*) i *Uncinaria* (*U. stenocephala*) parazitiraju u tankom crijevu pasa, a posjeduju i zoonotski potencijal. Invazija nastupa ingestijom slobodnoživuće larve treće generacije, laktogeno ili putem parateničnog nositelja. Ličinka treće generacije ima sposobnost penetracije u kožu (larva migrans). Većina ličinki unešenih ingestijom uvlači se u sluznicu crijeva gdje nastavlja svoj razvoj, a potom se vraćaju u lumen crijeva i postaju spolno zrele. Neke ingestijom unešene ličinke krvlju ili izravnom migracijom dospijevaju

u periferne organe i tkiva (mišićno ili masno tkivo) gdje mogu preživjeti i do nekoliko godina. Klinički simptomi najčešće se javljaju u štenadi i starih, imunosuprimiranih pasa, a uključuju krvavi proljev, melenu te anemiju. Tijekom migracije ličinki mogu se javiti i simptomi od strane dišnog sustava (kašalj, iscjedak iz nosa) i povišenje tjelesne temperature. Dijagnostika se temelji na otkrivanju jajašaca strongilidnog tipa (slika 5) u stolici pasa, no ona su u stolici prisutna tek nakon spolnog sazrijevanja ovih oblića. Prepatentni period za *A. caninum* iznosi 2 do 3 tjedna, a za *A. braziliense* i *U. stenocephala* 14 do 18 dana (EPE, 2009., TRAVERSA, 2012.).

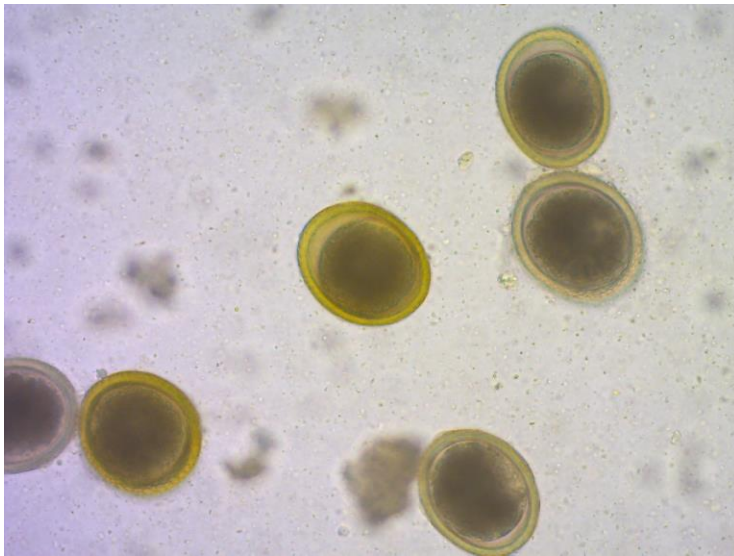


Slika 5. Jajašce strongilidnog tipa, *Uncinaria/Ancilostoma* (R. Beck)

*Toxocara canis* veliki je oblič koji parazitira u tankom crijevu pasa i divljih kanida, a posjeduje i zoonotski potencijal. Odrasle ženke mogu narasti do 18cm, a mužjaci do 10 cm. Razvojni ciklus složen je i može se odvijati na nekoliko načina. Odrasle ženke u crijevu nosioca izlučuju jajašca (slika 6.) koja bivaju izbačena fecesom i pod povoljnim uvjetima embrioniraju u invazivni oblik (ličinka drugoga stupnja) koji bude ingestijom unesen u domaćina. Tako unesena ličinka u mladih pasa krvotokom migrira do pluća i tu se presvlači, biva iskašljana, progutana i ponovno se dva puta presvlači u crijevu domaćina, sve do spolne zrelosti. U starijih pasa najčešće ne dolazi do migracije ličinki kroz dišni sustav, već većina ličinki nastavlje somatsku



migraciju krvotokom u organe i mišićje. Tkivne ličinke za vrijeme gravidnosti domaćina mogu aktivno izlaziti iz tkiva i krvlju migrirati do ploda te u plodu migrirati do pluća, a potom i trahejom u ždrijelo i u crijevo. Štenad se može invadirati i galaktogeno. Invazija ovim oblicima u odraslih pasa najčešće uzrokuje probavne simptome slabijeg intenziteta, a u štenadi i dišne simptome, proširenje abdomena, intenzivan proljev, pa i uginuće (OVERGAAUW, 1997.; OVERGAAUW i KNAPEN, 2013.).



Slika 6. Jajašca *T. canis* (R. Beck)

*Toxascaris leonina* crijevni je nematod pasa i mačaka. Nakon što jajašca budu peroralnim putem unešena u organizam ličinka izlazi iz jajašca i zavlaci se u sluznicu tankih crijeva gdje se dalje razvija. Odrasle jedinke izlučuju jajašca koja pak u okolišu embrioniraju unutar 3-6 dana te postaju invazivna. Klinički simptomi (proljev, gubitak tjelesne mase) javljaju se pretežno u mladih ili imunodeficientnih pasa (MARINCULIĆ i BECK, 2010.).

### **2.5.9. Uloga klostridija u patogenezi bolesti probavnog trakta**

Uloga bakterija u patogenezi razvoja probavnih simptoma u pasa kontroverzna je i predmetom je brojnih istraživanja. Kao najčešće patogene bakterije u probavnom traktu pasa navode se *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. i *E. coli*. Pri svakodnevnim dijagnostičkim izazovima veterinarima je ponekad teško izabrati odgovarajući protokol uzimanja i obrade stolice u svrhu izolacije i identifikacije bakterijskih

patogena. Razlog tome je što ne postoji opće prihvaćeni protokol za ove postupke već samo niz preporuka i mišljenja. Većina bakterijskih patogena povezuje se s samoograničavajućim proljevima te se ne liječe antimikrobnim lijekovima već potpornom terapijom. *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. potencijalni su izvori zoonoza, no niti u liječenju ovih bakterijskih infekcija antimikrobni lijekovi ne promjenjuju se rutinski (MARKS i sur., 2011.).

### 2.5.9.1. Uloga *C. perfringens* u patogenezi proljeva u pasa

*Clostridium perfringens* gram-negativna je, anaerobna, štapičasta bakterija koja posjeduje sposobnost tvorbi endospora, a smatra se jednom od najraširenijih patogenih bakterija te nastanjuje probavni trakt ljudi i životinja. Endospore tipova B, C i D bakterije *C. perfringens* mogu u tlu preživjeti više mjeseci. *C. perfringens* tvori veliki broj različitih letalne toksina koji se, ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  itd.), te i desetak drugih toksina, uključujući CPE (*Clostridium perfringens* enterotoksin) pa je unutar vrste bakterija podijeljena u tipove označene slovima od A do E, ovisno o tome koje toksine tvori (tablica 9).

Tablica 9. Tvorba letalnih toksina s obzirom na tip *C. perfringens*.

Tip <i>C. perfringens</i>	Toksin alfa ( $\alpha$ )	Toksin beta ( $\beta$ )	Toksin jota ( $\iota$ )	Toksin epsilon ( $\epsilon$ )
A	+	-	-	-
B	+	+	-	+
C	+	+	-	-
D	+	-	-	+
E	+	-	+	-

*C. perfringens* tip A povezuje se s trovanjem hranom u ljudi te s akutnim i kroničnim proljevima u pasa i sindromom akutnog hemoragijskog proljeva u pasa. Uloga CPE u patogenezi proljeva u pasa kontroverzna je, naime, ovaj enterotoksin dokazan je (ELISA) u 34% pasa s proljevom, ali i u 5-14% pasa bez proljeva. Ostaje pretpostavka da je ovaj patogen vjerojatno oportunistički patogen koji kliničke simptome izaziva u koinfekciji s nekim drugim patogenima

ili je slučajan nalaz u pasa. Dijagnostika infekcije *C. perfringens* temelji se na dokazu uzročnika uz dokaz CPE. CPE se u komercijalne svrhe najčešće dokazuje ELISA-om, međutim na ovaj način ovaj enterotoksin je dokazan u čak 14% asimptomatskih pasa. PCR metodom dokazuju se geni povezani s virulencijom uzročnika (*cpe*, *cbp2*) no ova metoda ne bi se trebala koristiti kao jedina metoda u dijagnostici infekcije, već zajedno s ELISA metodom dokaza CPE (MARKS i sur., 2011.; WEESE, 2011.).



### 3. OBRAZLOŽENJE TEME

Pojava simptoma u pasa invadiranih s *G. duodenalis* nije u potpunosti razjašnjena, ne samo u pasa već i ostalih kralježnjaka, tako da bi razumijevenje pojedinih genetskih skupina *G. duodenalis* u pasa bez i s kliničkim simptomima i utjecaj na intenzitet probavnih simptoma moglo biti model i za druge životinje i ljude. Kako do sada nije provedeno sustavno istraživanje ove problematike hipoteze ovog istraživanja su slijedeće:

- G. duodenalis* pojavljuje se u pasa s kliničkim simptomima;
- G. duodenalis* pojavljuje u pasa bez kliničkih simptoma;
- postoje razlike u intenzitetu kliničkih simptoma s obzirom na genski tip *G. duodenalis*;
- postoje istovremene invazije s više različitih vrsta crijevnih parazita.

Ciljevi ovog istraživanja su:

- utvrđivanje pojavnosti *G. duodenalis* u uzorcima stolice pasa s proljevima;
- utvrđivanje pojavnosti *G. duodenalis* u uzorcima stolice pasa bez proljeva;
- procjena intenziteta kliničkih simptoma u pasa i njihova korelacija s pojavnosti *G. duodenalis*;
- određivanje korelacije između pojedinih genetskih skupina *G. duodenalis* i intenziteta kliničkih simptoma u pasa;
- određivanje korelacije između intenziteta probavnih simptoma i pojavnosti koinvazije s više vrsta crijevnih parazita.

#### 4. MATERIJALI I METODE

U istraživanje su bila uključena 82 psa uvedena u ambulantni protokol (Inc. Veterina) koji su zaprimljeni u Kliniku za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu zbog probavnih simptoma kao i psi koji su obrađivani u svrhu sistematskih pregleda, a nisu imali probavne simptome, odnosno, samo psi za koje su u ambulantnom protokolu postojali anamnestički podaci, podaci o izvršenom kliničkom pregledu, laboratorijskim pretragama krvi te pretragama stolice. Istraživanjem su obuhvaćeni psi neovisno o spolu i pasmini, stariji od godinu dana te samo psi koji su redovito cijepljeni protiv parvovirusne infekcije pasa i koronavirusne infekcije pasa.

Psi su podijeljeni na dvije skupine: psi s probavnim simptomima (simptomatski) i psi bez prisutnih probavnih simptoma (asimptomatski). Obje ove skupine podjeljene su na pse pozitivne na *G. duodenalis* i pse negativne na *G. duodenalis*. Unutar skupine pozitivnih na *G. duodenalis* formirane su skupine pasa ovisno o pojedinom genskom tipu *G. duodenalis*.

Psi uključeni u istraživanje bili su klinički pregledani u svrhu isključivanja drugih sistemskih bolesti te su od vlasnika/držaoca uzeti temeljiti anamnestički podaci kako bi se utvrdio intenzitet eventualnih kliničkih simptoma.

Klinički se pregled sastojao od:

- a) mjerenja tjelesne temperature, određivanja frekvencije bila i disanja
- b) pregleda vidljivih sluznica i palpacije potkožnih limfnih čvorova
- c) auskultacije pluća i srca
- d) palpacije abdomena

##### Uzimanje i priprema uzoraka krvi

Svim psima uzeta je krv iz *venae cephalicae antebrachii* u epruvete s kalij-etilen diamino tetraoctenom kiselinom (EDTA) za hematološke pretrage i u epruvete s gelom za biokemijske

pretrage. Krv iz epruvete s gelom ostavljena je 30 min da se zgruša te centrifugirana na 3000 okretaja tijekom 10 minuta.

Krv iz epruvete s antikoagulansom iskorištena je za dobivanje hematoloških pokazatelja na hematološkom brojaču Backer System Serrano 9120 (Serrono-Backer Diagnostic, Inc, Allentown, Pennsylvania, SAD) i za diferencijalnu krvnu sliku (krvni razmaz bojan standardnim bojanjem May-Grunwald-Giems). Diferencijalna krvna slika dobivena je brojenjem udjela segmentiranih i neselementiranih granulocita, monocita i limfocita na 100 leukocita u preparatima krvnog razmaza. Rasponi referentnih vrijednosti za pojedine pokazatelje kompletne krvne slike navedeni su u tablici 10.

Tablica 10. Referente vrijednosti istraživanih hematoloških pokazatelja Laboratorija Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

<b>POKAZATELJ</b>	<b>MJERNA JEDNICA</b>	<b>REFERENTNI RASPON</b>
<b>Eritrociti</b>	$\times 10^{12}/L$	5,5-8,5
<b>Hematokrit</b>	%	37-55
<b>Hemoglobin</b>		120-180
<b>Trombociti</b>	$\times 10^9/L$	200-700
<b>MCV</b>		60-77
<b>MCH</b>		19-23
<b>MCHC</b>		320-360
<b>MPV</b>		
<b>RDW</b>		
<b>Leukociti</b>	$\times 10^9/L$	6-17
<b>Segmentirani neutrofili</b>	%	60-77
<b>Neselementirani neutrofili</b>	%	0-1
<b>Limfociti</b>	%	12-33
<b>Eozinofili</b>	%	2-10
<b>Bazofili</b>	%	
<b>Monociti</b>	%	3-10

Serum je iskorišten za određivanje sljedećih pokazatelja: urea, kreatinin, glukoza, alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, alkalna fosfataza, ukupni bilirubin, alfa-amilaza, lipaza, ukupni proteini, albumini, kreatin kinaza, kolesterol i trigliceridi koje su sastavni dio

biokemijskog profila, kako u dijagnostici bolesti probavnog sustava, tako i pri izvođenju sistematskih pregleda klinički zdravih pasa. Biokemijski pokazatelji određivani su u cilju isključivanja bolesti ostalih organskih sustava koje mogu dovesti do pojave nespecifičnih kliničkih simptoma (npr. zatajivanje bubrega). Biokemijski pokazatelji određeni su standardnim metodama na biokemijskom analizatoru Olympus AU 600 s kemikalijama tvrtke Olympus (Olympus diagnostica GMBH). Rasponi referentnih vrijednosti za pojedine biokemijske pokazatelje u serumu pasa navedeni su u tablici 11.

Tablica 11. Referente vrijednosti istraživanih biokemijskih pokazatelja Laboratorija Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

<b>POKAZATELJ</b>	<b>MJERNA JEDNICA</b>	<b>REFERENTNI RASPON</b>
<b>Ureja</b>	mmol/L	3.3-8,3
<b>Kreatinin</b>	μmol/L	40-140
<b>Ukupni proteini</b>	g/L	55-75
<b>Albumini</b>	g/L	26-33
<b>Ukupni bilirubin</b>	μmol/L	-8,6
<b>Glukoza</b>	mmol/L	3,6-5,5
<b>ALT</b>	U/L	-88
<b>AST</b>	U/L	-82
<b>ALP</b>	U/L	20-156
<b>CPK</b>	U/L	-160
<b>Amilaza</b>	U/L	-1600
<b>Lipaza</b>	U/L	13-200
<b>Kolesterol</b>	mmol/L	3,5-7,1
<b>Trigliceridi</b>	mmol/L	0,2-1,3

#### 4.1. KLINIČKA PROCJENA INTENZITETA BOLESTI

U svrhu kliničke procjene intenziteta bolesti koristili smo se već prihvaćenim sustavom CCECAI koji obuhvaća aktivnost životinje, apetit, povraćanje, konzistenciju stolice, učestalost stolice, gubitak tjelesne mase, pojavu pada koncentracije albumina u serumu, pojavu ascitesa i edema, te pojavu pruritusa. U modificirani bodovni sustav uvrstili smo i kliničke odrednice:

svježa krvi u stolici, melena i pojava sluzi u stolici, a svi su anamnestički podaci preuzeti iz ambulantnog protokola (tablica 12.).

Tablica 12. Modificirani sustav vrednovanja kliničkih simptoma i procjena intenziteta kliničkih simptoma

Parametar	Sustav intenziteta kliničkih simptoma
Tjelesna aktivnost pacijenta	0-normalna 1-blago smanjena 2-umjereno smanjena 3-izrazito smanjena
Apetit	0-normalan 1-blago smanjen 2-umjereno smanjen 3-izrazito smanjen
Povraćanje	0-bez povraćanja 1-rijetko (1x tjedno) 2-umjereno (2-3 x tjedno) 3-učestalo (> 3 x tjedno)
Konzistencija stolice	0-normalna 1-meka stolica 2-vrlo mekana stolica 3-vodenasta dijareja
Učestalost defekacije	0-normalna 1-blago učestala (2-3/d, ili krv/sluz u stolici) 2-umjereno učestala (4-5/d) 3-izrazito učestala (>5/d)
Gubitak tjelesne težine	0-nema gubitka tj. težine 1-blagi (do 5% tj. težine) 2-umjereni (5-10% tj. tež.) 3-izraziti (>10 % tj. težine)
Koncentracija albumina u serumu	0-albumin >20 g/L 1-albumin 15-19,9 g/L 2-albumin 12-14,9 g/L 3-albumin <12 g/L
Ascites i periferni edemi	0-nema 1-blagi ascites ili periferni edemi 2-umjereni ascites ili periferni edemi 3-izraziti ascites ili periferni edemi
Pruritus	0-nema pruritusa 1-povremeni pruritus

	2-izraziti pruritus, ali prestaje za vrijeme sna 3-izraziti pruritus i za vrijeme sna
Svježa krv u stolici	0-nije prisutno 1-prisutno
Melena	0-nije prisutno 1-prisutno
Sluz u stolici	0-nije prisutno 1-prisutno
UKUPAN MAKSIMALNI ZBROJ BODOVA	30

Parametri procjene intenziteta kliničkih simptoma određivani su jednokratno na temelju anamnestičkih podataka od strane vlasnika životinje ili, u slučaju hospitaliziranih pacijenata, na temelju zapažanja ordinariusa zabilježenih u ambulantnom protokolu. Nakon procijenjivanja svake odrednice ovog sustava numeričke vrijednosti svih simptoma zbrojene su te iskazane brojem od 0 do 30. Bodovni sustav sačinjen od navedenih elemenata rezultirao je ukupnim maksimalnim zbrojem bodova 30.

Također, psi u kojih je utvrđena promjena učestalosti defekacije i/ili promjena konzistencije stolice okarakterizirani su kao skupina pasa s proljevom.

Za sve pse u kojih je utvrđen jedan ili više simptoma određeno je i trajanje simptoma te kategorizacija u akutne simptome (trajanje do 14 dana) i kronične simptome (trajanje duže od 15 dana).

#### **4.2. METODE PRETRAŽIVANJA UZORAKA STOLICE PASA**

Uzorci stolice pasa prikupljeni su neposredno nakon defekacije u sterilne posudice zapremine 50 ml te su unutar 8 sati dostavljeni u Parazitološki laboratorij Veterinarskog instituta na parazitološku obradu i u Mikrobiološki laboratorij na dokazivanje bakterija *C. perfringens*. Uzorci su uzimani u sklopu redovite kliničke obrade pacijenata s probavnim simptomima zaprimljenih na Kliniku za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, kao i u sklopu sistematskih pregleda pasa koji nisu imali simptome od strane probavnog trakta. Svi uzorci

pretraženi su na postojanje parazita metodom flotacije te neposrednom imunofluorescencijom, a tipizacija svih giardija provedena je izdvajanjem ukupne DNA, umnažanjem specifičnog odsječka DNA i određivanjem nukleotidnog sljeda pročišćenog proizvoda za svaki pojedini izolat.

Ukupan broj parazita/patogena zbroj je svih istraživanih vrsti parazita/patogena u pojedinoj jedinki psa.

#### **4.2.1. Flotacija**

1. 3-5 grama svježeg fecesa izmješano je homogeno s flotacionom tekućinom (zasićena otopina kuhinjske soli) na vrtložniku u epruveti zapremine 50 ml s čepom tako da ukupni volumen nije prelazio 10 ml
2. Dobivena suspenzija prelivena je preko sita i lijevka u epruvetu zapremine 15 ml.
3. Dodano je flotacione tekućine toliko da se stvori konveksna površina
4. Na tako dobivenu konveksnu površinu oprezno je stavljeno pokrovno stakalce dimenzija 18 x 18 ili 20 x 20 mm
5. Epruveta s pokrovnicom oprezno je stavljena u centrifugu te je centrifugirana na 1500 okretaja u minuti 5 minuta
6. Po završenom centrifugiranju pokrovnica je oprezno skinuta s epruvete i prebačena na predmetnicu na način da je strana koja je bila priljubljena uz tekućinu iz epruvete nalegla na predmetnicu
7. Dobiveni preparat je u cijelosti pregledan pod mikroskopom s povećanjima od 40 do 1000 puta. Nađeni razvojni stadiji parazita (jajašca, ličinke, ciste, oociste) identificirani su na osnovi morfoloških karakteristika pojedinih rodova ili vrsta.

#### **4.2.2. Imunofluorescencija**

Stolice svih pasa pretražene su flotacijom s 1M otopinom sukroze, a zatim su ispirani sa fosfatnim puferom, pH 7,2 (PBS). Tako pripremljeni uzorci pretraženi su neposrednom

imunofluorescencijom koristeći se kitom MERIFLUOR<sup>®</sup> *Cryptosporidium/Giardia* (C/G) testa (Meridian bioscience, SAD). Uzorci u kojima su dokazane ciste pohranjeni su u kalijev bikromat kako bi se sačuvala njihova vitalnost. MERIFLUOR<sup>®</sup> *Cryptosporidium/Giardia* C/G test se temelji na neposrednom vezanju specifičnih protutijela na površinske proteine cista giardija i oocista kriptosporidija. Reagens za dokazivanje sadrži monoklonska protutijela obilježena fluorescein isotiocijanatom (FITC). Obilježena protutijela vežu se na površinske proteine oocista kriptosporidija i cista giardija te se ovaj fenomen detektira metodom fluorescencije pri čemu se podloga boji narančasto crvenom bojom, a ciste fluorescirajuće zelenom bojom što olakšava vizualizaciju cisti. Pri svakom pretraživanju uzoraka korištena je pozitivna i negativna kontrola.

#### **4.2.2.1. Protokol za pripremu uzorka izmeta za dokazivanje protozoa *G. duodenalis* i *Cryptosporidium* spp.**

Pet (5) grama uzorka stolice pomiješano s vodom i vrtložen u zatvorenim plastičnim epruvetama zapremine 50 ml do nastanka homogene suspenzije. Dobivena suspenzija filtrirana je kroz cjedilo u novu epruvetu zapremine 50 ml kako bi se uklonile veće čestice nečistoće te je sadržaj epruvete nadopunjen destiliranom vodom do ukupne zapremine 50 ml, a zatim su epruvete su centrifugirane (Centrifuge 5804, Eppendorf) na 800 x g pet minuta (2200 okretaja u minuti). Po završenom centrifugiranju uklonjeno je 45 ml supernatanta vakuom sisaljkom te je konačni volumen iznosio pet ml. Sediment je ponovno vrtložen kako bi se dobila homogena suspenzija koja je naslojena na sedam ml 1M otopine sukroze u plastičnoj epruvti zapremine 15 ml koja je potom centrifugirana 800 x g 10 minuta.

Dobiveni flotat pretočen je u plastične epruvete zapremine 50 ml i nadopunjen destiliranom vodom do 50 ml ukupne zapremine, a potom su ciste u uzorku sedimentirane i pročišćene od sukroze centrifugiranjem na 800 x g tijekom 10 minuta. Vakuom sisaljkom je uklonjen supernatant te je ponovo dodana destilirana voda do 50 ml ukupne zapremine te su epruvete centrifugirane na 800 x g tijekom 10 minuta. Supernatant je uklonjen vakuom sisaljkom na način da je konačna zapremina sedimenta iznosila od 0,5 do 1 ml, ovisno o gustoći te je ovako pripremljen uzorak pogodan je za dalje pretraživanje.



#### **4.2.2. Izvođenje neposredne imunofluorescencije kitom MERIFLUOR<sup>®</sup> *Cryptosporidium*/*Giardia* testom**

Na svako polje predmetnice za imunofluorescenciju nanešeno je 15 do 20 µl ranije pripremljenog uzorka te je uzorak ostavljen da se osuši. Na svako polje naneseno je 15 µl ranije pripremljene "radne otopine" koja se sastoji od 200 µl fosfatnog pufera, 40 µl detekcijskog reagensa, 50 µl kontrastnog sredstva i 3 µl DAPI (boja 4',6-diamidino-2-phenylindol). Uzorci su inkubirani u vlažnoj komori na 37°C 60 minuta. Nakon inkubacije, uzorci oprezno isprani sa fosfatnim puferom (PBS, pH 7,2) te su zatim osušeni. Pretraženi su fluorescentnim mikroskopom pod povećanjem od 200 i 400 puta.

#### **4.2.3. Molekularna karakterizacija**

Genska tipizacija svih giardija provedena je izdvajanjem ukupne DNA, umnažanjem specifičnog odsječka DNA i određivanjem nukleotidnog sljeda pročišćenog proizvoda za svaki pojedini izolat.

Parazitska DNA je izdvojena komercijalnim kitom QIAamp DNA Stool Mini Kit-a (Quiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Kit omogućava najkvalitetnije izdvajanje DNA iz izmeta, a ujedno i iz patogenih organizama koji mogu biti prisutni u izmetu. Različiti sastojci izmeta mogu degradirati DNA i inhibirati lančanu reakciju polimeraze. Specifičnost ovog kita je sastavni dio InhibitEX tableta koja veoma učinkovito veže inhibitore polimerizacije u ranoj fazi izdvajanja DNA te je ovako izdvojena DNA iz izmeta pogodna za daljnje postupke analize.

U plastične epruvete od 2 ml dodano je 100 µl uzorka u kojem su bile prisutne ciste giardija i 2 ml puferske otopine ASL. Epruvete su vrtložene tijekom 15 do 30 sekundi dok nije dobivena homogenizirana suspenzija u puferskoj otopini ASL te su suspendirane ciste inkubirane na 90°C u puferskoj otopini ASL u trajanju pet minuta. Potom je suspenzija vrtložena 15 sekundi i centrifugirana tijekom jedne minute na 14000 okretaja u min kako bi se oborile sve čestice.

Cjelokupni sadržaj prebačen je u novu plastičnu epruvetu u koju je dodana jedna InhibitEX tableta i vrtložen jednu minutu do potpune suspendiranosti tablete. Uzorak je zatim

ostavljen je na sobnoj temperaturi kako bi se inhibitori polimerizacije u potpunosti vezali i potom je centrifugiran tri minute na 14000 okr/min kako bi se oborile sve čestice izmeta i čestice InhibitEX tablete sa vezanim inhibitorima. Supernatant je prebačen u novu ependorf epruvetu i ponovno centrifugiran na 14000 okr/min tijekom tri minute. U novu ependorf epruvetu ispipetirano je 15 µl proteinaze K i 200 µl supernatanta te puferska otopina AL i ta je smjesa vrtložena 15 sekundi te je inkubirana 10 minuta pri temperaturi 70°C, a zatim je u smjesu dodano 200 µl apsolutnog etanola i nakon čega je provedeno vrtloženje u trajanju od 15 sekundi. Po 415 µl priređene suspenzije dodano je u QIAamp kolone za centrifugiranje koje su stavljene u plastične epruvete volumena 2 ml. Kolone su centrifugirane u mikrocentrifugi pri 8000 okr/min tijekom jedne minute. Ovim postupkom se na membranu kolone vezala ukupna DNA iz uzorka. Kolone s vezanom DNA stavljene su u novu plastičnu epruvetu u koju je dodano 500 µl aktivirane puferske otopine AW1. Kolone su zatim centrifugirane na 8000 okr/min tijekom jedne minute te su prebačene u nove plastične epruvete u koje je dodano 500 µl aktivirane puferske otopine AW2. Kolone su centrifugiranje pri 14000 okr/min tijekom tri minute te su prebačene u nove plastične epruvete i centrifugirane pri 14000 okr/min tijekom jedne minute kako bi se u cijelosti odstranila AW2 puferska otopina. Kolone su nakon toga stavljene u nove ependorf epruvete i neposredno na membrane dodano je 100 µl puferske otopine AE kojom se isprala izdvojena DNA. Kolone su inkubirane na sobnoj temperaturi tijekom jedne minutei potom su centrifugirane pri 8000 okr/min tijekom jedne minute čime je u ependorf epruveti dobivena izdvojena DNA koja je korištena u postupku lančane reakcije polimerazom za dokazivanje ciljanih DNA odsječaka giardija.

Lančana reakcija polimerazom korištena je kako bi se umnožio ciljani odsječak male podjedinice ribosomske DNK gena od 175 parova baza (engl. base pairs, bp). Ovaj gen je odabran jer se nalazi u većem broju kopija te je stoga pogodan za dokazivanje vrsta iz roda *Giardia* kao i genskih skupina vrste *G. duodenalis*. Ciljani odsječak DNA je umnožen upotrebom dva para početnica prema READU i sur. (2002) ugnježđenim PCR protokolom (engl. nested PCR). Za umnažanje većeg odsječka od 291 bp u prvoj PCR reakciji upotrijebljena je prednja početnica RH11 5'CATCCGGTCGATCCTGCC3' i stražnja početnica RH4 5'AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG3'.

Kao predložak za drugu PCR reakciju upotrebljen je PCR proizvod iz prve reakcije korištenjem prednje početnice GiarF 5'GACGCTCTCCCAAGGAC3' i stražnje početnice GiarR 5'CTGCGTCACGCTGCTCG3'. U prvoj reakciji je korišteno 2μl izdvojene DNA. U drugoj reakciji je korišteno 5μl PCR proizvoda iz prve reakcije. Očekivana veličina umnoženog proizvoda *SSU rRNA* gena protozoona *G. duodenalis* je 175 bp.

Lančana reakcija polimerazom izvođena je u zasebnoj prostoriji, prilikom čega je rabljen pribor slobodan od DNA/RNA, zaštitna odjeća te rukavice. Također je korištena voda slobodna od enzima rnaza i dnaza, poseban set mikropipeta od 10 μl, 100 μl i 1000 μl sa odgovarajućim nastavcima s filterom i epruvetice za PCR od 0,2 ml slobodne od dnaze. Mješavina svih reagensa (engl. Master mix) potrebnih za umnožavanje dobivenog proizvoda PCR metodom pripremljena je u sterilnim ependorf epruvetama, a korištene su sljedeće količine reagensa istog proizvođača (Promega, Madison, WI, USA):

Reagens	Količina za I reakciju	Količina za II reakciju
Voda slobodna od enzima rnaza i dnaza	29,5μl	26,5 μl
Green Flexi reakcijski pufer (5X)	10 μl	10 μl
25mM MgCl <sub>2</sub>	3 μl	3 μl
dNTP Mix (10 pmol)	1 μl	1 μl
Prednje specifične početnice (10 pmol)	1 μl	1 μl
Stražnje specifične početnice (10 pmol)	1 μl	1 μl
GOtaq Flexi DNA Polymerase (5U/μl)	0,25 μl	0,25 μl
DNA predložak	2 μl	5μl

Sadržaj je pipetiranjem dobro promiješan i razdijeljen u svaku PCR epruveticu u količini od 48µl za prvu reakciju, a zatim je u svaku PCR epruveticu uneseno 2 µl uzorka izdvojenog DNA ispitujućih uzoraka, odnosno jednaka količina vode za negativnu kontrolu. U posljednu PCR epruveticu unesena je referentno pozitivna DNA kontrola. Prije izvođenja PCR-a početnice su razrijeđene s vodom slobodnom od enzima rnaza i dnaza tako da je radna koncentracija početnica bila 10 pmol/µl. PCR epruvetice su stavljene u toplokružnik ProFlex™ (Life Technologies, Carlsbad, USA) pri 95°C i pokrenut je program 1 za umnažanje vanjskog odsječka *Ssu RRNA* gena veličine 272 pb. Obje reakcije se sastojala od inicijalne 2 minute denaturacije, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa slijedećim redom:

1. denaturacija pri temperaturi od 95°C kroz 30 s;
2. prihvaćanje početnica pri temperaturi od 53°C kroz 30 s
3. produženje pri temperaturi od 72°C kroz 30 s

Nakon posljednjeg ciklusa, produženje je provedeno na 72°C tijekom sedam minuta. Reakcija je automatski zaustavljena pri temperaturi od 4°C.

Za drugu, ugnježdenu reakciju korišteno je 45 µl mješavine i 5µl PCR proizvoda iz prve reakcije, koji je služio kao predložak za drugu PCR reakciju. Mješavina je pripremljena na isti način kao i u prvoj reakciji samo su korištene početnice Giar F i Giar R. Za sigurnost i kontrolu moguće kontaminacije korištene su dvije negativne kontrole i jedna pozitivna kontrola. Prva negativna kontrola je predstavljala 5 µl predloška negativne kontrole iz prve reakcije, dok je druga predstavljala 5 µl vode. Za pozitivnu kontrolu korišteno je 5µl pozitivne kontrole iz prve reakcije. PCR metodom iz izdvojene DNA umnožen je odsječak *Ssu rRNA* gena koji je korišten za određivanje nukleotidnog sljeda. Uspješnost umnožavanja provjerena je elektroforezom u gelu.

PCR proizvodi vizualizirani su kapilarnom elektroforezom (QIAxcel®, Qiagen Hilden, Germany) uz korištenje QIAxcel DNA Screening Kit (2400), markera za poravnavanje i (QX DNA Alignment Marker 15bp/1kb) i markera za određivanje veličine umnoženih odsječaka (QX DNA Size Marker 50bp-800bp). Umnoženi odsječci su pročišćeni korištenjem ExoSAPIT® PCR CleanUp Reagent (USB, Cleveland, USA) prema uputama proizvođača. Određivanje nukleotidnog sljeda obavljeno je pomoću «ABI PRISM BigDye» terminator sustavom

«GeneAmp PCR 2400» («PE Biosystems, SAD) i setom početnica: prednje početnice GiarF 5'GACGCTCTCCCAAGGAC3' i stražnje početnice GiarR 5'CTGCGTCACGCTGCTCG3' u koncentraciji od 10 µl/ml. Uzorci su sekvencionirani u komercijalnoj kompaniji Macrogen Inc. (Amsterdam, Netherlands).

Rezultate određivanja nukleotidnih sljedova obrađeni su pomoću računalnog programa SeqMan II (DNASTAR, Madison WI, USA) s pripadajućim potprogramima SeqMan i EditSeq. Ovim programom su uspoređeni nukleotidni sljedovi oba smjera. Ovako obrađene i spremljene u FASTA format kasnije su uspoređene s dostupnim sekvencama u bazi gena GENBANK (NCBI) putem tražilice BLAST ( Basic Local Alignment Search Tool). Na ovaj način je dokazana pripadnost istarživanih sekvenci referentnim sekvencama pojedinih genskih skupina.

#### **4.2.4. *Clostridium perfringens***

Izdvajanje bakterije *Clostridium perfringens* učinjeno je u cilju identifikacije iste kao mogućeg patogena koji je poznat kao mikroorganizam prisutan u probavnom traktu zdravih i bolesnih pasa, ali u uvjetima bolesti može dovesti do pojačanog intenziteta kliničkih simptoma u pasa, neovisno o mogućnostima tvorbe toksina.

Za izdvajanje bakterije *Clostridium perfringens* iz uzoraka stolice pasa koristio se svježe pripremljeni krvni agar (Blood Agar Base No. 2s 5% defibrinizirane ovčje krvi) uz dodatak eskulina (Merck, kat. br. 1.10328.0500). Navedena hranjiva podloga koristi se za izdvajanje i uzgoj raznih zahtjevnih mikroorganizama, posebno patogenih vrsta, kao i za utvrđivanje vrste hemolize.

Nacijepljenje ploče inkubirane su na 37°C u anaerobnim uvjetima. Za stvaranje anaerobnih uvjeta korištenje McIntosh-ev Ionac, GasPack vrećice (OX-AnaeroGen) te indikatori za kontrolu anaerobnih uvjeta. Nakon inkubacije od 24 sata izvršena je identifikacija navedene bakterijske vrste na osnovu morfoloških osobina. Sive, okrugle, glatke kolonije promjera oko 2-5 mm s dvostrukom zonom hemolize precijepljene su u svrhu dobivanja čiste kulture. Iz naraslih kolonija napravljeni su razmasci koji su obojeni po Gramu, te napravljeni test katalaze i oksidaze. *C. perfringens* je gram pozitivan kratki štapić, katalaza negativan i oksidaza pozitivan. Daljnja identifikacija izvršena je na osnovu biokemijskog niza (BBL Crystal™ Identification

systems, Anaerobe ID kit) koji služi za identifikaciju anaerobnih bakterija koristeći konvencionalne fluorogene i kromogene supstance.

Odabrane kolonije su suspendirane u tekućini za pripremu inokuluma 10-15 sekundi da optička gustoća suspenzije bude 0,4 McFarlanda. Inokulacijska tekućina ulije se na ciljno mjesto na bazi ploče.

### **Eskulin - krvni agar (EKA)**

Eskulin-krvni agar priprema se tako da se prvo otopi bazna hranjiva podloga (Blood Agar Base No. 2, Merck kat. br. 1.10328.0500) prema uputstvima proizvođača. Ukratko, količina od 40 g hranjive podloge otopljen je u litri demineralizirane vode i autoklavirana na 121°C kroz 15 minuta. Nakon što je smjesa ohlađena na 45-50°C, dodano je 5% sterilne defibrinirane krvi i prethodno pripremljeni 1% - tni eskulin u količini 13,75 mL na 500 mL podloge. Eskulin je dva sata prije dodavanja zagrijan na sobnoj temperaturi, kao i defibrinirana krv. Smjesa medija i eskulina nježno je promješana da se izbjegne pojava mjehurića te razlivena u Petrijeve zdjelice.

Sastav hranjive podloge Blood Agar Base No. 2 (Merck, kat. br. 1.10328.0500)

<b>Sastav</b> Merck 1.10328.0500	<b>g/L</b>
Nutrient substrate (ekstrakt kvasca, peptoni, jetreni hidrolizat)	23,0
NaCl	5,0
Agar-agar	12,0
DV	1000 mL

### 4.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka obavljena je programom Stata 13.1 (Stat Corp. USA). Rezultati su prikazani kao medijan, minimalna i maksimalna vrijednost ili kao aritmetička sredina s pripadajućom standardnom devijacijom, ovisno o razdiobi podataka. Vrijednosti su međusobno uspoređene t-testom ili testom za neparametrijske vrijednosti (Man Whitney U-test). Za usporedbu vrijednosti više od dviju skupina korišten je Kruskall-Wallis test.

Za usporedbu varijabli iskazanih u binarnom obliku (pozitivni/negativni) korišten je hi-kvadrat ili Fisher exact test. Vrijednosti intenziteta kliničkih simptoma korelirani su s prisutnošću pojedinih parazita Kendall tau testom. Statistički značajnim se smatra  $p < 0,05$ .

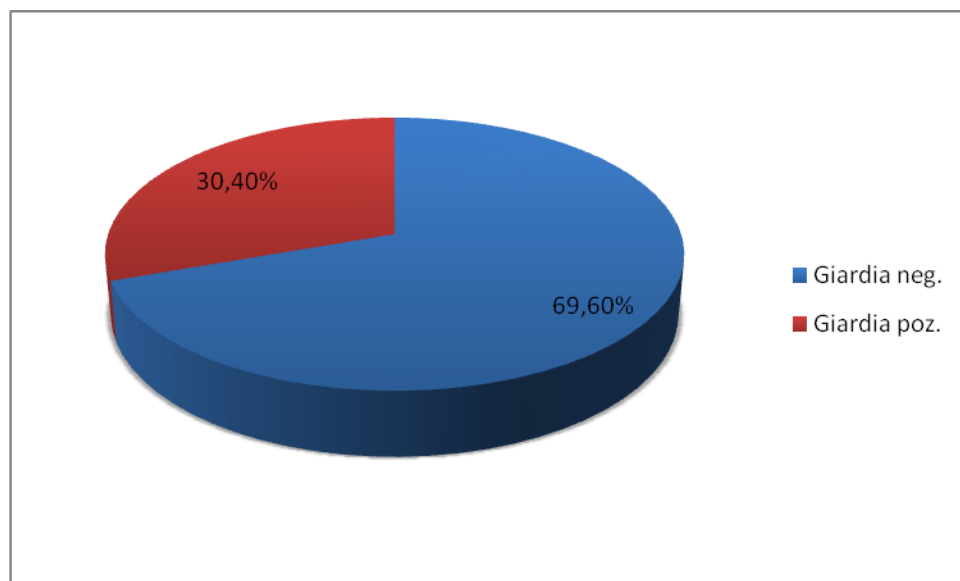
## 5. REZULTATI

### 5.1. OSNOVNI PRIKAZ CJELOVITE SKUPINE ISTRAŽIVANIH PASA

Poštujući kriterije navedene u materijalima i metodama, u istraživanje su bila uključena ukupno 82 psa. Svi su istraživani psi zaprimljeni na Kliniku za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u razdoblju od 01.01.2012. do 31.12.2012. godine zbog probavnih simptoma (skupina simptomatskih pasa, n=42) kao i psi koji su obrađivani u svrhu sistematskih pregleda, a nisu imali probavne simptome (skupina asimptomatskih pasa, n=40). Obje ove skupine podjeljene su na pse pozitivne na *G. duodenalis* (n=25) i pse negativne na *G. duodenalis* (n=57). Unutar skupine pozitivnih na *G. duodenalis* formirane su skupine pasa ovisno o pojedinom genskom tipu *G. duodenalis*. U istraživanje su bili uključeni psi neovisno o spolu i pasmini te samo psi stariji od godinu dana. Od ukupno 82 psa uključena u ovo istraživanje *G. duodenalis* izolirana je u 25 pasa te je genskom tipizacijom utvrđena genska skupina *G. duodenalis* C u 10 pasa (40% invadiranih pasa), a genska skupina D u 15 pasa (60% invadiranih pasa).



## 5.2. UČESTALOST *G. duodenalis* U ISTRAŽIVANIM SKUPINAMA PASA



Slika 7. Učestalost *G. duodenalis* u svih istraživanih pasa (n=82)

U svih istraživanih pasa (n=82) utvrđena je učestalost *G. duodenalis* 30,4% (n=25) (Slika 7).

U istraživanih pasa dokazane su giardije vrsno specifičnih genskih skupina C i D, dok zoonotske skupine A i B nisu dokazane ovim istraživanjem. U 10 pasa u kojih su utvrđene giardije genskom tipizacijom utvrđene su giardije genske skupine C, a u 15 pasa giardije genske skupine D.

### 5.2.1. Učestalost *G. duodenalis* u simptomatskih i asimptomatskih pasa

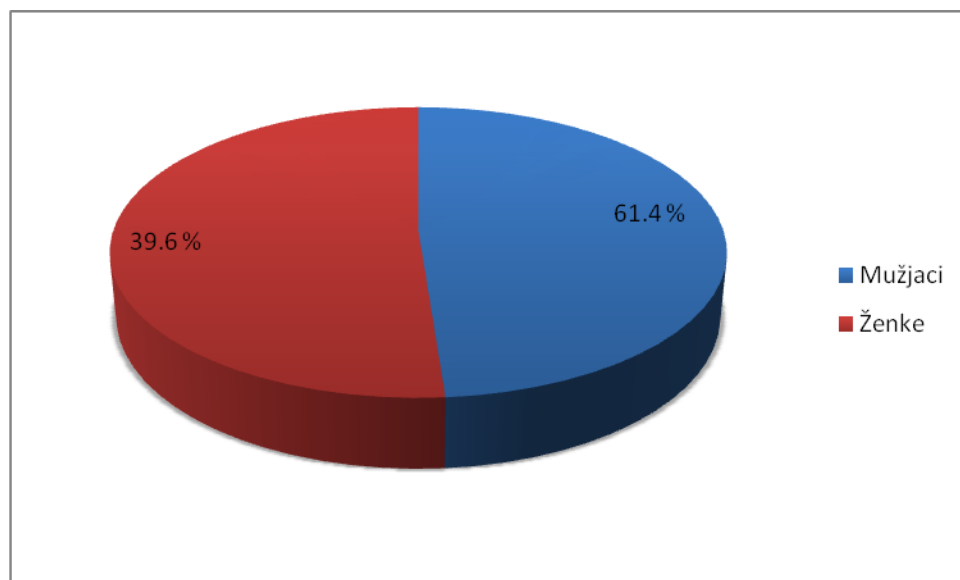
U skupini pasa s kliničkim simptomima (n=42) utvrđena je učestalost *G. duodenalis* 31% (n=13), dok je u skupini pasa bez kliničkih simptoma (n=40) utvrđena učestalost *G. duodenalis* 30% (n=12) (tablica 13).

Tablica 13. Učestalost *G. duodenalis* u simptomatskih i asimptomatskih pasa

Skupina pasa		<i>G. duodenalis</i>		Ukupno	HI-KVADRAT TEST
		Negativni	Pozitivni		
Asimptomatski	N	28	12	40	P= 0.925
	%	49.12	48.00	48.78	
Simptomatski	N	29	13	42	
	%	50.88	52.00	51.22	

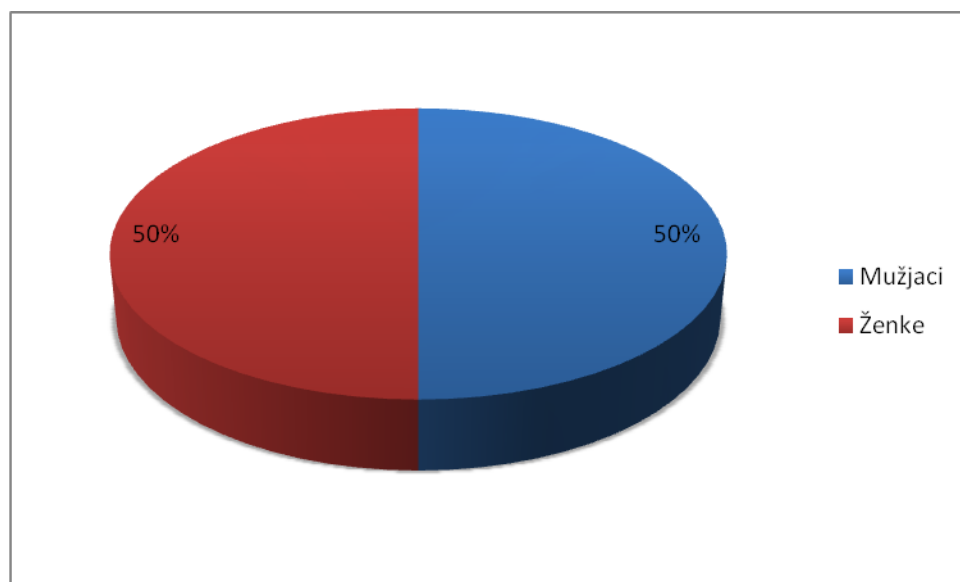
Nema statistički značajne razlike u učestalosti *G. duodenalis* između pasa sa simptomima i pasa bez kliničkih simptoma.

### 5.3. ZASTUPLJENOST SPOLOVA



Slika 8. Zastupljenost spolova u pasa zaprimljenih u Kliniku za unutarnje bolesti u razdoblju od 01.01.2012. do 31.12.2012.

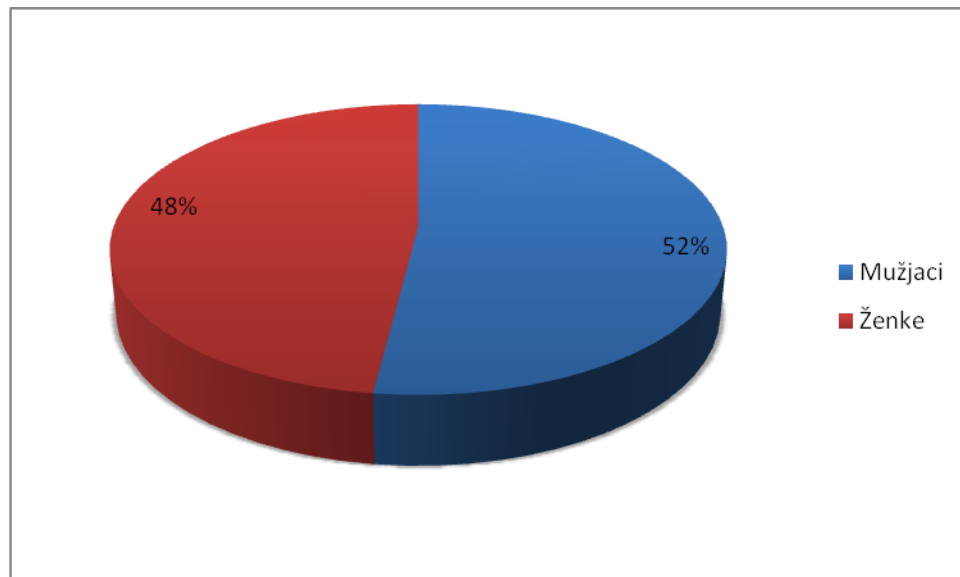
### 5.3.1. Zastupljenost spolova u svih istraživanih pasa



Slika 9. Zastupljenost spolova u svih istraživanih pasa (n=82)

U cjelovitoj skupini istraživanih pasa (n=82) utvrđena je zastupljenost ženki 50% (n=41), te zastupljenost muškaka 50% (n=41).

### 5.3.2. Zastupljenost spolova u pasa s giardijama (n=25)



Slika 10. Zastupljenost spolova u pasa u kojih je utvrđena *G. duodenalis* (n=25)

U skupini pasa u kojih su izolirane *G. duodenalis* utvrđena je zastupljenost ženki 48% (n=12) te zastupljenost mužjaka 52% (n=13).

### 5.3.3. Zastupljenost spolova u pasa s giardijama s obzirom na gensku skupinu *G. duodenalis*

Tablica 14. Zastupljenost spolova u pasa u kojih su izolirane giardije s obzirom na gensku skupinu.

		SPOL		HI-KVADRAT TEST
		ŽENKE	MUŽJACI	
GENSKA SKUPINA <i>G.</i> <i>duodenalis</i>	C	3/10 (30%)	7/10) 70%	P=0.141
	D	9/15 (60%)	6/15) 40%	

Nisu uočene statistički značajne razlike u zastupljenosti spolova u pasa s obzirom na gensku skupinu *G. duodenalis*.

### 5.4. DOB ISTRAŽIVANIH PASA

Tablica 15. Povezanost dobi pasa (izražene u godinama) i invazije *G. duodenalis*

Giardija	n	Median	Raspon	T-TEST
Negativni	57	5	1-13	P=0.0007
Pozitivni	25	2	1-9	
Svi	82	4	1-13	

Opažene razlike u dobi između pasa invadiranih i neinvadiranih parazitom *G. duodenalis* statistički su značajne. Skupina pasa pozitivnih na *G. duodenalis* imala je median (centralnu vrijednost) 2, pri čemu se dob pasa kretala od 1-9 godina. Skupina pasa u koje nije utvrđena *G. duodenalis* imala je median dobi iskazane u godinama 5, pri čemu se dob pasa kretala od 1-13 godina (tablica 15).

## 5.5. UČESTALOST POJAVE RAZLIČITIH PARAZITA/PATOGENA U ISTRAŽIVANOJ POPULACIJI PASA (n=82)

Tablica 16. Učestalost pojave različitih parazita/patogena u istraživanoj populaciji pasa (n=82)

Parazit/patogen	Učestalost
<i>Giardia duodenalis</i>	30,49% (25/82)
<i>Trichuris vulpis</i>	9,76% (8/82)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	12,19% (10/82)
<i>Isospora canis</i>	4,88% (4/82)
<i>Ancylostoma</i> spp./ <i>Uncinaria</i> spp.	2,44% (2/82)
<i>Toxocara canis</i>	7,32% (6/82)
<i>Toxascaris leonina</i>	1,21% (1/82)
<i>Clostridium perfringens</i>	70,73% (58/82)

*G. duodenalis* bila je najčešći utvrđeni parazit u istraživanih pasa, dok je najčešći izolirani patogen bio *C. perfringens* (tablica 16).

Tablica 17. Pojedinačni uzročnici i istovremena invazija parazitima/patogenima izdvojeni u skupini pasa u kojih je zabilježen proljev definiran kao promjene konzistencije stolice i/ili učestalosti defekacije (n=39)

Parazit/patogen	Broj pasa
<i>Giardia duodenalis</i>	2/39 (5,1%)
<i>Trichuris vulpis</i>	1/39 (2,6%)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0/39 (0%)
<i>Isospora canis</i>	0/39 (0%)
<i>Strongilidi</i>	0/39(0%)
<i>Toxocara canis</i>	1/39 (2,6%)
<i>Toxascaris leonina</i>	0/39 (0%)
<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	12/39(30,7%)
Istovremena invazija 2 ili više parazita/patogena	14/39 (35,9%)
Bez izdvojenog uzročnika	9/39 (23,1)

Tablica 18. Učestalost jednog ili više parazita u svih istraživanih pasa (ne uključuje klostridije)

N=82	Psi u kojih je izdvojen jedan ili više parazita	Psi u kojih nisu izdvojeni paraziti
	36/82 (43,9%)	46/82 (56,1%)



## 5.6. UČESTALOST POJAVE KLINIČKIH SIMPTOMA U SKUPINAMA PASA U KOJIM SU IZOLIRANE *G. duodenalis* GENSKE SKUPINE C i D

Tablica 19. Učestalost pojave kliničkih simptoma u skupinama pasa u kojim su izolirane *G. duodenalis* genske skupine C (n=5) i genske skupine D (n=8)

Klinički simptom		Učestalost simptoma u simptomatskih pasa s giardijom genske skupine C (n=5)	Učestalost simptoma u simptomatskih pasa s giardijom genske skupine D (n=8)	HI-KVADRAT TEST
Pad tjelesne aktivnosti	%	40%	25%	P= 0,569
	N	2	2	
Gubitak apetita	%	20%	37,5%	P= 0,506
	N	1	3	
Povraćanje	%	20%	12,5%	P= 0,715
	N	1	1	
Promjena konzistencije stolice	%	100%	87,5%	P= 0,411
	N	5	7	
Povećana učestalost defekacije	%	80%	87,5%	P= 0,715
	N	4	7	
Gubitak tjelesne mase	%	20%	37,5%	P= 0,506
	N	1	3	
Smanjena koncentracija albumina u serumu	%	0%	12,5%	P= 0,411
	N	0	1	
Pruritus	%	0%	0%	
	N	0	0	

Ascites/edemi	%	0%	12,5%	P= 0,411
	N	0	1	
Melena	%	0%	0%	
	N	0	0	
Sluz u stolici	%	100%	37,5%	<b>P= 0,024</b>
	N	5	3	
Svježa krv u stolici	%	40%	0%	P= 0,052
	N	2	0	

Opažene razlike u učestalosti pojedinih kliničkih simptoma između skupine simptomatskih pasa u kojih su izolirane *G. duodenalis* genske skupine C i skupine simptomatskih pasa u kojih su izolirane *G. duodenalis* genske skupine D nisu statistički značajne, osim učestalosti pojave sluzi u stolici (tablica 19).

## 5.7. POVEZANOST POJAVLJIVANJA *G. duodenalis* S POJAVLJIVANJEM OSTALIH PARAZITA/PATOGENA

Tablica 20. Povezanost pojavljivanja *G. duodenalis* s pojavljivanjem ostalih parazita/patogena

Parazit /invadiranost	Giardia		FISHER EXACT TEST
	pozitivni	negativni	
<i>Trichuris vulpis</i>	2/25 (8%)	6/57 (10,5%)	P=0.537
<i>Cryptosporidium</i> <i>spp</i>	10/25 (40%)	0/57 (0%)	<b>P&lt;0.0001</b>
<i>Isospora canis</i>	2/25 (8%)	2/57 (3,5%)	P=0.356
<i>Ancylostoma</i> <i>spp/Uncinaria</i> <i>spp</i>	0/25 (0%)	2/57 (3,5%)	P=0.481
<i>Toxocara canis</i>	3/25 (12%)	3/57 (5,3%)	P=0.259
<i>Toxascaris</i> <i>leonina</i>	0/25 (0%)	1/57 (1,7%)	P=0.695
<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	18/25 (72%)	40/57 (70,1%)	P=0.867

Invazija parazitom *G. duodenalis* nije statistički povezana s invazijama prouzročenicim drugim parazitima osim kada je u pitanju rod *Cryptosporidium* (tablica 20).

Tablica 21. Broj utvrđenih parazita/patogena u pojedinom psu u svih istraživanih pasa

Broj različitih utvrđenih patogena	Broj pasa
0	14/82 (17,1%)
1	39/82 (47,6%)
2	13/82 (15,8%)
3	15/82 (18,3%)
4	1/82 (1,2%)

Broj različitih parazita/patogena u pojedinom psu (uključujući i klostridije) kretao se od 0 do 4, a najviše pasa bilo je invadirano jednim parazitom/patogenom (tablica 21)

Tablica 22. Korelacije između intenziteta kliničkih simptoma i broja utvrđenih parazita /patogena u pojedinoj jednici (Kendall tau<sub>b</sub>)

Parazit/patogen	n	koeficijent	Kendall tau <sub>b</sub>
<i>Giardia duodenalis</i>	82	-0.0101	P= 0.9231
<i>Trichuris vulpis</i>	82	-0.0281	P= 0.7837
<i>Cryptosporidium spp</i>	82	0.0434	P= 0.6673
<i>Isospora canis</i>	82	-0.0626	P= 0.5361
<i>Strongilidi</i>	82	-0.0667	P= 0.5118
<i>Toxocara canis</i>	82	-0.0715	P= 0.4772
<i>Toxascaris leonina</i>	82	-0.0938	P= 0.3566
<i>Clostridium perfringens</i>	82	-0.1762	P= 0.0770
broj svih parazita/patogena utvrđenih u pojedinih jednici	82	-0.1067	P= 0.2466

Intenzitet kliničkih simptoma nije statistički značajno povezan s pojavom pojedinih utvrđenih parazita, kao niti s brojem svih parazita/patogena utvrđenih u pojedinih jednici (tablica 22).

## 5.8. INTENZITET KLINIČKIH SIMPTOMA I ZBROJ SVIH PARAZITA/PATOGENA U PASA S I BEZ *G. duodenalis*

Tablica 23. Intenzitet kliničkih simptoma i zbroj svih parazita/patogena s i bez utvrđene *G. duodenalis*

	Giardia	Median	Raspon	HI-KVADRAT TEST
Intenzitet kliničkih simptoma	Da	1	0-13	P=0.9189
	Ne	1	0-19	
Zbroj svih parazita/patogena u pojedinog psa	Da	3	1-4	P=<0.0001
	Ne	1	0-3	

Intenzitet kliničkih simptoma statistički se značajno ne razlikuje između pasa s i bez utvrđenih giardija. Međutim, opažene razlike u medijanu zbroja svih parazita/patogena u pojedinog psa između pasa s giardijama i pasa bez giardija statistički se razlikuju (tablica 23). Odnosno, psi s giardijama istovremeno su invadirani većim brojem drugih parazita, nego psi bez giardija.

### 5.9. POVEZANOST INVAZIJE PARAZITOM *G. duodenalis* S KLINIČKIM SIMPTOMIMA PROMATRANO U SKUPINI SIMPTOMATSKIH PASA (n=42)

Tablica 24. Povezanost invazije parazitom *G. duodenalis* s intenzitetom kliničkih simptoma promatrano u skupini istraživanih pasa s kliničkim simptomima (n=42)

Pokazatelj	Stupanj	Giardije		Kruskall-Wallis test
		ne	da	
Tjelesna aktivnost	0	18	9	P=1
	1	8	3	
	2	2	1	
	3	1	0	
Apetit	0	17	9	P=0.536
	1	4	3	
	2	4	1	
	3	4	0	
Tijek	Akutni	23	5	<b>P=0.009</b>
	Kronični	6	8	
Povraćanje	0	19	11	P=0.361
	1	1	1	
	2	5	0	
	3	4	1	
Konzistencija stolice	0	2	1	P=0.956
	1	9	4	
	2	11	6	
	3	7	2	
Učestalost	0	8	2	P=0.658

defekacije	1	8	6	
	2	6	3	
	3	7	2	
Gubitak tjelesne težine	0	18	9	P=0.632
	1	10	3	
	3	1	1	
Albumini u serumu	0	27	12	P=0.539
	1	1	0	
	2	0	1	
Pruritus	Ne	28	13	P=0.690
	Da	1	0	
Ascites/edem	0	29	12	P=0.310
	3	0	1	
Sluz u stolici	Ne	16	5	P=0.317
	Da	13	8	
Krv u stolici	Ne	19	11	P=0.187
	Da	10	2	

Intenzitet promatranih simptoma jednak je u simptomatskih pasa s giardijama kao i u pasa bez giardija (tablica 24). Samo je tijekom bolesti statistički značajno različit između ovih dviju skupina životinja, odnosno u skupini pasa invadiranih giardijama veći je udio slučajeva s kroničnim tijekom bolesti.

### 5.10. INTENZITET KLINIČKIH SIMPTOMA I BROJ OSTALIH UTVRĐENIH PARAZITA/PATOGENA U ODNOSU NA GENSKU SKUPINU *G. duodenalis*

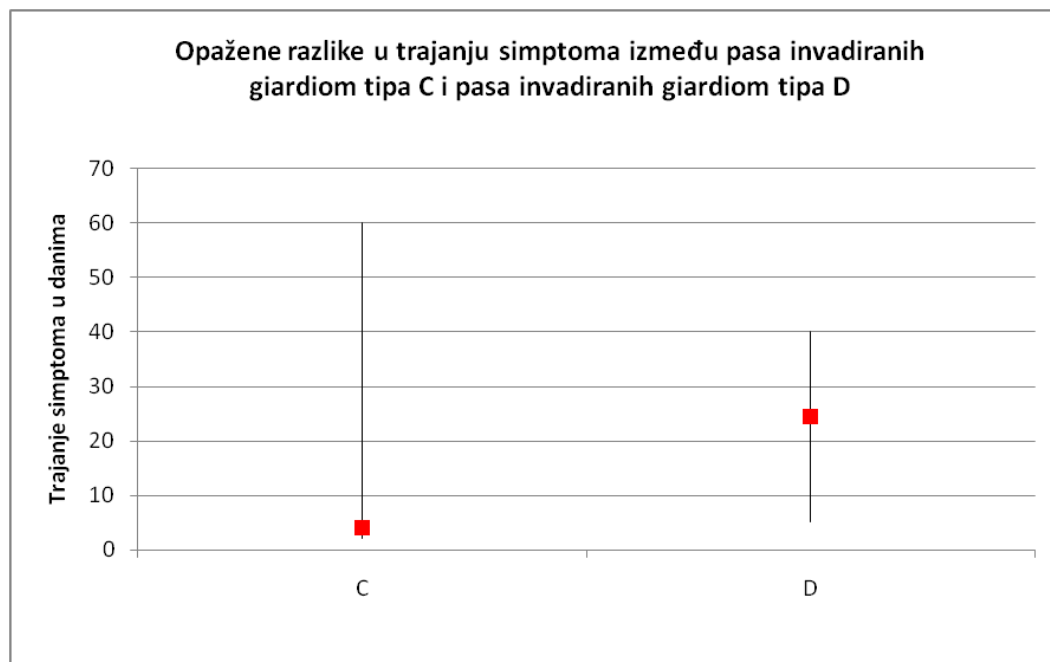
Tablica 25. Intenzitet kliničkih simptoma i broj ostalih utvrđenih parazita/patogena u pojedinog pasa invadiranih s giardijama genske skupine C i genske skupine D

	Genski tip <i>G. duodenalis</i>	Median	Raspon	HI-KVADRAT TEST
Intenzitet kliničkih simptoma	C (n=10)	1	0-13	P=0.9765
	D (n=15)	1	0-13	
Broj ostalih utvrđenih parazita/patogena u pojedinog pasa	C (n=10)	2.5	2-4	P=0.49
	D (n=15)	3	1-3	

Nije utvrđena statistički značajna razlika između intenziteta kliničkih simptoma u pasa s utvrđenim giardijama genske skupine C u odnosu na pse s utvrđenim giardijama genske skupine D, kao niti statistički značajna razlika u broju parazita/patogena koji sudjeluju u istovremenoj invaziji u jedinki pasa s giardijama genske skupine C u odnosu na pse s giardijama genske skupine D (tablica 25).



### 5.11. TRAJANJE KLINIČKIH SIMPTOMA (IZRAŽENO U DANIMA) S OBZIROM NA PRIPADNOST GENSKOJ SKUPINI *G. duodenalis*



Slika 11. Trajanje kliničkih simptoma (izraženo u danima) s obzirom na pripadnost genskoj skupini *G. duodenalis*

Iako je raspon trajanja simptoma u pasa invadiranih giardijom genskog tipa C veći nego u pasa invadiranih giardijama genske skupine D (slika 11) nije utvrđena statistički značajna razlika u trajanju simptoma (izraženih u danima) između pasa invadiranih različitim genskim skupinama giardija ( $p=0.2703$ , HI KVADRAT TEST).

## 5.12. POVEZANOST INVAZIJE PARAZITOM *G. duodenalis* S ISTRAŽIVANIM POKAZATELJIMA HEMATOLOŠKIH I BIOKEMIJSKIH PRETRAGA KRVI

Tablica 26. Vrijednosti istraživanih hematoloških i biokemijskih pokazatelja u pasa invadiranih i neinvadiranih s *G. duodenalis* (vrijednosti s normalnom razdiobom)

Fiziološki pokazatelj	Giardije				T- TEST
	Negativni		Pozitivni		
	SV	SD	SV	SD	
Eritrociti (x10 <sup>12</sup> /L)	6.94	0.97	6.90	0.79	P=0.8600
Hemoglobin (g/L)	164.56	22.57	160.16	18.32	P=0.3936
Hematokrit (%)	49.44	6.99	47.96	5.35	P=0.3487
Segmentirani neutrofili (%)	61.19	12.96	61.12	13.98	P=0.9818
Kreatinin (μmol/l)	101.24	22.23	98.68	18.77	P=0.6162
Bilirubin (μmol/l)	3.10	0.92	2.75	1.28	P=0.5386
Glukoza (mmol/L)	4.99	0.54	5.07	0.56	P=0.6592

Opažene razlike vrijednosti hematoloških i biokemijskih pokazatelja (srednja vrijednost-SV i standardna devijacija –SD) između pasa invadiranih i neinvadiranih s *G. duodenalis* nisu statistički značajne (tablica 26).

Tablica 27. Vrijednosti istraživanih hematoloških i biokemijskih pokazatelja u pasa invadiranih i neinvadiranih s *G. duodenalis* (vrijednosti s nenormalnom razdiobom).

POKAZATELJ	Giardije				MAN WHITNEY TEST
	Negativni		Pozitivni		
	medijan	raspon	medijan	raspon	
Trombociti (x10 <sup>9</sup> /L)	300	151-659	293	118-524	P=0.6359
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	9.8	4,9-909	10,1	4,8-22.4	0.1386
Monociti (%)	2	0-13	1	0-8	0.4394
Limfociti (%)	30	7-64	32	4-47	0.7241
Eozinofili (%)	5	0-14	4	0-37	0.9195
Nesegmentirani granulociti (%)	0	0-3	0	0-5	0.8409
UREA (mmol/L)	6,4	3,2-13,1	5	2,6-9,2	0.0413
ALBUMINI (g/L)	32	18-46	31	12-37	0.2111
UKUPNI PROT (g/L)	64	46-435	61	29-83	0.3299
ALT (U/L)	47	9-131	36	20-280	0.0237
AST (U/L)	32	19-96	35	12-70	0.5386
AP (U/L)	41	4-255	44	22-604	0.5422
Amilaza (U/L)	715	19-740	803	470-1303	0.2210
Lipaza (U/L)	248	0-670	360	134-700	0.0134
CPK (U/L)	103	0-604	140	62-312	0.0380
Kolesterol (mmol/L)	5,4	3,6-11,6	5,5	2,7-12,4	0.7394
Trigliceridi (mmol/L)	0,8	0,2-8,1	0,8	0,4-11,8	0.8553

Opažene su statistički značajne razlike u koncentraciji ureje i aktivnosti ALT, lipaze i CPK između pasa u kojih su izolirane *G. duodenalis* i pasa u kojih nisu izolirane *G. duodenalis* (tablica 27).

### 5.13. POVEZANOST INVAZIJE POJEDINOM GENSKOM SKUPINOM *G. duodenalis* S ISTRAŽIVANIM POKAZATELJIMA HEMATOLOŠKIH I BIOKEMIJSKIH PRETRAGA KRVI

Tablica 28. Vrijednosti istraživanih hematoloških pokazatelja u pasa invadiranih s giardijama genske skupine C i D (vrijednosti s normalnom razdiobom)

	Genska skupina	n	SV	SD	95% interval povjerenja		T-TEST
Eritrociti (x10 <sup>12</sup> /L)	C	10	7.2	.94	6.52	7.87	P=0.1371
	D	15	6.71	.64	6.35	7.07	
Hemoglobin (g/L)	C	10	167.7	20.24324	153.21	182.18	P=0.0934
	D	15	155.13	15.63	146.47	163.79	
Hematokrit (%)	C	10	49.8	6.52	45.12	54.47	P=0.1655
	D	15	46.73	44.39	49.06	46.73	
Segmentirani granulociti (%)	C	10	65.1	15.09	54.30	75.89	P=0.2538
	D	15	58.46	13.04	51.24	65.68	
Limfociti (%)	C	10	24.6	12.16	15.89	33.30	P=0.0614
	D	15	33.53	10.40	27.77	39.29	

Tablica 29. Vrijednosti istraživanih hematoloških pokazatelja u pasa invadiranih s giardijom genske skupine C i D (vrijednosti s nenormalnom razdiobom)

	Genska skupina C (n=10)		Genska skupina D (n=15)		MANN-WHITNEY TEST
	Median	Raspon	Median	Raspon	
Trombociti (x10 <sup>9</sup> /L)	281	118-406	342	178-524	P=0.1341
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	12,1	4,8-22,4	9,7	5,1-19,2	P=0.2118
Monociti (%)	1	0-8	2	0-6	P=0.5905
Eozinofili (%)	3	0-37	5	0-16	P=0.4860
Nesegmentirani granulociti (%)	0	0-5	0	0-2	P=0.7237

Opažene razlike u vrijednostima istraživanih hematoloških i biokemijskih pokazatelja krvi između pasa invadiranih genskim C i D skupinama nisu statistički značajne (tablica 28 i 29).

Tablica 30. Vrijednosti istraživanih biokemijskih pokazatelja u serumu pasa invadiranih različitim genskim tipovima giardije (vrijednosti s normalnom razdiobom)

	Genska skupina	n	SV	SD	95% interval povjerenja		T-TEST
Kreatinin (μmol/l)	C	10	92.1	17.71032	79.43	104.76	0.1565
	D	15	103.06	18.73	92.69	113.44	
Bilirubin (μmol/l)	C	2	3.65	0.49	-0.79	8.09	0.1893
	D	2	1.85	1.20	-8.95	12.65	
Glukoza (mmol/L)	C	4	5.05	0.82	3.73	6.36	0.9257
	D	7	5.08	0.43	4.68	5.48	

Opažene razlike u vrijednostima istraživanih hematoloških i biokemijskih pokazatelja krvi između pasa invadiranih genskim skupinama C i D nisu statistički značajne (tablica 30).

Tablica 31. Vrijednosti istraživanih biokemijskih pokazatelja u serumu pasa invadiranih različitim genskim tipovima giardija (vrijednosti s nenormalnom razdiobom)

	Genska skupina C (n=10)		Genska skupina D (n=15)		MANN-WHITNEY TEST
	Median	Raspon	Median	Raspon	
Urea (mmol/L)	4.9	2,6-8.1	5.3	3,6-9.2	P=0.4527
Albumini (g/L)	30.5	27-37	31	12-34	P=0.2649
Ukupni proteini (g/L)	64	83-83	61	29-74	P=0.1262
ALT (U/L)	38	20-280	35	23-68	P=0.1323
AST (U/L)	35.5	12-70	34	21-52	P=0.6772
AP (U/L)	43	22-604	48	24-113	P=0.9337
Amilaza (U/L)	838	706-1303	719	470-1167	P=0.0401
Lipaza (U/L)	342.5	144-630	386	134-700	P=0.9117
CPK (U/L)	103	62-312	166	83-244	P=0.0458
Kolesterol (mmol/L)	5.7	3.1-12,4	5.5	2,7-8.3	P=0.9779
Trigliceridi (mmol/L)	0.85	0.4-11,8	0.8	0,4-2	P=0.9777

Utvrđene su statistički značajne razlike u vrijednostima amilaze i kreatinin kinaze između dviju skupina invadiranih pasa (tablica 31).

## 6. RASPRAVA

Bolesti probavnog sustava u pasa vrlo su učestala oboljenja u veterinarskoj maloj praksi, te često predstavljaju terapijski izazov kliničarima. Simptom koji dominira kod bolesti probavnog sustava je proljev. Uzroci koji do proljeva mogu dovesti su raznoliki i mnogobrojni, a vrlo često zahtjevaju različitu terapiju. Stoga je od velikog značaja identificirati uzrok proljeva kako bi se moglo primjeniti adekvatno liječenje. U dosadašnjim istraživanja kao dominantni uzroci proljeva u pasa utvrđeni su paraziti (helminti i protozoi), infekcije virusima, bakterijama i gljivicama, uzroci idiopatske upale (upalna bolest crijeva), intoksikacije (otrovanja hranom), pogreške pri hranjenju te bolesti gušterače, jetara, bubrega i endokrinopatije (GASHEN, 2010.).

Kao paraziti koji u pasa uzrokuju probavne simptome uglavnom se navode paraziti *Giardia duodenalis*, *Ancylostoma caninum*, *Isospora canis*, *Uncinaria stenocephala* i *Trichuris vulpis*, a vrlo su česte i njihove istovremene invazije (OLIVIERA i sur., 2002.; RAMIREZ-BARRIOS i sur., 2004.; FONTANARROSSA i sur., 2006.).

Osim proljeva pri parazitarnim invazijama probavnog trakta u pasa je često zabilježeno i kronično intermitentno povraćanje (TAMS, 2003.; TANGTRONGSUP i SCORSA, 2010.).

Posljednja tri stoljeća paraziti iz roda *Giardia* intrigiraju brojne biologe i kliničare, a u 80-im godinama 20. stoljeća započinju opsežnija molekularna istraživanja ovog organizma. Premda su morfološki jednaki, izolati su svrstani u sedam zasebnih genskih skupina temeljem metaboličkih i biokemijskih razlika, razlika u količini DNA, te nukleotidnim sljedovima. Vrsno specifične genske skupine C, D, E, F i G su dokazane u različitim vrsta domaćih i divljih životinja, dok su genske skupine A i B izdvojene iz ljudi, ali i različitih vrsta domaćih i divljih životinja (MONIS i sur., 1996.; ADAM, 2001.; CACCIO i sur., 2005.).

Invazije giardijama mogu uzrokovati probavne „poremećaje” ali psi mogu također biti invadirani bez vidljivih simptoma. Ovo je do sada prvo znanstveno istraživanje, kojim smo pojavu kliničkih simptoma i njihov intenzitet odlučili usporediti sa invazijama različitim genskim

skupinama *G. duodenalis* pasa, kao i utjecaj istovremenih invazija parazitima/patogenima na pojavu i intenzitet kliničkih simptoma

## 6.1. EPIZOOTIOLOŠKI PODATCI

U ovo istraživanje uključena su 82 psa. Cijelovitu skupinu pasa činilo je 50% mužjaka i 50% ženki (slika 9).

Nisu uočene statistički značajne razlike u zastupljenosti spolova u pasa s obzirom na invadiranost s *G. duodenalis* i gensku skupinu *G. duodenalis* (slika 10, tablica 14). U brojnim predhodnim istraživanjima učestalosti invazije *G. duodenalis* i genske tipizacije iste nije promatrana povezanost ovih parametara i spola životinja. Novijim istraživanjem utvrđena je korelacija spola invadiranih životinja s genskom skupinom *G. duodenalis*. Naime, PALLANT i sur. (2015.) utvrdili su veću učestalost genske skupine D u muških životinja što je u suprotnosti s rezultatima ovog istraživanja, međutim UPJOHN i sur. (2010.) i MEIRELES i sur. (2008.) su utvrdili veću učestalost invazije *G. duodenalis* (neovisno o genskoj skupini iste) u ženskih životinja. Mogućnost da se *G. duodenalis*, kao i različite genske skupine iste, javlja češće u životinja određenog spola, zahtijeva opsežnija istraživanja kako bi se u na većem uzorku pasa utvrdilo da li doista ima spolne predispozicije i ako ima da bi se u potpunosti objasnio ovaj fenomen. Dosadašnja istraživanja bavila su se uglavnom razlikama u invaziji ovim bičašem s obzirom na smještaj životinja, životne navike, pa i pasminske karakteristike (MOHAMED i sur., 2013.), dok je pitanje spola kao predisponirajućeg faktora još uvijek nedovoljno istraženo.

Za razliku od spola utvrđena je statistički značajna razlika u dobi pasa invadiranih parazitom *G. duodenalis* (tablica 15). Naime, psi invadirani s *G. duodenalis* bili su statistički značajno mlađi u odnosu na neinvadirane pse. Ovi rezultati odgovaraju rezultatima dosadašnjih istraživanja (BARUTSZKI i SCHAPER, 2003.; BALLWEBER i sur., 2010.; RIGGIO i sur., 2012.; BARUTZKI i SCHAPER, 2013.) prema kojima su invazije učestalije u mlađih životinja, naročito u štenadi. Porast prevalencije *G. duodenalis* u mlađoj dobi životinja očekivana je pojava s obzirom na nezrelost imunskog odgovora kao i na životne navike štenadi i mladih pasa koje uključuju bliske kontakte, pa i koprofagiju.



Takva učestalost parazitarnih invazija u životinja mlađe dobi opravdani je razlog za pojačane mjere dijagnostike i terapije parazitarnih invazija u mladim pasa.

## 6.2. UČESTALOST POJEDINIH PARAZITA/PATOGENA U ISTRAŽIVANIH PASA

U istraživanoj populaciji pasa (n=82) utvrđena je invadiranost/infekcija nekim od istraživanih parazita/patogena u 68 pasa (82,9%) (tablica 21). Međutim s obzirom da smo u ovom istraživanju kao potencijalnog patogena istraživali i *C. perfringens*, za kojeg je poznato da sama njegova prisutnost nije dovoljan dokaz patogenosti istog, ovako visoki postotak pozitivnih rezultata treba uzeti s oprezom. Ako promatramo samo učestalost parazita u istraživanih pasa tada je ona 43,9% (tablica 18). U brojnim predhodnim istraživanjima učestalost parazita u pasa kretala se od 16-72% (DUBNA i sur, 2007.; MARTINEZ MORENO i sur., 2007.; KATAGIRI I OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008.; ITOH i sur. 2015.).

Analizom rezultata invadiranosti/inficiranosti pasa s proljevom (promjena konzistencije stolice i/ili promjena učestalosti defekacije) vidljivo je da je u 76,9% pasa utvrđen neki parazit/patogen (tablica 17). Najučestaliji pojedinačni patogen u pasa s proljevom je *C. perfringens*. Ovakav rezultat u skladu je s dosadašnjim istraživanjima u kojima je isti utvrđen u oko 80% pasa (WEESE i sur., 2001.; MARKS, 2002.). Uzevši u obzir već navedeno da sama prisutnost ne znači i patogenetski utjecaj na razvoj proljeva trebalo bi provesti dodatna istraživanja identifikacije toksina *C. perfringens*. Niti jedan drugi pojedinačni uzročnik ne dominira kao uzročnik proljeva u ovom istraživanju. Međutim, istovremena invazija je utvrđena kao značajan čimbenik u razvoju proljeva u ovom istraživanju. Ti rezultati se slažu s rezultatima istraživanja GIZZI i sur. (2014.) koji su utvrdili učestalost istovremene invazije u pasa s proljevom, ali ona nije utjecala na trajanje i intenzitet proljeva u pasa, što je također utvrđeno i u ovom istraživanju (tablica 22). Kako je prisutnost istovremenih invazija utvrđena kao značajni čimbenik razvoja proljeva u pasa potrebno je u svih pasa s proljevom prilagoditi dijagnostički pristup prema identifikaciji više potencijalnih patogena. Paraziti/patogeni koji sudjeluju u istovremenim invazijama mogu sinergistički djelovati i utjecati na intenzitet proljeva, putem utjecaja na imunski sustav nosioca te pojačavanja virulencije ostalih patogena (GRIFFITHS i sur., 2011.). Učestalost *G. duodenalis* u svih istraživanih pasa u ovom istraživanju (tablica 16) u suglasnosti je s brojnim rezultatima dosadašnjih istraživanja prema kojima je ovaj bičaš najčešće

utvrđeni parazit u probavnom traktu pasa (JOHANSEN i sur., 2014.; PIPIA i sur., 2014.; SMITH i sur., 2014.).

### 6.3. OPAŽENE RAZLIKE U POJAVNOSTI I INTENZITETU KLINIČKIH SIMPTOMA

Giardioza u pasa, kao i u ljudi, može biti simptomatska, ali vrlo često i asimptomatska bolest (BALLWEBER i sur., 2010.). U istraživanju koje su proveli BOUZID i sur. (2015.) učestalost *G. duodenalis* bila je 161% veća u skupini pasa s izraženim kliničkim simptomima od one u skupini pasa bez izraženih kliničkih simptoma. U ovom istraživanju nisu uočene statistički značajne razlike u učestalosti *G. duodenalis* u asimptomatskih i simptomatskih pasa (tablica 13). Ovakvi rezultati u skladu su s brojnim istraživanjima provedenima do sada u kojima je utvrđena podjednaka učestalost invazije *G. duodenalis* i u populaciji simptomatskih i asimptomatskih pasa (ITOH i sur., 2011.; GUEST i sur., 2007.; SANTOS i sur., 2007.; LABARTHE i sur., 2008.; CLAERBOUT i sur., 2009.; PIPIA i sur., 2014.). Ovaj nalaz velikog broja asimptomatskih pasa ukazuje na prilagođenost vrsno specifičnih izolata i skupina njihovim konačnim nositeljima, te ove životinje predstavljaju asimptomatske nositelje koji stalnim izlučivanjem oocisti kontaminiraju okoliš i omogućavaju širenje invazije *G. duodenalis*. Bez obzira na pojavnost kliničkih simptoma iz navedenih razloga trebalo bi liječiti sve životinje u kojih su utvrđene ciste *G. duodenalis*.

Invazije pasa *G. duodenalis* vrlo su česte, a klinička slika varira od subkliničke, blage do izrazite. Najčešće se javljaju probavni simptomi od kojih je najučestaliji proljev koji varira od mekše formirane stolice pa sve do potpuno profuznog i vodenastog proljeva te može biti akutnog ili kroničnog tijeka (TANGTRONGSUP i SCORSA, 2010.). U ovom istraživanju u simptomatskoj skupini pasa invadiranih s *G. duodenalis* najčešće su utvrđeni slijedeći simptomi: promijenjena konzistencija stolice, povećana frekvencija defekacije, sluz u stolici, smanjeni apetit, smanjena tjelesna aktivnost i gubitak tjelesne mase (tablica 19). Ovakvi rezultati u skladu su s dosadašnjim istraživanjima provedenima u svrhu utvrđivanja patogeneze nastanka giardioze i kliničke slike iste (BURET i sur., 2002.; HERNOT i sur., 2005.; OWENS i GREENSON, 2007.; BURET i sur., 2008.; TANGTRONGSUP i SCORSA, 2010.).

U pretraživanoj populaciji pasa dokazane su samo *G. duodenalis* genskih skupina C i D što je u skladu s velikim brojem istraživanja ovog bičaša u svijetu (BALLWEBER, 2010.;

RIMHANEN-FINNE , 2007.; BECK i sur., 2012.; SCORSA i sur., 2012.). Zoonotske skupine A i B ovim istraživanjem nisu dokazane u istraživanoj populaciji pasa. Ovakav nalaz genskih skupina C i D posljedica je činjenice da su to vrsno specifične genske skupine *G. duodenalis* te su bolje prilagođene svojim nositeljima. Poznato je da vrsno specifične skupine mogu istisnuti skupine A i B koje mogu invadirati brojne životinjske vrste i čovjeka. Smatra se da su vrsno specifične skupine prilagođenije svojim nositeljima, a time i da se u njima brže umnažaju (THOMPSON i MONIS, 2004.). Posljedica toga je istiskivanje i preraštanje ostalih genskih skupina, tako da vrsno specifične skupine postaju dominantne, što je dokazano u ovom istraživanju. U suprotnosti s ovim rezultatima skupina je istraživanja s određenih područja Japana, Njemačke, Belgije, i Sjedinjenih Američkih Država kojima su utvrđene dominantno zoonotske genske skupine A i/ili B u pasa. ITAKAGI i sur. (2005.) utvrdili su gensku skupinu A u 70,8% istraživanih pasa, LEONHARD i sur. (2007.) gensku skupinu A u 87,3% istraživanih pasa, CLAERBOUT i sur. (2009.) gensku skupinu A u 80% istraživanih pasa, a COVACIN i sur. (2012.) gensku skupinu A u 28% i gensku skupinu B u 41% istraživanih pasa.

Učestalost pojedinih kliničkih simptoma u pasa u kojih je izolirana *G. duodenalis* genske skupine C, odnosno genske skupine D također je promatrana u ovom istraživanju (tablica 16). Iz tablice je vidljivo da nema statistički značajnih razlika u pojavi pojedinih kliničkih simptoma s obzirom na različite genske skupine. Iznimku predstavlja simptom pojave sluzi u stolici. Učestalost ovog simptoma pri invaziji genskom skupinom C iznosi 100%, a pri invaziji genskom skupinom D 37,5%. Pojava sluzi u stolici uglavnom se povezuje s patološkim procesima koji zahvaćaju debelo crijevo, no s obzirom na nedovoljno istraženu patogenezu nastanka giardijoze pretpostavka je da invazija ovim bičaćem može pogodovati pojavi nekih drugih bolesti probavnog trakta, kao što su upalna bolest crijeva, poremećaj fiziološke mikroflore, indukcija poremećaja motiliteta crijeva i apoptoza epitelnih stanica crijeva. Ovi mehanizmi za posljedicu imaju hipersekreciju žlijezdanog tkiva crijeva te produkciju sluzi (TANGTRONGSUP i SCORZA, 2010.).

Rezultati brojnih istraživanja povezanosti genskog tipa giardija i kliničkih simptoma u ljudi kontroverzni su i oprečni. Neka istraživanja giardijoze ljudi nisu polučila rezultate koji bi ukazali na razlike u kliničkoj manifestaciji prilikom invazije ljudi genskom skupinom A ili B (KOHLI i sur, 2008.; SAHAGUN i sur, 2008.; AJJAMPUR i sur., 2012.) dok je nekoliko autora ukazalo na različitosti kliničke slike u ljudi s obzirom na gensku skupinu *G. duodenalis*. Tako su

GELANEW i sur., 2007.; CACCIO i RYAN, 2008.; PELAYO i sur., 2008.; MOHAMMED MAHDI i sur., 2009.) utvrdili povezanost invazije genskom skupinom B i pojavom kliničkih simptoma, odnosno invazijom genskom skupinom A u asimptomatskih slučajeva, a s druge strane, neka od istraživanja navode invaziju genskom skupinom A učestalijom u slučajeva s izraženim kliničkim simptomima (READ i sur., 2002.; AYDIN i sur., 2004.; HAQUE i sur., 2005.) U istraživanju giardioze u djece s područja Ruande, IGNATIUS i sur. (2012.) utvrdili su povezanost kliničkih simptoma s genskim skupinama *G. duodenalis*. Naime, u djece invadirane *G. duodenalis* genske skupine A učestali su bili abdominalna bol i povraćanje, a u djece invadirane *G. duodenalis* genske skupine B učestalo su se javljali smanjena tjelesna težina i malnutricija. U ovom istraživanju jedan od ciljeva bio je istražiti sličnu korelaciju između genskih tipova giardije i pojave različitih kliničkih simptoma te intenziteta kliničkih simptoma u pasa budući da su takva istraživanja u veterinarskoj medicini sporadična. Takvi rezultati poslužili bi u svrhu formiranja modela kliničkih simptoma za pse invadirane različitim genskim tipovima ovog parazita.

Učestalost promatranih simptoma jednaka je u simptomatskih pasa s giardijama kao i u pasa bez giardija (tablica 24), ali je tijekom bolesti statistički različit između ovih dviju skupina životinja. U skupini pasa invadiranih giardijama više je slučajeva kroničnog tijeka bolesti. Dosadašnja istraživanja navode giardije kao česti uzrok kroničnih proljeva u pasa, ali ponekad se mogu javiti i akutni simptomi (HERNOT i sur. 2005.; OWENS i GREENSON, 2007.; TANGTRONGSUP i SCORSA, 2010.). SUZUKI i sur. (2010.) opisali su slučaj žene iz Japana kod koje su kao posljedica giardioze utvrđeni intenzivni sistemski simptomi koji su uključivali generalizirani osip po koži, edeme, otežano disanje i gubitak apetita. Laboratorijskim pretragama utvrđen je povećani broj leukocita te izražena eozinofilija. Slični slučajevi nisu utvrđeni istraživanjima giardioze pasa, pa niti ovim istraživanjem. Ipak, iz rezultata ovog istraživanja proizlazi da bi osobito kod kroničnih proljeva trebalo obavezno napraviti pretragu stolice na giardije.

Vrijednosti intenziteta kliničkih simptoma vrlo slabo su povezane s pojavom različitih vrsta parazita/patogena u probavnom traktu pasa (tablica 18), odnosno intenzitet kliničkih simptoma neovisan je od stupnja zbroja svih potvrđenih parazita/patogena.

Također, utvrđeno je da su psi s giardijama istovremeno invadirani sa većim brojem ostalih parazita/patogena nego psi bez giardija, ali taj nalaz ne utječe na intenzitet kliničkih promjena (tablica 23). Pojedini paraziti dijele slične životne cikluse, odnosno vežu se za iste izvore invazije (npr. voda). WANG i sur., (2012.) proveli su istraživanje kojim su utvrdili povezanost invazije giardijama i kriptosporidijama sa šetnjom pasa u za to predviđenim parkovima. I u našem istraživanju dokazana je statistički značajna povezanost invazija giardijama i parazitima iz roda *Cryptosporidium* (tablica 20). Oba parazita svrstana su u skupinu vodom prenosivih parazita stoga je za pretpostaviti iste izvore invazija. To mogu biti lokve vode, vlažna područja u parkovima ili slično. Visoka učestalost istovremenih invazija razlogom je potrebe da se uvijek u pasa u kojih je dokazana giardija stolica pretražuje i na kriptosporidije. Ovakvi rezultati u skladu su s nekoliko dosadašnjih istraživanja provedenih u cilju utvrđivanja najčešćih istovremenih invazija ovim parazitima u pasa (BENNET i sur., 1985.; SCORSA i sur., 2007.; SCORSA I TANGTRONGSUP, 2010.). MIRCEAN i sur. (2012.) navode povećanu incidenciju istovremene invazije *G. duodenalis* s *Toxocara canis* i *Isospora* spp. što nije u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Rezultati našeg istraživanja u kojem je utvrđena statistički značajna povezanost invazije giardijama s invazijom drugih parazita/ patogena, poglavito parazita iz roda *Cryptosporidium* može se objasniti životnim navikama i uvjetima držanja pasa, kao što je držanje pasa u dvorištu koje može biti kontaminirano različitim patogenima, psi smješteni u skloništim, slobodno kretanje pasa parkovima, odnosno skupno držane životinje. Također, ostaje otvoreno pitanje eventualnih endogenih čimbenika nositelja, što do sada nije detaljno istraženo. GIZZI i sur. (2014.) na temelju svog istraživanja zaključuju kako istovremena infekcija/invazija s više različitih patogena ne utječe na trajanje proljeva u pasa, kao niti na pojavu letalnog ishoda bolesti. Međutim, sama prisutnost više patogena zahtijeva kompleksnu obradu, ali i terapiju takvih pacijenata. Stoga, kada promotrimo pse u kojih je opažena pojava proljeva vidljivo je da se on najčešće javlja kod pasa s istovremenom invazijom više parazita (tablica 17) pa potencijalni utjecaj više različitih patogena na patogenezu i intenzitet kliničkih simptoma u pasa zahtijeva opsežnija istraživanja.

Uz učestalost pojedinih kliničkih simptoma, u ovom istraživanju promatran je i intenzitet kliničkih simptoma, koji je definiran kao zbroj vrijednosti procjene intenziteta za svaki pojedini klinički simptom.

U našem istraživanju nije utvrđena statistički značajne razlika između intenziteta kliničkih simptoma upasa s giardijama genske skupine C u odnosu na pse s giardijama genske skupine D (tablica 25). Također, nema razlike u istovremenoj invaziji drugim parazitima u pasa u kojih su utvrđene giardije genske skupine C ili D. Kako do sada nisu provedena istraživanja utjecaja genske skupine giardija na intenzitet kliničkih simptoma u pasa i istovremenu invaziju drugim parazitima potrebno je napomenuti da za kliničare ovakav rezultat predstavlja smjerokaz da dijagnostički i terapijski pristup nije potrebno temeljiti na pripadnosti *G. duodenalis* genskoj skupini C ili D. Budući da ovim istraživanjem u pasa nisu utvrđene giardije genske skupina A i B ovu pretpostavku ne može se primjeniti na sve genske skupine giardija koje su do sada izolirane u pasa diljem svijeta. Naime, treba istražiti intenzitet kliničkih simptoma, pojavnost pojedinih kliničkih simptoma, kao i pojavu istovremene invazije drugim parazitima u pasa u kojih su izolirane giardije genske skupine A i B.

Nisu opažene razlike u trajanju simptoma (izraženih u danima) između pasa invadiranih giardijama genske skupine C i pasa invadiranih giardijama genske skupine D (slika 11). Do sada u nisu provedena istraživanja na temu trajanja i dinamike javljanja kliničkih simptoma u pasa (perzistentno ili intermitentno) s obzirom na invadiranost pasa različitim genskim skupinama giardija, no objavljeno je nekoliko istraživanja ove problematike u ljudi. HOMAN I MANK (2001.) navode povezanost invazije ljudi sa *G. duodenalis* genske skupine A s intermitentnim proljevima, a genske skupine B s kroničnim, perzistentnim proljevom. Temeljem gore navedenog istraživanja trebalo bi istražiti eventualnu prisutnost sličnih simptoma u pasa invadiranih s *G. duodenalis* genskih skupina A i B sa proširenim i detaljiziranim pokazateljima promatranih kliničkih simptoma.

#### **6.4. POVEZANOST INVAZIJE PARAZITOM *G. duodenalis* S POKAZATELJIMA HEMATOLOŠKIH I BIOKEMIJSKIH PRETRAGA KRVI i POVEZANOST INVAZIJE POJEDINOM GENSKOM SKUPINOM *G. duodenalis* S POKAZATELJIMA HEMATOLOŠKIH I BIOKEMIJSKIH PRETRAGA KRVI**

U dosadašnjim istraživanjima malo se pažnje posvećivalo hematološkim i biokemijskim pokazateljima u pasa invadiranih s *G. duodenalis*. Opažene razlike vrijednosti hematoloških i većine biokemijskih pokazatelja (tablice 26 i 27) u pasa invadiranih i neinvadiranih s *G. duodenalis* u ovom istraživanju nisu statistički značajne. BORDEAU (1993.) navodi kako je u

pasa u kojih je utvrđena invazija *G. duodenalis* prisutna tendencija nastanka eozinofilije, ali ovim istraživanjem to nije dokazano. JAIN (1986.) navodi kako je broj eozinofila u cirkulaciji proporcionalan stupnju antigene stimulacije, pa tako i stupnju antigene stimulacije parazita. Iz toga i činjenice da ovim istraživanjem nije utvrđena pojava eozinofilije u pasa invadiranih s giardijama se može zaključiti da postoji opravdana sumnja kako antigena stimulacija od strane *G. duodenalis* nije dovoljno intenzivna da bi prouzročila intenzivnu eozinofiliju, te se eozinofilija ili izostanak iste u svakodnevnoj kliničkoj praksi ne može koristiti kao prediktor invazije s *G. duodenalis*.

Jedino do sada provedeno istraživanje biokemijskih pokazatelja u pasa invadiranih s *G. duodenalis* proveli su ROSA i sur. (2007.). U tom istraživanju nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji ukupnih proteina, albumina, ALT, AST, GGT, ureje i kreatinina u serumu. Ovim istraživanjem utvrđene su statistički značajne razlike u koncentraciji ureje, te aktivnosti ALT, lipaze i CPK između pasa u kojih je izolirana *G. duodenalis* i pasa u kojih nije izolirana *G. duodenalis*.

Utvdili smo statistički značajno nižu aktivnost ALT u pasa invadiranih s *G. duodenalis*. Međutim, aktivnost ALT nalazi se unutar referentnih vrijednosti i u invadiranih i u neinvadiranih pasa. Snižena aktivnost ALT nema nikakvo značenje u veterinarskoj medicini (BUSH, 1991.; WILLARD I TWEDT, 2004.), te se rezultat dobiven ovim istraživanjem ne može interpretirati.

Snižena koncentracija ureje zabilježena je kod zatajenja jetre, portosistemskog shunta, diabetesa insipidusa i psihogene polidipsije, primarne hiperamonijemije, uporabe anaboličkih steroida i hranidbe s niskim udjelom proteina. Međutim, u našem istraživanju je ta statistički značajno niža koncentracija ureje u pasa invadiranih s giardijama još uvijek unutar referentnih vrijednosti koncentracije ureje za pse, dok se gore navedeni uzroci odnose na koncentraciju ureje ispod referentnih vrijednosti. Također, sva gore navedena stanja očituju se ozbiljnim kliničkim simptomima (neurološki simptomi, poliurija, polidipsija, epileptički napadi) koji u pasa obuhvaćanih ovim istraživanjem nisu zabilježeni (BUSH, 1991.; SUCHODOLSKI, 2008.). Uzevši u obzir sve navedeno dobiveni rezultat se ne može okarakterizirati patološkim.

U našem istraživanju utvrđene su statistički značajne povišene aktivnosti lipaze i CPK u pasa u kojih je utvrđena *G. duodenalis*. Aktivnost lipaze bila je statistički značajno viša u pasa

invadiranih giardijama u odnosu na neinvadirane pse, ali i u invadiranih i u neinvadiranih pasa aktivnost lipaze bila je povišena u odnosu na referentne vrijednosti. Dio pasa obuhvaćenih ovim istraživanjem imao je proljev. Kako je lipaza enzim koji osim iz gušterače može biti podrijetlom i iz duodenuma (JACOBS, 1989.; STEINER i sur., 2006.) nije iznenađujuće da je njena aktivnost bila povišena u pasa s proljevom. Statistički značajno viša aktivnost lipaze u pasa s utvrđenim giardijama od aktivnosti lipaze u pasa bez utvrđenih giardija najvjerojatnije su posljedica patoloških procesa koje *G. duodenalis* uzrokuje u duodenumu. Kako bi sa sigurnošću tvrdili da su rezultati ovog istraživanja posljedica patoloških procesa u duodenumu potrebno je u budućim istraživanjima određenim metodama odrediti koncentraciju lipaze podrijetlom isključivo od gušterače te time gušteraču isključiti kao potencijalni uzrok povišenja ovog biokemijskog pokazatelja.

Za razliku od aktivnosti lipaze psi u kojih je utvrđena *G. duodenalis* imali su statistički značajno višu aktivnost CPK u serumu, ali je ona i u giardijama invadiranih pasa i u pasa u kojih nisu utvrđene giardije unutar referentnih vrijednosti. Povišena koncentracija CPK u pasa javlja se kod oštećenja skeletnog mišićja, ekstremnih tjelesnih napora, hipotireoze i bolesti središnjeg živčanog sustava, ali i laboratorijskih grešaka (hemoliza, povišena koncentracija bilirubina) (BUSH, 1991.). Međutim, gore navedene bolesti očituju se povišenjem aktivnosti CPK iznad referentnih vrijednosti što u našem istraživanju nije slučaj. Ipak, u istraživanjima koja su se osvrnula na patogenetske mehanizme giardijoze navodi se i eventualna produkcija toksina, te oštećenje ne samo epitela već i dubljih slojeva sluznice crijeva (TANGTRONGSUP i SCORZA, 2010.). GRAEBER i sur. (1984.) navode oštećenje seromuskularnog sloja tankih crijeva kao uzrok povišenja aktivnosti CPK u serumu. KELLER (1981.) kao tkiva s najintenzivnijom aktivnosti CPK navodi skeletnu muskulaturu, ali i srčanu muskulaturu, dijafragmu, glatku muskulaturu probavnog sustava te mozak. Uzevši u obzir sve navedeno moglo bi se zaključiti da je statistički značajno viša aktivnost CPK posljedica mikrooštećenja koje *G. duodenalis* uzrokuje prihvaćanjem trofozoita za epitel tankih crijeva.

Vrijednostima hematoloških pokazatelja i većine biokemijskih pokazatelja u pasa invadiranih genskim C i D skupinama nisu statistički značajne (tablice 28, 29, 30, 31). Ovim istraživanjem utvrđena je statistički značajno viša aktivnost amilaze u pasa invadiranih giardijama genske skupine C te statistički značajno viša aktivnost CPK u pasa invadiranih s



giardijama genske skupine D (tablica 31). Aktivnost amilaze je u i pasa invadiranih s giardijama genske skupine C i u pasa invadiranih giardijama genske skupine D u granicama referentnih vrijednosti dok je aktivnost CPK u pasa invadiranih s giardijama genske skupine D blago iznad referentnih vrijednosti. Kako je određivanje aktivnosti CPK jedna od najosjetljivijih laboratorijskih pretraga i vrlo često njena aktivnost može biti lažno pozitivna zbog laboratorijskih grešaka ili minimalno invazivnih zahvata (vađenje krvi, injekcije) preporuka je kod povišenih vrijednosti ponavljati pretragu te se tek perzistentno povišena aktivnost CPK smije interpretirati. Kako se u našem istraživanju radi o minimalnom povišenju aktivnosti CPK u pasa invadiranih giardijama genske skupine D (3%) ovaj rezultat treba interpretirati s oprezom. Interpretacija ovih rezultata bez dodatnih istraživanja u ovom trenutku bila bi nepouzdana.

Uzevši u obzir sve rezultate dobivene ovim istraživanjem može se zaključiti da bi u pasa u okviru gastroenterološke obrade obavezno trebalo provesti i pretragu na giardije ali i ostale parazite/patogene. Osobito je važno provesti pretragu na *G. duodenalis* u pasa mlađe dobi, a u slučaju pozitivnog nalaza svakako treba provesti i pretrage na ostale parazite/patogene, poglavito kriptosporidije. U pasa s proljevom treba obratiti posebnu pažnju na mogućnost istovremene invazije pri čemu bi u daljnim istraživanjima trebalo uključiti i dokazivanje toksina koje tvore klostridiji. Međutim rezultati ovog istraživanja ukazuju i na činjenicu da se ne smije zaobići pretraga na giardije i kod asimptomatskih pasa. Također, rezultati našeg istraživanja demantiraju neka uvriježena mišljenja u svakodnevnoj kliničkoj praksi u Hrvatskoj kao što je obavezno prisutstvo eozinofilije u parazitarnih invazija, pa izostanak eozinofilije ne smije biti argument za isključivanje parazitarnih invazija, osobito invazije sa *G. duodenalis*.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Giardioza pasa učestala je bolest probavnog sustava te može biti simptomatska i asimptomatska. Psi bez vidljivih simptoma bolesti predstavljaju stalan izvor invazije stoga je neophodno liječiti obje skupine pasa.
2. Giardioza pasa češće se javlja u mlađih životinja i nije povezana sa spolom životinja.
3. Psi na području grada Zagreba i okolice invadirani su sa genskim skupinama C i D što ukazuje da psi ne predstavljaju izvor invazije za ljude.
4. Invazija pasa s *G. duodenalis* utječe na tijek bolesti, odnosno tijek bolesti u giardijama invadiranih pasa najčešće je kroničan i nije povezan sa genskim skupinama.
5. Pripadnost *G. duodenalis* genskoj skupini C ili D ne utječe na pojavu pojedinih kliničkih simptoma kao niti na ukupni intenzitet kliničkih simptoma u pasa.
6. Nisu dokazane statistički značajne razlike u anamnestičkim podacima i većini kliničkih simptoma giardioze s obzirom na invazije genskim skupinama C ili D.
7. Istovremena invazija pasa s *G. duodenalis* s ostalim parazitima ne utječe na intenzitet kliničkih simptoma.
8. Za razliku od ostalih istovremenih invazija visoka učestalost istovremenih invazija *G. duodenalis* i *Cryptosporidium spp.* ukazuje na nužnost pretraživanja i na prisutnost kriptosporidija.
9. Invazija s *G. duodenalis* nije povezana s promjenama u vrijednostima hematoloških odrednica, uključujući niti udio eozinofila u populaciji leukocita. Dokazane su promijenjene vrijednosti lipaze, CPK, ureje i ALT u serumu pasa.

## 8. LITERATURA

ABAZA, S. M., J. J. SULLIVAN, G. S. VISVESVARA (1991): Isoenzyme profiles of four strains of *Giardia lamblia* and their infectivity to jirds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 63-68.

ADAM, R.D. (2000): The *Giardia lamblia* genome. *International Journal for Parasitology* 30, 475-484.

ADAM, R.D. (2001): Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 447-75.

AHMED, W.M., W.M. MOUSA, S.M. ABOELHADID, M.M. TAWFIK (2014): Prevalence of zoonotic and other gastrointestinal parasites in police and house dogs in Alexandria, Egypt. *Vet. World* 7, 275–280.

AJJAMPUR S.S., B. KOSHY, M. VENKATARAMANI, R. SARKAR, A.A. JOSEPH, K.S.JACOB, H. WARD, G. (2011): Effect of cryptosporidial and giardial diarrhoea on social maturity, intelligence and physical growth in children in a semi-urban slum in south India. *Ann Trop. Paediatr.* 3, 205-2012.

ALEY, S.B., M. ZIMMERMAN, M. HETSKO, M.E. SELSTED, F.D. GILLIN (1994): Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. *Infect. Immun.* 12, 5397- 5403.

ALLENSPACH, K., B. WIELAND, A. GRONE, F. GASCHEN (2007): Chronic enteropathies in dogs: Evaluation of risk factors for negative outcome. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 700-708.

ANDREWS, R.H., M. ADAMS, P.F. BOREHAM, G. MAYRHOFER, B.P. MELONI (1989): *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int. J. Parasitol.* 19, 183–190.

ASHER, A.J., D.C. HOLT, R. M. ANDREWS, M. L. POWER (2014): Distribution of *Giardia duodenalis* Assemblages A and B among Children Living in a Remote Indigenous Community of the Northern Territory, Australia. *Plos. One.* 9, 1-7.

AYDIN, A.F., B.A BESIRBELLIOGLU, I.Y. AVCI, M. TANYUKSEL, E. ARAZ, A. PAHSA (2004): Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2, 147-51.

BALLWEBER, L.R., L. XIAO, D. D. BOWMAN, G. KAHN, V. A. CAMA (2010): Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends. Parasitol.* 4, 180-189.

BARIGYE R., N.W. DYER, T.K NEWELL, M.L. KHAITSA, J.M. TROUT, M. SANTIN, R. FAYER (2008): Molecular and immunohistochemical detection of assemblage E, *Giardia duodenalis* in scouring North Dakota calves. *Vet. Parasitol.* 157,196-202.

BARUCH, A. C., J. ISAAC-RENTON, R. D. ADAM (1996): The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: a sequence-based approach. *The Journal of Infectious Diseases* 174, 233–236.

BARUTZKI, D., R. SCHAPER (2003): Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999-2002. *Parasitol. Res.* 3, 148-150.

BARUTZKI, D., R. SCHAPER (2011): Results of parasitological examinations of faecal samples from cats and dogs in Germany between 2003 and 2010. *Parasitol. Res.* 109, 45-60.

BARUTZKI, D., R. SCHAPER (2013): Age-dependant prevalence of endoparasites in young dogs and cats up to one year of age. *Parasitol. Res.* 1, 119-131.

BARWICK, R.S., H.O. MOHAMMED, M.E. WHITE, R.B. BRYANT (2003): Factors associated with the likelihood of *Giardia spp.* and *Cryptosporidium spp.* in soil from dairy farms. *J. Dairy Sci.* 86, 784-91.

BECK, R., H. SPRONG, S. LUCINGER, E. POZIO, S.M. CACCIÒ (2011a): A large survey of Croatian wild mammals for *Giardia duodenalis* reveals a low prevalence and limited zoonotic potential. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 1049-1055.

BECK, R., H. SPRONG, I. BATA, S. LUCINGER, E. POZIO, S.M. CACCIÒ (2011b): Prevalence and molecular typing of *Giardia spp.* in captive mammals at the zoo of Zagreb, Croatia. *Vet. Parasitol.* 175, 40-46.

- BECK, R, H. SPRONG, E. POZIO, S.M. CACCIÒ (2012): Genotyping *Giardia duodenalis* isolates from dogs: lessons from a multilocus sequence typing study. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 206-213.
- BENNET M., D. BAXBY, N. BLUNDELL, C.J. GASKELL, C.A. HART, D.F. KELLY. (1985): Cryptosporidiosis in the domestic cat. *Vet. Rec.* 116:73-74.
- BERKMAN D.S., A.G. LESCANO, R.H. GILMAN, S.L. LOPEZ , M.M. BLACK (2002): Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet.* 360, 564-71.
- BERTRAM, M. A., E. A. MEYER, J. D. LILE, AND S. A. MORSE (1983): A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. *J. Parasitol.* 69, 793-801.
- BORDEAU, P., (1993): Les giardioses des carnivores. *Rec. Med. Vet.* 5-6, 393-400.
- BOWMAN, D.D., J.L. LIOTTA, M. ULRICH, S.D. CHARLES, J. HEINE, R. SCHAPER (2009): Treatment of naturally occurring, asymptomatic *Giardia* sp. in dogs with Drontal Plus flavour tablets. *Parasitol. Res.* 105, 125-134.
- BRODSKY, R.E., H.C. SPENCER, M.G. SHULTZ (1974): Giardiasis in American travelers to the Soviet Union. *J. Infect. Dis.* 130, 319.
- BUGG, R.J, I.D. ROBERTSON, A.D. ELLIOT, R.C. THOMPSON (1999): Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. *Vet. J.* 157, 295-301.
- BURET, A.G., K. MITCHELL, D.G. MUENCH, K.G.E. SCOTT (2002): *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology.* 125, 11-19.
- BURET, A.G. (2007): Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut.* 3, 316-317.
- BURET, A.G.. (2008): Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite.* 3, 261-265.

BUSH, B.M. (1991): Interpretation of Laboratory Results for Small Animal Clinicians. Blackwell Science LTD, Oxford, London, Edinburgh.

CACCIO, S.M., M. DE GIACOMO, E. POZIO (2002): Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int. J. Parasitol. 32, 1023-1030.

CACCIO, S.M., R.C. THOMPSON, J. MCLAUCHLIN, H.V. SMITH (2005): Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends. Parasitol. 21, 430-437.

CACCIO, S.M., U. RYAN (2008): Molecular epidemiology of giardiasis. Mol. Biochem. Parasitol., 160, 75-80.

CACCIO, S.M., R. BECK, M. LALLE, A. MARINCULIĆ, E. POZIO (2008): Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. Int. J. Parasitol. 38, 1523-1531.

CADORÉ, J.L. (2010): Vomiting. U: Canine and feline gastroenterology. (Lecoindre, P., ur.), 1. izdanje. Wolters Kluwer, Francuska. pp. 6-11.

CARRANZA, P.G., H.D. LUJAN (2010): New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. Microbes. Infect. 1, 71-80.

CAVE, N.J., S.L. MARKS, P.H. KASS, A.C. MELLI, M.A. BROPHY (2002): Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. J. Am. Vet. Med. Assoc. 221:52-59.

CLAEREBOUT E., S.CASAERT, A.C. DALEMANS, N. DE WILDE, B. LEVECKE, J. VERCRUYSSSE, T. GEURDEN (2009): *Giardia* and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium. Vet. Parasitol. 161, 41-46.

COOPER, M.A., R.D. ADAM, M. WOROBEY, C.R. STERLING (2007): Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. Curr. Biol. 17, 1984-8.

COOPER, M.A., C.R. STERLING, R.H. GILMAN, V. CAMA, Y. ORTEGA, R.D. ADAM (2010): Molecular analysis of household transmission of *Giardia lamblia* in a region of high endemicity in Peru. J. Infect. Dis. 202, 1713-21.

COVACIN, C., D.P. AUCOIN, A. ELLIOT, R.C. THOMPSON (2011): Genotypic characterisation of *Giardia* from domestic dogs in the USA. Vet. Parasitol. 1-2, 28-32.

- DANIELS, C.W., M. BELOSEVIC (1992): Disaccharidase activity in the small intestine of susceptible and resistant mice after primary and challenge infections with *Giardia muris*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46, 382-390.
- DE JONCKHEERE, J.F., A.C.MAJEWSKA, W. KASPRZAK (1990): Giardia isolates from primates and rodents display the same molecular polymorphism as human isolates. Mol. Biochem. Parasitol. 39, 23-9.
- DOSSIN, O. (2008): Diagnostic tools: Clinical history. U: Small animal gastroenterology (Steiner J.M. ed). Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover. pp. 3-9.
- DUBNÁ, S., I. LANGROVÁ, J. NÁPRAVNÍK, I. JANKOVSKÁ, J. VADLEJCH, S. PEKÁR, J. FECHTNER (2007): The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. Vet Parasitol. 1-2,120-8.
- ECKMANN, L. (2003): Mucosal defences against *Giardia*. Parasite Immunol. 25, 259-270.
- ELIGIO-GARCÍA, L., A. CORTÉS-CAMPOS, E. JIMÉNEZ-CARDOSO (2008): Classification of *Giardia intestinalis* isolates by multiple polymerase chain reaction (multiplex). Parasitol. Res. 103, 797-800.
- ELMENDORF, H.G., s.c. DAWSON, j.m. MCCAFFERY (2003): The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. Int. J. Parasitol. 1, 3-28.
- EHSAN, A., T. GEURDEN, S. CASAERT, J. PAULUSSEN, L. DE COSTER, T. SCHOEMAKER, R. CHALMERS, G. GRIT, J. VERCRUYSE, E. CLAEREBOUT(2015): Occurrence and potential health risk of Cryptosporidium and Giardia in different water catchments in Belgium. Environ. Monit. Assess. 187, 41-57.
- EPE, C. (2009): Intestinal nematodes: biology and control. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 6, 1091-1107.
- ERLANDSEN, S.L., W.J. BEMRICK, D.E. SCHUPP, J.M. SHIELDS, E.L. JARROLL, J.F. SAUCH, J.B. PAWLAY (1990): High resolution immunogold localization of Giardia cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 38, 625-632.

ERLANDSEN, S.L., P.T. MACECHKO, H. VAN KEULEN, E.L. JARROLL (1996): Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *J. Eukaryot. Microbiol.* 5, 416-429.

EY, P.L., K. KHANNA, R. H. ANDREWS, P.A. MANNING, G. MAYRHOFER (1992): Distinct genetic groups of *Giardia intestinalis* distinguished by restriction fragment length polymorphisms. *Journal of General Microbiology.* 138, 2629–2637.

EY, P.L., J.M.DARBY, R.H. ANDREWS, G. MAYRHOFER (1993): *Giardia intestinalis*: detection of major genotypes by restriction analysis of gene amplification products. *Int. J Parasitology* 23, 591-600.

EY, P.L., M. MANSOURI, J. KULDA, E. NOHÝNKOVÁ, P.T. MONIS, R.H. ANDREWS, G. MAYRHOFER (1997): Genetic analysis of *Giardia* from hooved farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44, 626-635.

FARTHING, M.J. (1997): The molecular pathogenesis of giardiasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 24, 79-88.

FARZAN A., L. PARRINGTON, T. COKLIN, A. COOK, K. PINTAR, F. POLLARI, R. FRIENDSHIP, J. FARBER, B. DIXON (2011): . Detection and characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium spp.* on swine farms in Ontario, Canada. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 1207-13.

FAYER, R., M. SANTIN, D. MACARISIN (2012): Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol. Res.* 111, 1349-55.

FENG, Y., Y. ORTEGA, V. CAMA, J. TERRELL, L. XIAO, (2008): High intragenotypic diversity of *Giardia duodenalis* in dairy cattle on three farms. *Parasitol. Res.* 103, 87-92.

FENG, Y, L. XIAO (2011): Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1, 110-40.

FILICE, F.P. (1952): Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *University of California Publication in Zoology.* 57, 53-146.



FONTANARROSA, M.F., D. VEZZANI, J. BASABE, D.F. EIRAS (2006): An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): Age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. *Vet. Parasitol.* 136, 283-295.

FORD, J.F. (2005): The discovery of *Giardia*. *Microscope*. 4, 147-153.

FORONDA, P., M.D. BARGUES, N. ABREU-ACOSTA, M.V. PERIAGO, M.A. VALERO, B. VALLADARES, S. MAS-COMA (2008): Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitol. Res.* 103, 1177-81.

GASCHEN, F. (2010): The principal syndromes in gastroenterology. U: Canine and feline gastroenterology. (Lecoindre P., F. Gaschen, E. Monet ed.), Wolters Kluwer, France, pp. 1-44.

GELANEW, T., M. LALLE, A. HAILU, E. POZIO, S.M. CACCIO, (2007): Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia, *Acta. Trop.* 102, 92-99.

GEURDEN, T. , B. LEVECKE, S. M. CACCIÓ, A. VISSER, G. DE GROOTE, S. CASAERT, J. VERCRUYSSSE, E. CLAEREBOU (2009): Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. *Parasitology*. 10, 1161-1168.

GEURDEN, T.,R. VANDERSTICHEL, H. POHLE, A. EHSAN, G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, E.R. MORGAN, P. CAMUSET, G. CAPELLI, J. VERCRUYSSSE, E. CLAEREBOU (2012): A multicentre prevalence study in Europe on *Giardia duodenalis* in calves, with molecular identification and risk factor analysis. *Vet. Parasitol.* 190, 383-90.

GHOSH, S., M. FRISARDI, R. ROGERS, J. SAMUELSON (2001): How *Giardia* swim and divide. *Infect. Immun.* 12, 7866-7872.

GIZZI, A.B., S.T. OLIVEIRA, C.M. LEUTENEGGER, M. ESTRADA, D.A. KOZEMJAKIN, R. STEDILE, M. MARCONDES, A.W. BIONDO (2014): Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. *BMC Vet. Res.* 10, 23.

GÓMEZ-MUÑOZ M.T., C. CÁMARA-BADENES, C. MARTÍNEZ-HERRERO MDEL, M.A. DEA-AYUELA, M.T. PÉREZ-GRACIA, S. FERNÁNDEZ-BARREDO, M. SANTÍN, R. FAYER (2012): Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in lambs from Spain reveals a high heterogeneity. *Res. Vet. Sci.* 93, 836-42.

GRAEBER, G.M., P.J. CAFFERTY, R.E. WOLF, J.W. HARMON (1984): An analysis of creatine phosphokinase in the mucosa and the muscularis of the gastrointestinal tract. J. Surg. Res. 5, 376-382.

GRIT, G.H., E. BÉNÉRÉ, A. EHSAN, N. DE WILDE, E. CLAEREBOUT, J. VERCRUYSSSE, L. MAES, T. GEURDEN (2012): *Giardia duodenalis* cyst survival in cattle slurry. Vet. Parasitol. 184, 330-334.

GUEST, C.M., J.M. STEPHEN, C.J. PRICE (2007): Prevalence of Campylobacter and four endoparasites in dog populations associated with Hearing Dogs. J Small Anim Pract. 11, 632-637.

HACKKETT, T., M.R. LAPPIN (2003): Prevalence of Enteric Pathogens in Dogs Of North-Central Colorado. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 39, 52-56.

HALL, E.J., A.J. GERMAN (2008): Inflammatory bowel disease. U: Small Animal Gastroenterology (Steiner J.M. ed). Schlutersche Verlagsgesellschaft mbH&Co.KG. Hannover. pp. 312-324.

HAQUE, R., S. ROY, M. KABIR, S.E. STROUP, D. MONDAL, E.R. HOUP (2005): *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. J. Infect. Dis. 192, 2171-3.

HERNOT, D.C., V.C. BOURGE, L.J. MARTIN, H.J. DUMON, P.G. NQUJEN (2005): Relationship between total transit time and faecal quality in adult dogs differing in body size. J. Anim. Phys. Anim. Nutr. 89, 189- 193.

HIMSWORTH, C.G., S. SKINNER, B. CHABAN, E. JENKINS, B.A. WAGNER, N.J. HARMS, F.A. LEIGHTON, R.C. THOMPSON, J.E. HILL (2010): Multiple zoonotic pathogens identified in canine feces collected from a remote Canadian indigenous community. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2, 338-341.

HOMAN, W.L., F.H. VAN ENCKEVORT, L. LIMPER, G.J. VAN EYS, G.J. SCHOONE, W. KASPRZAK, A.C. MAJEWSKA, F. VAN KNAPEN (1992): Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. Parasitol. Res. 78, 316-23.

HOMAN, W.L., M. GILSING, H. BENTALA, L. LIMPER, F. VAN KNAPEN (1998): Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. *Parasitol. Res.* 84, 707-14.

HOMAN, W.L., T.G. MANK (2001): Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int. J. Parasitol.* 31, 822-6.

HOPKINS, R.M., B.P. MELONI, D.M. GROTH, J.D. WETHERALL, J.A. REYNOLDSON, R.C. THOMPSON (1997): Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J. Parasitol.* 83, 44-51.

HOPKINS, R.M., C.C.CONSTANTINE, D.A. GROTH, J.D. WETHERALL, J.A. REYNOLDSON, R.C. THOMPSON (1999): PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitology.* 118, 531-539.

IGNATIUS, R., J. B. GAHUTU, C. KLOTZ, C. STEININGER, C. SHYIRAMBERE, M. LYNG, A. MUSEMAKWERI, T. AEBISCHER, P. MARTUS, G. HARMS, F. P. MOCKENHAUPT (2012): High Prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B Infection and Association with Underweight in Rwandan Children. *Plos. Negl. Trop. Dis.* 6, 1-9.

INGE, P.M., C.M. EDSON, M.J. FARTHING (1988): Attachment of *Giardia lamblia* to rat intestinal epithelial cells. *Gut.* 6, 795-801.

INPANKAEW, T., F. SCHÄR, P. ODERMATT, A. DALSGAARD, W. CHIMNOI, V. KHIEU, S. MUTH, R. J. TRAUB (2014): Low risk for transmission of zoonotic *Giardia duodenalis* from dogs to humans in rural Cambodia. *Parasit. Vectors.* 1, 1-5.

ITAGAKI, T., S. KINOSHITA, M. AOKI, N. ITOH, H. SAEKI, N. SATO, J. UETSUKI, S. IZUMIYAMA, K. YAGITA, T. ENDO (2005): Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. *Vet. Parasitol.* 133, 283-287.

ITOH N., K. KANAI, H. TOMINAGA, J. KAWAMATA, T. KANESHIMA, S. CHIKAZAWA, Y. HORI, F. HOSHI, S. HIGUCHI (2011): Giardia and other intestinal parasites in dogs from veterinary clinics in Japan. Parasitol Res. 1, 253- 256.

JACOBS, R. M. (1989): The Origins of Canine Serum Amylases and Lipase. Vet.Pathol. 26, 525-527.

JACOBS, S.R., C.P. FORRESTER, J. YANG (2001): A survey of the prevalence of Giardia in dogs presented to Canadian veterinary practices. Can. Vet. J. 42, 45-46.

JAIN, N.C. (1986): Schalm's Veterinary Hematology. Lea & Febiger, Philadelphia.

JERGENS, A.E. (1999): Inflammatory bowel disease: Current perspectives. Vet.Clin North Am Small. Anim. Pract. 29, 501-521.

JERGENS, A.E., C.A. SCHREINER, D.E. FRANK, Y. NIYO, F.E.AHRENS, P.D. ECKERSALL, T.J. BENSON, R. EVANS (2003): A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. J. Vet. Intern. Med. 17, 291-297.

JIMÉNEZ, J.C., J. FONTAINE, J.M. GRZYCH, E. DEI-CAS, M CAPRON.(2004): Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11, 152-160.

JIMÉNEZ-GARCÍA, L.F., G. ZAVALA, B. CHÁVEZ-MUNGUÍA, P. RAMOS-GODÍNEZ, G. LÓPEZ-VELÁZQUEZ, L. SEGURA-VALDEZ MDE, C. MONTAÑEZ, A.B. HEHL, R. ARGÜELLO-GARCÍA, G. ORTEGA-PIERRES (2008): Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. Int. J. Parasitol. 38, 1297-304.

JOHANSEN, K.M., N.S. CASTRO, K.E. LANCASTER, E. MADRID, A. HAVAS, J. SIMMS, C.R. STERLING (2014): Characterization of *Giardia lamblia* genotypes in dogs from Tucson, Arizona using SSU-rRNA and beta-giardin sequences. Parasitol. Res. 113, 387–390.

KATAGIRI, S., T.C. OLIVEIRA-SEQUEIRA (2008): Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. *Zoonoses Public Health*. 8-10, 406-413.

KELLER, P. (1981): Enzyme activities in the dog: tissue analysis, plasma values, and intracellular distribution. *Am. J. Vet. Res.* 42, 575–582.

KOHLI, A., O.Y. BUSHEN, R.C. PINKERTON, E. HOUP, R.D. NEWMAN, C.L. SEARS, A.A. LIMA, R.L. GUERRANT (2008): *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 718-725.

LABARTHE, N., F. MENDES-DE-ALMEIDA, M. BALBI, M. SALOMÃO, J. PAIVA, A.L. CRISSIUMA, R. GARCIA, D.C.N. MIRANDA (2008): Prevalence of *Giardia* in household dogs and cats in the State of Rio de Janeiro using the IDEXX SNAP<sup>®</sup> *Giardia* test. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 6, 200–206.

LALLE, M., E. POZIO, G. CAPELLI, F. BRUSCHI, D. CROTTI, S.M., CACCIO (2005a): Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int. J. Parasitol.* 35, 207-213.

LALLE, M., E. JIMENEZ-CARDOSA, S.M. CACCIO, E. POZIO (2005b): Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J. Parasitol.* 91, 203–205.

LASEK-NESSERQUIST, E., D.M. WELCH, M.L. SOGIN (2010): The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int. J. Parasitol.* 40, 1063-1074.

LAPPIN, M.D. (2010): Update on the Diagnosis and Management of *Isospora* spp Infections in Dogs and Cats. *Top. Companion. Anim. Med.* 3, 133-135.

LEBBAD, M., ANKARKLEV, J., TELLEZ, A., LEIVA, B., ANDERSSON, J.O. SVARD, S. (2008): Dominance of *Giardia* assemblage B in Leon, Nicaragua. *Acta. Trop.* 106, 44-53.

LEBBAD, M, J.G. MATTSSON, B. CHRISTENSSON, B. LJUNGSTRÖM, A. BACKHANS, J.O. ANDERSSON, S.G. SVÄRD(2010): From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Vet. parasitol.* 168, 231-239.

LEONHARD, S., K. PFISTER, P. BEELITZ, C. WIELINGA, R.C. THOMPSON (2007): The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Vet. Parasitol.* 1-2, 33-38.

LI. E., P. ZHOU, Z. PETRIN, S.M. SINGER (2004): Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect. Immun.* 11, 6642-6649.

LIANG, C.H., J.C. TSAIHONG, Y.Y. CHENG, S.Y. PENG (2012): Occurrence and genotype of *Giardia* cysts isolated from faecal samples of children and dogs and from drinking water samples in an aboriginal area of central Taiwan. *Exp. Parasitol.* 2, 204- 209.

LITTLE, S.E., E.M. JOHNSON, D. LEWIS, R.P. JAKLITSCH, M.E. PAYTON, B.L. BLAGBURN, D.D. BOWMAN, S.MOROFF, T. TAMS, L. RICH, D. AUCOIN (2009): Prevalence of intestinal parasites in pet dogs in the United States. *Vet Parasitol.* 1-2, 144-152.

LIU, A., X. ZHANG, L. ZHANG, R. WANG, X. LI, J. SHU, X. ZHANG, Y. SHEN, W. ZHANG, H. LING (2012): Occurrence of bovine giardiasis and endemic genetic characterization of *Giardia duodenalis* isolates in Heilongjiang Province, in the Northeast of China. *Parasitol. Res.* 111, 655-661.

LUJÁN, H.D., M.R. MOWATT, T.E. NASH (1997): Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 3, 294-304.

MARINCULIĆ, A., R. BECK (2010): Nematodi u crijevu pasa i mačaka. U: Bolesti probavnog sustava pasa i mačaka. (Potočnjak, D., D. Stanin, N. Turk, ur.), Medicinska naklada, Zagreb, p.p.140-149.

MARK-CAREW, M.P., A.A. ADESIYUN, A. BASU, K.A. GEORGES, T. PIERRE, S. TILITZ, S.E. WADE, H.O. MOHAMMED (2013): Characterization of *Giardia duodenalis* infections in dogs in Trinidad and Tobago. *Vet. Parasitol.* 196, 199–202.

MARKS, S.L., S.C. RANKIN, B.A. BYRNE, J.S. WEESE (2011): Enteropathogenic Bacteria in Dogs and Cats: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Control. *J Vet Intern Med.* 25, 1195–1208.

MARTÍNEZ-MORENO, F.J., S. HERNÁNDEZ, E. LÓPEZ-COBOS, C. BECERRA, I. ACOSTA, A. MARTÍNEZ-MORENO (2007): Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. *Vet Parasitol.* 1, 7-13.

MAYRHOFER, G., R.H. ANDREWS, P.L. EY, N.B. CHILTON (1995): Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology.* 111, 11-17.

MCINTYRE, L., L. HOANG, C. S. ONG, P. LEE, J. L. ISAAC-RENTON (2000): Evaluation of molecular techniques to biotype *Giardia duodenalis* collected during an outbreak. *J. Parasitol.* 86, 172-177.

MEIRELES, P., F. MONTIANI-FERREIRA, V. THOMAZ-SOCCOL (2008): Survey of giardiasis in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Paraná state, Southern Brazil. *Vet Parasitol.* 3-4, 242- 248.

MELONI, B.P., A.J. LYMBERY, R.C. THOMPSON (1988): Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38, 65-73.

MEYER, E.A. (1985): The epidemiology of giardiasis. *Parasitology Today* 1, 101-105

MINETTI, C. , W. TAWEEANAN, R. HOGG, C. FEATHERSTONE, N. RANDLE, S. M. LATHAM, J. M. WASTLING (2014): Occurrence and Diversity of *Giardia duodenalis* Assemblages in Livestock in the UK. *Transbound Emerg Dis.* 6, 60-67.

MIRCEAN V., A. GYÖRKE, V. COZMA (2012): Prevalence and risk factors of *Giardia duodenalis* in dogs from Romania. *Vet Parasitol.* 2-4, 325-329.

MIRO, G., M. MATEO, A. MONTOYA (2007): Survey of intestinal parasites in stray dogs in the Madrid area and comparison of the efficacy of three anthelmintics in naturally infected dogs. *Parasitol. Res.* 100, 317-320.

MOHAMMED MAHDY, A.K., J. SURIN, K.L. WAN, A. MOHD-ADNAN, M.S. HESHAM AL-MEKHLAFI, Y.A.L. LIM (2009): *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. *Acta tropica.* 1: 67-70.

MOHAMED, A.S., L.T. GLICKMAN, J.W. CAMP JR., E. LUND, G.E. MOORE (2013): Prevalence and risk factors for *Giardia spp.* infection in a large national sample of pet dogs visiting veterinary hospitals in the United States (2003–2009). *Vet. Parasitol.* 195, 35–41.

MONIS, P. T., G. MAYRHOFER, R. H. ANDREWS, W.L. HOMAN, L. LIMPER, P. L. EY (1996): Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology.* 112, 1–12.

MONIS, P.T., R.H. ANDREWS, G. MAYRHOFER, J. MACKRILL, J. KULDA, J.L. ISAAC-RENTON, P.L. EY (1998): Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology.* 116, 7-19.

MONIS, P.T., R.H. ANDREWS, G. MAYRHOFER, P.L. EY (1999): Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1135-1144.

MONIS, P.T., R.H. ANDREWS, G. MAYRHOFER, P.L. EY (2003): Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect. Genet. Evol.* 3, 29-38.

MONIS P.T., S.M. CACCIO, R.C. THOMPSON (2009): Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 2, 93-100.

MOORE, L.E. (2008): Esophagus: anatomy and physiology. U: Small animal gastroenterology. (Steiner J.M. ed.), Schlutersche Verlagsgesellschaft, Hannover, pp.139-140.

MÜLLER, N., N. VON ALLMEN (2005): Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int. J. Parasitol.* 13, 1339-1347.



MÜNSTER M., A. HÖRAUF, T. BILZER (2006): Assessment of Disease Severity and Outcome of Dietary, Antibiotic and Immunosuppressive Interventions by Use of Canine IBD Activity Indeks in 21 Dogs With Chronic Inflammatory Bowel Disease. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 11-12, 493-505.

NASH, T.E., D.B. KEISTER (1985): Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of Giardia. The Journal of Infectious Diseases. 152, 1166–1171.

NASH, TE, J.T. CONRAD, M.R.MOWATT (1995): *Giardia lamblia*: identification and characterization of a variant-specific surface protein gene family. J. Eukaryot. Microbiol. 42, 604-609.

NEVES, D., L. LOBO, P.B. SIMOES, L. CARDOSO (2014): Frequency of intestinal parasites in pet dogs from an urban area (greater Oporto, northern Portugal). Vet. Parasitol. 200, 295–298.

NG, J, R. YANG, S. MCCARTHY, C. GORDON, N. HIJJAWI, U. RYAN (2011): Molecular characterization of Cryptosporidium and Giardia in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. Vet Parasitol. 176, 145-150.

O'HANDLEY, R.M., C. COCKWILL, T.A. MCALLISTER, M. JELINSKI, D.W. MORCK, M.E. OLSON (1999): Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. J. Am. Vet. Med. Assoc. 214, 391-396.

OLIVEIRA- SEQUEIRA T.C.G., A.F.T. AMARANTE, T.B. FERRARI, L.C. NUNES (2002): Prevalence of intestinal parasites in dogs from Sao Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 103, 19-27.

OLSON, M. E. , C.J. HANNIGAN, P.F. GAVILLER, L.A. FULTON (2001): The use of a *Giardia* vaccine as an immunotherapeutic agent in dogs. Can. Vet. J. 42, 865-868.

ORTUNO, A., V. SCORZA, J. CASTELLA, M. LAPPIN (2014): Prevalence of intestinal parasites in shelter and hunting dogs in Catalonia, Northeastern Spain. Vet. J. 199, 465–467.

OVERGAAUW, P.A. (1997): Aspects of Toxocara epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. Crit. Rev. Microbiol. 3, 233-251.

OVERGAAUW, P.A.M., F. VAN KNAPEN (2013): Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet. Parasitol.* 193, 398–403.

OWENS S.R., J.K. GREENSON (2007): The pathology of malabsorption: current concepts. *Histopathology.* 50, 64- 82.

PALLANT, L., D. BARUTZKI, R. SCHAPER, R.C. THOMPSON (2015): The epidemiology of infections with *Giardia* species and genotypes in well cared for dogs and cats in Germany. *Parasit. Vectors.* 1, 1-14.

PALM, D., M. WEILAND, A.G. MCARTHUR, J. WINIECKA-KRUSNELL, M.J. CIPRIANO, S.R. BIRKELAND, S.E. PACOCHA, B. DAVIDS, F. GILLIN, E. LINDER, S. SVÄRD (2005): Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol.* 2, 199- 207.

PALMER, C.S., R.J. TRAUB, I.D. ROBERTSON, G. DEVLIN, R. REES, R.C. THOMPSON (2008): Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Vet. Parasitol.* 154, 142-147.

PAZ E SILVA, F.M., M.M. MONOBE, R.S. LOPES, J.P. ARAUJO (2012): Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. *Parasitol. Res.* 1, 325-334.

PIPIA, A.P., A. VARCASIA, C. TAMPONI, G. SANNA, M. SODA, B. PAOLETTI, D. TRAVERSA, A. SCALA (2014): Canine giardiasis in Sardinia Island, Italy: prevalence, molecular characterization, and risk factors. *J. Infect. Dev. Countries* 8, 655–660.

PELAYO, L., F.A. NUÑEZ, L. ROJAS, E. FURUSETH HANSEN, B. GJERDE, H. WILKE, B. MULDER, L. ROBERTSON (2008): *Giardia* infections in Cuban children: the genotypes circulating in a rural population. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology.* 7, 585-595.

PONCE-MACOTELA, M., M. N. MARTÍNEZ-GORDILLO, R. M. BERMÚDEZ-CRUZ, P. M. SALAZAR-SCHETTINO, G. ORTEGA-PIERRES, P. L. EY (2002): Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *Int J Parasitol.* 9, 1201-1202.

PROCTOR, E.M., J.L. ISAAC-RENTON, J. BOYD, Q.WONG, W.R. BOWIE (1989): Isoenzyme analysis of human and animal isolates of *Giardia duodenalis* from British Columbia, Canada. Am. J.Trop. Med. Hyg. 41, 411-415.

QUADROS, R.M., P.H.E. WEISS, G.W. EZEQUIEL, R.B. TAMANHO, G. LEPO, M.R. SILVA, D.C.R.J. SILVA JUNIOR, D.F.A.P. ARAUJO, D.L.C. MILETTI (2013): Prevalence of *Giardia duodenalis* among dogs seized by the Center for Control of Zoonoses (CCZ) of the city of Lages, Santa Catarina, Brazil. Health 5, 119–124.

RAMIREZ-BARRIOS R.A., G. BARBOZA-MENA, J. MUNOZ, F. ANGULO-CUBILLAN, E. HERNANDEZ, F. GONZALEZ, F. ESCALONA (2004): Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. Vet. Parasitol. 121, 11-20.

READ, C., J. WALTERS, I.D. ROBERTSON, R.C.A. THOMPSON (2002): Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. Int. Journ. Parasitol. 32, 229–231.

READ, C.M., P.T. MONIS, R.C. THOMPSON (2004): Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect. Genet. Evol. 4, 125-130.

RIGGIO, F., R. MANELLA, G. ARITI, S. PERRUCCI (2013): Intestinal and lung parasites in owned dogs and cats from central Italy. Vet. Parasitol. 193, 78–84.

RIMHANEN-FINNE, R., H.L. ENEMARK, J. KOLEHMAINEN, P. TOROPAINEN, M.L. HÄNNINEN (2007): Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. Vet. Parasitol. 3-4, 345-348.

RIVERO, M.R, C.V. VRANYCH, M. BISBAL, B.A. MALETTO, A.S. ROPOLO, M.C.TOUZ (2010): Adaptor Protein 2 Regulates Receptor-Mediated Endocytosis and Cyst Formation in *Giardia lamblia*. Biochem. J. 428, 33–45.

RIVERO, M.R., S.L.MIRAS, R. QUIROGAS, A.S. ROPOLO, M.C.TOUZ (2011): Giardia lamblia low-density lipoprotein receptor-related protein is involved in selective lipoprotein endocytosis and parasite replication. Mol Microbiol. 79, 1204–1219.

ROBERTSON L.J., B.K. GJERDE, E. FURUSETH HANSEN (2010): The zoonotic potential of Giardia and Cryptosporidium in Norwegian sheep: a longitudinal investigation of 6 flocks of lambs. Vet. Parasitol. 171, 140-145.

ROSA L.A., M.A. GOMES, A.V. MUNDIM, M.J. MUNDIM, E.L. POZZER, E.S. FARIA, J.C. VIANA, M.C. CURY (2007): Infection of dogs by experimental inoculation with human isolates of Giardia duodenalis: clinical and laboratory manifestations. Vet. Parasitol. 1-2, 37-44.

ROSSIGNOL, J.F. (2010): Cryptosporidium and Giardia: treatment options and prospects for new drugs. Exp. Parasitol. 124, 45-53.

RUIZ, A., P. FORONDA, J.F. GONZALEZ, A.GUEDES, N. ABREU-ACOSTA, J.M. MOLINA, B. VALLADARES (2008): Occurrence and genotype characterization of Giardia duodenalis in goat kids from the Canary Islands, Spain. Vet. Parasitol. 154, 137-141.

RYAN U., S.M. CACCIÒ (2013): Zoonotic potential of Giardia. Int. J. Parasitol. 43, 943-956.

SAHAGÚN, J., A. CLAVEL, P. GOÑI, C. SERAL, M.T. LLORENTE, F.J. CASTILLO, S. CAPILLA, A. ARIAS, R. GÓMEZ-LUS (2008): Correlation between the presence of symptoms and the Giardia duodenalis genotype. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1, 81-83.

SANTIN, 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.

SANTOS, F.A.G., D. YAMAMURA, M.H.O. VIDOTTO, P.L.D. CAMARGO (2007): Occurrence of gastrointestinal parasites in dogs (Canis familiaris) with acute diarrhea from metropolitan region of Londrina, Paraná State, Brazil. Cienc. Agr. (Londrina) 28, 257–268.

SCORZA, A.V., M.R. LAPPIN (2007): Co-infection of Cryptosporidium and Giardia in naturally infected cats. U: Diagnosis and Treatment of Cryptosporidiosis and Giardiasis in Cats and Dogs in the United States. Fort Collins, CO, Clinical Sciences, Colorado State University

SCORZA, V., S. TANGTRONGSUP (2010): Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp. infections in dogs and cats. *Top. Companion. Anim. Med.* 3, 163-169.

SCORZA A.V., L.R. BALLWEBER, S. TANGTRONGSUP, C. PANUSKA, M.R. LAPPIN (2012): Comparisons of mammalian *Giardia duodenalis* assemblages based on the  $\beta$ -giardin, glutamate dehydrogenase and triose phosphate isomerase genes. *Vet. Parasitol.* 2-4, 182-188.

SCOTT, K.G.E., J.B. MEDDINGS, D.R. KIRK, S.P. LEES-MILLER, A.G. BURET (2002): Intestinal infection with *Giardia* spp. Reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology* 123, 1179–1190.

SEOW, F, P. KATELARIS, M. NGU (1993): The effect of *Giardia lamblia* trophozoites on trypsin, chymotrypsin and amylase in vitro. *Parasitology.* 106, 233-238.

SIMPSON KW, RISHNIW M, BELLOSA M, J. LIOTTA, A. LUCIO, M. BAUMGART, G. CZARNECKI-MAULDEN, J. BENYACOUB, D. BOWMAN (2009): Influence of *Enterococcus faecium* SF68 probiotic on giardiasis in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 476-481.

SINGER, S.M., T.E. NASH (2000): T- cell dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect. Immun.* 68, 170-175.

SIRIPATTANAPIPONG, S., S. LEELAYOOVA, M. MUNGTHIN, R.C. THOMPSON, P. BOONTANOM, W. SAKSIRISAMPANT, P. TAN-ARIYA (2011): Clonal diversity of the glutamate dehydrogenase gene in *Giardia duodenalis* from Thai isolates: evidence of genetic exchange or mixed infections?. *Microbiol.* 206, 1-11.

SMITH, A.F., S.J. SEMENIUK, S.J. KUTZ, A. MASSOLO (2014): Dog-walking behaviours affect gastrointestinal parasitism in park-attending dogs. *Parasit. Vectors.* 7, 429-439.

SOLARI, A.J., M.I. RAHN, A. SAURA, H.D. LUJAN (2003): A unique mechanism of nuclear division in *Giardia lamblia* involves components of the ventral disk and the nuclear envelope. *Biocell.* 3, 329-346.

SPRONG, H., S.M. CACCIÓ, J.W. VAN DER GIESSEN (2009): Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. Plos. Negl. Trop. Dis. 12, 1-12.

SOUZA, S.L., S.M. GENNARI, L.J. RICHTZENHAIN, H.F. PENA, M.R. FUNADA, A. CORTEZ, F. GREGORI, R.M. SOARES (2007): Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. Vet. Parasitol. 149, 258-264.

STEINER, J. M., g. RUTZ, d.a. WILLIAMS (2006): Serum lipase activities and pancreatic lipase immunoreactivity concentrations in dogs with exocrine pancreatic insufficiency. Am. J. Vet. Res. 67, 84-87.

STRANDEN, A.M., J. ECKERT, P. KOHLER (1990): Electrophoretic characterization of *Giardia* isolated from humans, cattle, sheep, and a dog in Switzerland. J. Parasitol. 76, 660-668.

SUCHODOLSKI, L.E. (2008): Gastric physiology. U: Small animal gastroenterology. (Steiner J.M. ed.), Schlutersche Verlagsgesellschaft, Hannover, pp. 155-158.

SUCHODOLSKI, J.S., M. E. MARKEL, J. F. GARCIA-MAZCORRO, S. UNTERER, R. M. HEILMANN, S. E. DOWD, P. KACHROO, I. IVANOV, Y. MINAMOTO, E. M. DILLMAN, J. M. STEINER, A. K. COOK, L. TORESSON (2012): The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. PloS. One.12, e51907.

SULAIMAN, I.M., R. FAYER, C. BERN, R.H. GILMAN, J.M TROUT, P.M. SCHANTZ, P. DAS, A.A. LAL, L. XIAO (2003): Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. Emerg. Infect. Dis. 9, 1444-1452.

SUZUKI, Y., T. NAKAMURA, M. TOKORO, T. TOGANO, M. TOHSAKA, M. KOHRI, Y. HIRATA, K. MIYAZAKI, M. DANBARA, R. HORIE, I. MIURA, K. SUNAKAWA, M. HIGASHIHARA (2010): A case of giardiasis expressing severe systemic symptoms and marked hypereosinophilia. Parasitol Int. 3, 487-489.

TAMS, T.R. (2003): Gastrointestinal symptoms. U: Handbook of small animal gastroenterology. (Tams, T.R. ur) 2. izdanje, Saunders, St. Louis, Missouri. pp. 1-50.

TANGTRONGSUP, S., V. SCORZA (2010): Update on the diagnosis and management of *Giardia spp* infections in dogs and cats. Top. Companion Anim. Med. 25, 155-162.

TEODOROVIC S., J.M. BRAVERMAN, H.G. ELMENDORF (2007): Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. Eukaryot Cell. 8, 1421-1430.

THOMPSON, R.C.A., A.J. LYMBERY, B.P. MELONI (1990): Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiological significance. Protozoological Abstracts. 14, 1-28.

THOMPSON, R.C.A., P.T. MONIS (2004): Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. Adv. Parasitol. 58, 69–137.

THOMPSON, R.C., C.S. PALMER, R. O'HANDLEY (2008): The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. Vet. J. 1, 18-25.

THOMPSON, R.C., P. MONIS (2012): *Giardia*-from genome to proteome. Adv Parasitol. 78, 57-95.

TOVAR, J., G. LEÓN-AVILA, L.B. SÁNCHEZ, R. SUTAK, J. TACHEZY, M. VAN DER GIEZEN, M. HERNÁNDEZ, M. MÜLLER, J.M. LUCOCQ (2003): Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. Nature. 6963, 172-176.

TRAUB, R.J., P.T. MONIS, I. ROBERTSON, P. IRWIN, N. MENCKE, R.C. THOMPSON (2004): Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. Parasitology. 128, 253-262.

TRAVERSA, D. (2011): Are we paying too much attention to cardio-pulmonary nematodes and neglecting old-fashioned worms like *Trichuris vulpis*? Parasit Vectors. 8, 4–32.

TROUT, J.M., M. SANTIN, E.C. GREINER, R. FAYER (2006): Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in 1–2 year old dairy cattle, Vet. Parasitol. 140, 217–222.

TROUT, J.M. M. SANTIN, R. FAYER, (2007): Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in adult dairy cows. *Vet. Parasitol.* 147, 205–209.

TSENG, Y.C., G.D. HO, T.T. CHEN, B.F. HUANG, P.C. CHENG, J.L. CHEN, S.Y. PENG (2014): Prevalence and genotype of *Giardia duodenalis* from faecal samples of stray dogs in Hualien city of eastern Taiwan. *Trop. Biomed.* 31, 305–311.

TZANIDAKIS, N., S. SOTIRAKI, E. CLAEREBOU, A. EHSAN, N. VOUTZOURAKIS, D. KOSTOPOULOU, C. STIJN, J. VERCRUYSSSE, T. GEURDEN (2014): Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium spp.* in sheep and goats reared under dairy husbandry systems in Greece. *Parasite.* 21, 1-6.

UPJOHN, M., C. COBB, J. MONGER, T. GEURDEN, E. CLAEREBOU, M. FOX (2010): Prevalence, molecular typing and risk factor analysis for *Giardia duodenalis* infections in dogs in a central London rescue shelter. *Vet. Parasitol.* 3-4, 341-346.

VAN KEULEN, H., R.R. GUTELL, M.A. GATES, S.R., CAMPBELL, S.L. ERLANDSEN, E.L. JARROLL, J. KULDA, E.A. MEYER (1993): Unique phylogenetic position of *Diplomonadida* based on the complete small subunit ribosomal RNA sequence of *Giardia ardeae*, *G. muris*, *G. duodenalis* and *Hexamita sp.* *The FASEB Journal.* 7, 223–231.

VAN KEULEN, H., P.T. MACECHKO, S. WADE, S. SCHAAF, P.M. WALLIS, S.L. ERLANDSEN (2002): Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet. Parasitol.* 108, 97-107.

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.

YANG, D., Q. ZHANG, L. ZHANG, H. DONG, Z. JING, Z. LI, J. LIU (2014): Prevalence and risk factors of *Giardia duodenalis* in dogs from China. *Int. J. Environ. Health Res.*, 1–7.

ZANZANI, S. A., A. L. GAZZONIS, P. SCARPA, F. BERRILLI, M. T. MANFREDI (2014): Intestinal parasites of owned dogs and cats from metropolitan and micropolitan areas:



prevalence, zoonotic risks, and pet owner awareness in northern Italy. *Biomed Res Int. E pub* 696508, 1-10.

ZHANG W., X. ZHANG., R. WANG, A. LIU, Y. SHEN, H. LING, J. CAO, F. YANG, X. ZHANG, L. ZHANG (2012a): Genetic Characterizations *Giardia duodenalis* in Sheep and Goats in Heilongjiang Province, China and Possibility of Zoonotic Transmission. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 9, 1-7.

WADE, S.E., H.O. MOHAMMED, S.L. SCHAAF (2000): Epidemiologic study of *Giardia sp.* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet. Parasitol.* 89, 11-21.

WALZER, P.D., M.S. WOLFE, M.G. SHULTZ (1971): Giardiasis in Russia. *J. Infect. Dis.* 124: 235-237.

WANG, A., R. RUCH-GALLIE, V. SCORZA, P. LIN, M.R. LAPPIN (2012): Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in dog park attending dogs compared to non-dog park attending dogs in one region of Colorado. *Vet. Parasitol.* 184, 335–340.

WANG H., G. ZHAO, G. CHEN , F. JIAN, S. ZHANG, C. FENG, R. WANG, J. ZHU, H. DONG, J. HUA, M. WANG, L. ZHANG (2014): Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Henan, China. *P. one.* 6, 1-9.

WASHABAU, R.J. (2012a): Biology of the gastrointestinal tract, pancreas and liver. U: *Canine and feline gastroenterology* (Washabau, R.J.; M.J. Day, ur.), 1. Izdanje, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 1-69.

WEESE, J.S. (2011): Bacterial enteritis in dogs and cats: diagnosis, therapy, and zoonotic potential. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 41, 287-309.

WILLARD, M.D., D.C. TWEDT (2004): gastrointestinal pancreatic and hepatic disorders. U: *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods* (Michael D. Willard, Harold Tvedten, Grant H. Turnwald.) 4. izd, W.B. Saunders, St Louis. pp. 208-246.

WILLARD, M.D. (2009): Clinical Manifestations of Gastrointestinal Disorders. U: Small animal internal medicine. (Nelson, R.W., C.G. Couto,ur.), 4. izdanje, Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 351-373.

WILLARD, M.D. (2010): Diarrhea. U: Textbook of Veterinary Medicine. (Ettinger, S. J., E.C. Feldman, ur.), Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 201 -203.

WILLIAMSON, A.L., P.J. O'DONOGHUE, J.A. UPCROFT, P. UPCROFT (2000): Immune and pathophysiological responses to different strains of *Giardia duodenalis* in neonatal mice. *Int. J. Parasitol.* 30, 129-136.

XIAO, L. (1994): *Giardia* infection in farm animals. *Parasitol. Today.* 11, 436-438.

XIAO, L., R. FAYER (2008): Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol.*, 38, 1239-1255.

## 9. PRILOZI

Tablica 1 - Najčešći uzroci povraćanja u pasa .....	6
Tablica 2 - Diferencijacija proljeva karakterističnog za tanko crijevo i proljeva karakterističnog za debelo crijevo.....	9
Tablica 3. Najčešći uzroci akutnog proljeva u pasa .....	10
Tablica 4. Najčešći uzroci kroničnog proljeva u pasa.....	11
Tablica 5. Najčešći uzroci malapsorpcije u pasa.....	11
Tablica 6. Najčešći uzroci melene u pasa.....	13
Tablica 7. Najčešći uzroci hematohezije u pasa .....	13
Tablica 8. CIBDAI i CCECAI sustavi bodovanja.....	17
Tablica 9. Tvorba letalnih toksina s obzirom na tip <i>C. perfringens</i> . .....	43
Tablica 10. Referente vrijednosti istraživanih hematoloških pokazatelja Laboratorija Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu .....	47
Tablica 11.Referente vrijednosti istraživanih biokemijskih pokazatelja Laboratorija Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu .....	48
Tablica 12. Modificirani sustav vrednovanja kliničkih simptoma i procjena intenziteta kliničkih simptoma .....	49
Tablica 13. Učestalost <i>G. duodenalis</i> u simptomatskih i asimptomatskih pasa .....	62
Tablica 14. Zastupljenost spolova u pasa u kojih su izolirane giardije s obzirom na gensku skupinu.....	66
Tablica 15. Povezanost dobi pasa (izražene u godinama) i invazije <i>G. duodenalis</i> .....	66
Tablica 16. Učestalost pojave različitih parazita/patogena u istraživanoj populaciji pasa (n=82) .....	67
Tablica 17. Pojedinačni uzročnici i istovremena invazija parazitima/patogenima izdvojeni u skupini pasa u kojih je zabilježen proljev definiran kao promjene konzistencije stolice i/ili učestalosti defekacije (n=39).....	68
Tablica 18. Učestalost jednog ili više parazita u svih istraživanih pasa (ne uključuje klostridije) .....	68
Tablica 19. Učestalost pojave kliničkih simptoma u skupinama pasa u kojih su izolirane <i>G. duodenalis</i> genske skupine C (n=5) i genske skupine D (n=8).....	69

Tablica 20. Povezanost pojavljivanja <i>G. duodenalis</i> s pojavljivanjem ostalih parazita/patogena .....	71
Tablica 21. Broj utvrđenih parazita/patogena u pojedinom psu u svih istraživanih pasa.....	72
Tablica 22. Korelacije između intenziteta kliničkih simptoma i broja utvrđenih parazita /patogena u pojedinom jedniku .....	72
Tablica 23. Intenzitet kliničkih simptoma i zbroj svih parazita/patogena s i bez utvrđene <i>G. duodenalis</i> .	73
Tablica 24. Povezanost invazije parazitom <i>G. duodenalis</i> s intenzitetom kliničkih simptoma promatrano u skupini istraživanih pasa s kliničkim simptomima (n=42).....	74
Tablica 25. Intenzitet kliničkih simptoma i broj ostalih utvrđenih parazita/patogena u pojedinog pasa invadiranih s giardijama genske skupine C i genske skupine D.....	76
Tablica 26. Vrijednosti istraživanih hematoloških i biokemijskih pokazatelja u pasa invadiranih i neinvadiranih s <i>G. duodenalis</i> (vrijednosti s normalnom razdiobom) .....	78
Tablica 27. Vrijednosti istraživanih hematoloških i biokemijskih pokazatelja u pasa invadiranih i neinvadiranih s <i>G. duodenalis</i> (vrijednosti s nenormalnom razdiobom).....	79
Tablica 28. Vrijednosti istraživanih hematoloških pokazatelja u pasa invadiranih s giardijama genske skupine C i D (vrijednosti s normalnom razdiobom) .....	80
Tablica 29. Vrijednosti istraživanih hematoloških pokazatelja u pasa invadiranih s giardijom genske skupine C i D (vrijednosti s nenormalnom razdiobom) .....	80
Tablica 30. Vrijednosti istraživanih biokemijskih pokazatelja u serumu pasa invadiranih različitim genskim tipovima giardije (vrijednosti s normalnom razdiobom) .....	81
Tablica 31. Vrijednosti istraživanih biokemijskih pokazatelja u serumu pasa invadiranih različitim genskim tipovima giardija (vrijednosti s nenormalnom razdiobom).....	82
Slika 1. Ciste giardija obilježene monoklonskim protutijelima pod fluorescentnim mikroskopom. Jezgre su obojene s 4',6'-diamidino-2-phenilindolom (DAPI). (R. Beck) .....	31
Slika 2. Razvojni ciklus giardija.....	33
Slika 3. Jajašce <i>T. vulpis</i> (R. Beck). .....	39
Slika 4. Oociste <i>I. canis</i> (R. Beck) .....	40
Slika 5. Jajašce strongilidnog tipa, <i>Uncinaria/Ancilostoma</i> (R. Beck) .....	41
Slika 6. Jajašca <i>T. canis</i> (R. Beck) .....	42
Slika 7. Učestalost <i>G. duodenalis</i> u svih istraživanih pasa (n=82).....	61

Slika 8. Zastupljenost spolova u pasa zaprimljenih u Kliniku za unutarnje bolesti u razdoblju od 01.01.2012. do 31.12.2012. ....	63
Slika 9. Zastupljenost spolova u svih istraživanih pasa (n=82).....	64
Slika 10. Zastupljenost spolova u pasa u kojih je utvrđena <i>G. duodenalis</i> (n=25) .....	65
Slika 11. Trajanje kliničkih simptoma (izraženo u danima) s obzirom na pripadnost genskoj skupini <i>G. duodenalis</i> .....	77

## 10. ŽIVOTOPIS

**IME I PREZIME:**

Iva Šmit

**DATUM I MJESTO ROĐENJA:**

8. siječnja 1981. godine; Zagreb, Republika Hrvatska

**BRAČNO STANJE:**

Izvanbračna zajednica, dvoje djece

**OBRAZOVANJE:**

1999.

Maturirala u III. Gimnaziji u Zagrebu

1999.

Upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2006.

Diplomirala, stekla zvanje doktora veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

2006.

Položila stručni ispit

2008.

Upisala Doktorski studij iz veterinarskih znanosti na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

**KRONOLOGIJA ZAPOSLENJA:**

2006. Vježbenički staž u trajanju od 12 mjeseci u Veterinarskoj stanici grada Zagreba
2007. Zaposlena u Veterinarskoj stanici grada Zagreba u trajanju od 4 mjeseca
2008. Zaposlena u veterinarskoj ambulanti „Fiziovet“ u trajanju od 11 mjeseci
2008. Zaposlena kao znanstveni novak/asistent na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na projektu Upalne bolesti probavnog trakta u pasa, (053-0532266-2215) glavni istraživač prof. dr. sc. Dalibor Potočnjak
2014. Zaposlena kao asistent na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Trenutno zaposlena na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje aktivno sudjeluje u znanstvenom i stručnom radu kao i u izvođenju nastave iz kolegija Klinička propedeutika domaćih životinja, Unutarnje bolesti domaćih životinja, Bolesti i liječenje pasa i mačaka II i Napredna dijagnostika i terapija bolesti probavnog sustava pasa i mačaka. Svakodnevno sudjeluje u stručnom radu Ambulante za male životinje Klinike za unutarnje bolesti u sklopu čega obrađujem veliki broj pacijenata, naročito s gastroenterološkom problematikom. Također, samostalno izvodi endoskopsku pretragu probavnog i dišnog sustava pasa i mačaka.

#### **STRUČNO USAVRŠAVANJE:**

2008. SCIVAC- međunarodni kongres male prakse u Riminiju, Italija
2009. SCIVAC- međunarodni kongres male prakse u Riminiju, Italija
2009. Znanstveno- stručni sastanak „Veterinarska znanost i struka“, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska
2010. 8. HRVATSKI KONGRES O SURADNJI KLASIČNE I NEKONVENCIONALNE MEDICINE S

MEĐUNARODNIM SUDJELOVANJEM, Zagreb,  
Hrvatska

2010. 1. Veterinarski felinološki kongres, ISFM&Purina, Zagreb, Hrvatska
2011. 2. Veterinarski felinološki kongres, ISFM&Purina, Zagreb, Hrvatska
2011. Međunarodni kongres „Veterinarska znanost i struka“, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska
2011. Stručno usavršavanje u području endoskopije respiratornog sustava pasa (The endoscopy workshop – Endoscopy of canine respiratory system) održano na The International Congress “Veterinary Science and profession“ 4. listopada 2011., Zagreb, Hrvatska
2012. Stručno kliničko usavršavanje u trajanju tri mjeseca (srpanj, kolovoz, rujan) u Klinici za unutarnje bolesti malih životinja Veterinarskog fakulteta Beču, Austrija; voditelj prof. dr. sc. Reinhard Hirt
2012. 5. HRVATSKI VETERINARSKI KONGRES, Tuhelj, 10.-13. listopada 2012.
2012. Veterinarski seminar male prakse „Dijabetes u pasa i mačaka“, u organizaciji DDL-ZAGREB/ROYAL CANIN, Zagreb
2012. Stručna konferencija za veterinare „In medias res“, 30. Lipnja 2012. Zagreb
2013. Međunarodni kongres „Veterinarska znanost i struka“, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska
2013. Online Webinari „Feline kidney disease“ i „Proteinuria in feline kidney disease“, Sarah Caney BVSc PhD DSAM
2013. Veterinarski seminar male prakse „Gerontologija mačaka“ u organizaciji DDL-ZAGREB/ROYAL CANIN, Zagreb
2015. 2. hrvatski kongres veterinarara male prakse, Zagreb



## POPIS RADOVA

### Znanstveni radovi objavljeni u časopisu citiranom u tercijarnim publikacijama

1. POTOČNJAK D.; D. ŽUBČIĆ; M. TORTI; **I. ŠMIT**; M. POPOVIĆ; D. GRAČNER; LJ. BEDRICA; N. KUČER; D. STANIN; K. VLAHOVIĆ (2010): Holistische Behandlung Der Chronischen Colitis Beim Hund – Fallstudie. *Tierärztliche Umschau*. 65, 233-237.
2. MRLJAK, V.; N. KUČER; J. KULEŠ; A. TVARIJONAVICIUTE; M. BRKLJAČIĆ; M. CRNOGAJ T. ; ŽIVIČNJAK; **I. ŠMIT**; J.J. CERON; R. BARIĆ RAFAJ (2014): Serum Concentrations of Eicosanoids and Lipids in Dogs Naturally Infected with *Babesia canis*. *Veterinary parasitology*, 201, 24-30.

### Znanstveni radovi objavljeni u ostalim časopisima

1. VUČINIĆ, S.; Z. VRBANAC; M. BELIĆ; **I. ŠMIT**; D. STANIN; A. HORVATIĆ (2013): Proteomics as a methodology for the characterization of potential new markers of stress elicited by strenuous exercise in sporting dogs – a preliminary study. *Veterinary clinical pathology*. 42, 123-124 (pismo uredniku, znanstveni).
2. BRKLJAČIĆ, M.; M. TORTI; J.; V. MRLJA; **I. ŠMIT**; I. KIŠ; I. MAYER; M. CRNOGAJ; V. MATIJATKO (2014): The concentrations of the inflammatory markers the amino-terminal portion of C-type natriuretic peptide and procalcitonin in canine babesiosis caused by *Babesia canis*. *Veterinarski arhiv*. 6, 575-589.
3. MATIJATKO, V.; M. TORTI; I. KIŠ; **I. ŠMIT**; I. ŠTOKOVIĆ; T. VRANJEŠ-ĐURIĆ; S. MILANOVIĆ; V. MRLJAK; M. BRKLJAČIĆ (2014): Serum cortisol and insulin concentrations in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinarski arhiv*. 6; 551-562.

4. CRNOGAJ, M.; I. KIŠ; N. KUČER; **I. ŠMIT**; I. MAYER; M. BRKLJAČIĆ; J. SELANEC; V. MRLJAK (2015): Lipid peroxidation in dogs naturally infected with *Babesia canis canis*. *Veterinarski arhiv*. 1, 37-48.

### **Poglavlja u knjizi**

1. POTOČNJAK D., **I. ŠMIT** (2011): Endoskopska pretraga probavnog sustava. U: Bolesti i liječenje pasa i mačaka. (Ur: T. Dobranić, V. Matijatko), CD izdanje, Veterinarski fakultet Zagreb, 116-124.

### **Udžbenici i skripte**

1. 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 CRNI; 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. Dobranić, Tomislav; Matijatko, Vesna (ur.), Zagreb, Veterinarski fakultet .

### **Stručni i pregledni članci objavljeni u domaćem časopisu**

1. JOVIĆ, I.; M. TORTI; V. MATIJATKO; **I. ŠMIT**; I. KIŠ; M. BRKLJAČIĆ (2012): Infekcijski endokarditis kod pasa i mačaka. *Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis*. 43, 253-265.
2. MANDIĆ, M.; D. POTOČNJAK; **I. ŠMIT**; A. BECK (2012): Klinički i laboratorijski pokazatelji aktivnosti upalne bolesti crijeva u pasa. *Veterinarska stanica*, 43, 267-274.

3. SELANEC, J., M. TORTI, **I. ŠMIT**, I. MAYER, J. KULEŠ, I. JOVIĆ, V. MRLJAK (2012).  
Novije spoznaje o babeziozi pasa. *Veterinarska stanica*, 43, 497-505.
4. TORTI M., V. MATIJATKO, M. ČERLEK, I. KIŠ, **I. ŠMIT**, V. MRLJAK (2010): Traumatski miokarditis. *Veterinarska stanica*, 41 , 557-561.
5. POTOČNJAK D., **I. ŠMIT** (2006): Endoskopska pretraga probavnog trakta u pasa i mačaka. *Hrvatski veterinarski vjesnik*, 29, 113-122.
6. **ŠMIT I.**, D. POTOČNJAK (2006): Endoskopske dijagnostičke i terapijske metode. *Hrvatski veterinarski vjesnik*, 29, 171-180.

### **Sudjelovanje na domaćim i međunarodnim znanstvenim i stručnim skupovima**

1. CRNOGAJ, M.; I. KIŠ; **I. ŠMIT**; I. JOVIĆ; I. MAYER; N. KUČER; V. MRLJAK (2013):  
Pristup pacijentu sa kroničnim povraćanjem. Veterinarski dani 2013.: zbornik radova, Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Tiskara Zelina, 233-238. (predavanje, međunarodna recenzija, objavljeni rad, stručni)
2. JURKIĆ KRSTESKA, G.; I. MAYER; M. CRNOGAJ; **I. ŠMIT**; I. JOVIĆ; D. GRDEN; J. SELANEC; K. ŠIMONJI (2013): Pristup kunićima s mokraćnim kamencima. Veterinarski dani 2013.: zbornik radova, Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet u Zagrebu, 229-232. (predavanje, međunarodna recenzija, objavljeni rad, stručni)
3. KIŠ, I.; M. CRNOGAJ; G. JURKIĆ KRSTESKA; M. TORTI; **I. ŠMIT**; D. POTOČNJAK; D. GRDEN (2013): Infekcije u mokraćnom sustavu pasa: prikaz kliničkih slučajeva. Veterinarski dani 2013. : zbornik radova, Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Tiskara Zelina, 223-228. (predavanje, domaća recenzija, objavljeni rad, stručni)
4. MAYER, I.; N. LEMO; **I. ŠMIT**; M. BRKLJAČIĆ; M. CRNOGAJ; K. ŠIMONJI; I. KIŠ; G. JURKIĆ KRSTESKA; V. MATIJATKO (2013): Alergijski dermatitis u pasa - najčešći simptom u veterinarskoj dermatologiji: pregled kliničkih slučajeva 2011-2013. Veterinarski dani 2013, zbornik radova, Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet u Zagrebu. 239-246. (predavanje, domaća recenzija, objavljeni rad, znanstveni)

5. SELANEC, J.; N. BRKLJAČA BOTTEGARO; D. GRDEN; **I. ŠMIT**; V. MRLJAK (2013): Stenotrophomonas maltophilia infection in a horse. Book of Abstracts: The 5th International Congress "Veterinary Science and Profession" / Horvatek Tomić, Danijela; Severin, Krešimir; Slavica, Alen (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 47-47. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak)
6. **ŠMIT, I.**; M. CRNOGAJ; M. TORTI; G. JURKIĆ KRSTESKA; V. GUSAK; D. POTOČNJAK (2013): Oesophageal and gastric foreign bodies in dogs: endoscopic removal. Book of Abstracts: THE 5TH INTERNATIONAL CONGRESS "VETERINARY SCIENCE AND PROFESSION" / Horvatek Tomić, Danijela ; Severin, Krešimir ; Slavica, Alen (ur.), Zagreb : Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 81-81. (poster, međunarodna recenzija, sažetak)
7. CRNOGAJ M.; N. KUČER; I. KIŠ; M BRKLJAČIĆ; **I. ŠMIT**; I. MAYER; G. JURKIĆ; V. MRLJAK (2012): Moguća uloga antioksidansa Glutationperoksidaze u patogenezi babezioze u pasa invadiranih protozoonom Babesia canis canis Zbornik radova 5. Hrvatski veterinarski kongres, Tuheljske Toplice, Zagreb. 389-396. (predavanje, međunarodna recenzija, objavljeni rad, znanstveni)
8. KIŠ, I.; I. MAYER; **I. ŠMIT**; D. GRDEN; G. JURKIĆ KRSTESKA; K. ŠIMONJI; L. ARAČIĆ; I. JOVIĆ (2012): Koncentracija fenobarbitona u pasa oboljelih od idiopatske epilepsije u Hrvatskoj. 5. Hrvatski veterinarski kongres, Tuheljske Toplice, Terme Tuhelj, Zbornik radova, Harapin, Ivica (ur.), (Zagreb), Tiskara Zelina d. d., 397-403. (predavanje, domaća recenzija, objavljeni rad, znanstveni).
9. MAYER, I.; M. BRKLJAČIĆ; **I. ŠMIT**; N. KUČER; M. CRNOGAJ; V. MATIJATKO; R. BARIĆ-RAFAJ; V. MRLJAK (2012): Koncentracija kemokina KC-like u serumu pasa oboljelih od babezioze. Zbornik radova, 5. hrvatski veterinarski kongres s međunarodnim sudjelovanjem / Harapin, Ivica (ur.), Zagreb, 405-414. (predavanje, domaća recenzija, objavljeni rad, znanstveni)
10. KUČER, N.; V. MRLJAK; R. RAFAJ BARIĆ; J. KULEŠ; **I. ŠMIT**; J. SELANEC; M. CRNOGAJ (2012): Activation of lipid metabolism in canine babesiosis caused by babesia canis. Congress Proceedings Book of the 15th Congress of the International Society for Animal Clinical Pathology & 14th Conference of the European Society of Veterinary Clinical Pathology /

Martina Klinkon, Jožica Ježek, Jože Starič (ur.). Ljubljana: University of Ljubljana, Veterinary faculty, 151-151. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

11. CRNOGAJ M., V. MATIJATKO, M. TORTI, N. KUČER., **I. ŠMIT**, K. ŠIMONJI (2011): Heatstroke in dogs: protocol for diagnosis and therapy at the Clinic for internal diseases, Faculty of veterinary medicine, University of Zagreb; Zbornik radova, The International Congress "Veterinary science and profession", Zagreb, 41-41.
12. SELANEC J., N. BRKLJAČA-BOTTEGARO, B. PIRKIĆ, **I. ŠMIT**, V. MRLJAK (2011): Equine recurrent uveitis prevalence in a group of 129 lipizzaner horses in Croatia; Zbornik radova, The International Congress "Veterinary science and profession", Zagreb, 49-49.
13. **ŠMIT, I.**, K. ŠIMONJI, J. SELANEC, I. JOVIĆ, V. MATIJATKO, D. POTOČNJAK (2011): Defining the severity of inflammatory bowel disease in a dog; Zbornik radova, The international congress "Veterinary science and profession", Zagreb, 42-42.
14. TORTI, M.; V. MATIJATKO; **I. ŠMIT**; V. MRLJAK (2009): Pristup dijagnostici i liječenju dilatativne kardiomiopatije u pasa. Zbornik sažetaka Znanstveno stručnog sastanka "Veterinarska znanost i struka", Kozačinski, L.; Maltar-Strmečki, N.; Štoković, I. (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, 120-121. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
15. **ŠMIT, I.**, D. POTOČNJAK, M. TORTI, M. CRNOGAJ, G. JURKIĆ (2009): Liječenje upalne bolesti crijeva u pasa. Znanstveno stručni sastanak Veterinarska znanost i struka. Zagreb, Hrvatska.
16. POTOČNJAK, D., M. POPOVIĆ, **I. ŠMIT**, LJ. BEDRICA, D. GRAČNER, Z. ŽVORC, I. POPOVIĆ, T. LISICIN (2008): Biljezi za procjenu aktivnosti idiopatske upalne bolesti crijeva u pasa; Zbornik radova, Hrvatska veterinarska komora ; Veterinarski fakultet, Zagreb, 95-103.
17. POTOČNJAK, D., **I. ŠMIT**, I. KIŠ, N. KUČER, N. LEMO, D. GRDEN (2004): Reaktivne hepatopatije-najčešće bolesti jetre u pasa i mačaka, Zbornik radova Trećeg hrvatskog veterinarskog kongresa, Zagreb, 220-224.
18. POTOČNJAK D., **I. ŠMIT**, R. RAFAJ BARIĆ, V. MRLJAK, V. MATIJATKO, K. ŠIMONJI, M. BRKLJAČIĆ (2004): Dijagnostika bolesti jetre u pasa i mačaka; Zbornik radova, 3. Hrvatski veterinarski kongres, Opatija, 213-219.

19. ŠMIT, I.; D. POTOČNJAK; D. ŽUBČIĆ; M. TORTI; V. MATIJATKO; G. JURKIĆ; M. CRNOGAJ; D. STANIN; R. PAVEŠIĆ (2010): Holistička medicina kao važna komponenta terapije kroničnih enteropatija u pasa. 8. Hrvatski kongres o suradnji klasične i nekonvencionalne medicine s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska. (predavanje,neobjavljeni rad, stručni).