

CLINICAL CASE

D-dimer levels as a procoagulative marker in association with disease progress during giardiasis in dogs

D dímero como marcador procoagulante en asociación con el progreso de la enfermedad durante la giardiasis en perros

Ali Evren Haydardedeoğlu^{1*} Ph.D, Kerem Ural² Ph.D,
Abdulkadir Orman³ Ph.D, Deniz Aliç Ural⁴ Ph.D.

¹Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Aksaray, Turkey. ²Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Aydın, Turkey. ³Uludag University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Zootecnic, Bursa, Turkey. ⁴Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Faculty Farm, Aydın, Turkey. Correspondence: ahaydardedeoglu@gmail.com

Received: August 2017; Accepted: December 2017.

ABSTRACT

Objective. The present study was conducted to measure D-dimer concentrations and assess their value in disease activity in dogs with giardiasis. Furthermore another purpose was to analyze correlation between cyst excretion and D-dimer levels to those of dogs naturally infected with *Giardia sp.* **Materials and methods.** D-dimer analysis were performed in three groups of dogs; (i) 15 dogs with giardiasis to those of treated with secnidazol, (ii) 10 dogs with giardiasis, left untreated as control group, then were compared to those of (iii) 17 dogs without giardiasis, used to detect reference ranges for D-dimer values as control group. was a correlation between D-dimer levels and logarithmic cyst counts. **Results.** The D-dimer range in healthy dogs was <0.1 mg/L. In dogs with giardiasis, the D-dimer concentrations were greater than those of healthy dogs ($p < 0.05$) and ($p < 0.01$), respectively. The mean initial plasma D-dimer level was 2.84 ± 0.50 and 2.99 ± 0.61 ng/L in treated and untreated control groups. At the final follow-up evaluation on day 10 was 0.27 ± 0.50 and 2.14 ± 0.61 ng/L, in treated and untreated control groups, respectively, which was significantly lower in treated group ($p < 0.001$). The area under curve (AUC) of the receiver operating characteristics for d-dimer was 0.922 (z-value = 12.977, $p < 0.0001$). (95%CI: 0.780–0.885). At a cut-off value of 0.1 ng/L, the D-dimer measurement had a sensitivity of 87.2%, a specificity of 90.9%. **Conclusions.** As a result D-dimer concentrations measured in giardiasis support the probable link between probable pro-thrombotic and inflammatory condition.

Keywords: D-dimer, procoagulation, inflammation, biomarker, giardiasis, dogs (Source: CAB).

RESUMEN

Objetivo. El presente estudio se realizó para medir las concentraciones del dímero D y detectar su valor en la actividad de la enfermedad en perros con giardiasis. Además, otro objetivo fue analizar la correlación entre la excreción de quistes y los niveles de D-dímero a los de perros naturalmente infectados con *Giardia sp.* **Materiales y métodos.** El análisis del dímero D se realizó en tres grupos de perros; (I) 11 perros con giardiasis tratados con secnidazol, (ii) 10 perros con giardiasis, no

tratados como grupo control, luego se compararon con los de (iii) 17 perros sin giardiasis, utilizados para detectar rangos de referencia para el dímero D. Valores como grupo de control. **Resultados.** El rango del D-dímero en perros sanos fue <0.1 mg/L. En perros con giardiasis, las concentraciones de dímero D fueron mayores que las de perros sanos ($p<0.05$) y ($p<0.01$), respectivamente. El nivel medio inicial de dímero D plasmático fue 2.84 ± 0.50 y 2.99 ± 0.61 ng/L en los grupos de control tratados y no tratados. En la evaluación final de seguimiento al día 10 se obtuvieron 0.27 ± 0.50 y 2.14 ± 0.61 ng/L, tratados y no tratados, respectivamente, que fue significativamente menor en el grupo tratado ($p<0.001$). El área bajo curva (AUC) de las características de funcionamiento del receptor para el dímero d fue 0.922 (valor $z = 12.977$, $p<0.0001$). (IC del 95%: 0.780-0.885). Con un valor de corte de 0.1 ng/l, la medida del dímero-D tenía una sensibilidad de 87.2%, una especificidad de 90,9%. Hubo una correlación entre los niveles de D-dímero y los recuentos de quistes logarítmicos. **Conclusiones.** Como resultado, las concentraciones del dímero D medidos en la giardiasis apoyan el probable vínculo entre la probable condición pro-trombótica e inflamatoria.

Palabras clave: D-dímero, procoagulación, inflamación, biomarcador, giardiasis, perros (*Fuente: CAB*).

INTRODUCTION

The understanding immunity and pathogenesis of giardiasis has been notably developing, due to disparity in several investigations persist, remaining lot to be learned (1,2). Different parasites have long been recognized to affect various aspects of their host's pro-inflammatory responses (3-5). Furthermore available evidence (i.e. findings from selected human researches and to those of experimental proof) suggested that *Giardia* sp., are able to modulate host pro-inflammatory response (6, 7). The latter knowledge has to be taken into consideration as giardiasis is frequently detected in relation with a variety of pro-inflammatory gastrointestinal (GI) pathogens. Human patients with chronic assemblage B infection were detected to present duodenal inflammation (6). "In vivo" studies showed that experimental infections with *G. duodenalis* assemblage B were related to post-infectious neutrophil infiltration in ileum or intestinal inflammatory response (8,9). Investigation polarated from human (10,11), and ruminants (12), suggested that some of the *Giardia* infections might be related to eosinophilia; as was also described previously by "in vivo" infections with *Giardia* assemblage B H3 infections (13) or parasite excretory/secretory products (14). Duodenal inflammation (6) as detected by microscopy was detected in human patients post-giardiasis (15). Results from various studies indicated roles of specific pro-inflammatory cytokines in giardiasis (16). Proinflammatory conditions in critically ill hospitalized human caused increased D-dimer levels via cytokine activation of the coagulation cascade and subsequent inhibition of fibrinolysis (17). Contrarily no such relation has been made among D-dimer levels, proinflammatory cytokines and giardiasis.

INTRODUCCIÓN

La comprensión de la inmunidad y la patogénesis de la giardiasis se ha desarrollado notablemente, debido a la disparidad en varias investigaciones persisten, quedando mucho por aprender (1,2). Diferentes parásitos han sido reconocidos por largo tiempo para afectar a varios aspectos de sus respuestas pro-inflamatorias del anfitrión (3-5). Además, las pruebas disponibles (es decir, hallazgos de investigaciones humanas seleccionadas y de pruebas experimentales) sugirieron que *Giardia* sp. son capaces de modular la respuesta pro-inflamatoria del huésped (6, 7). Este último conocimiento tiene que ser tomado en consideración ya que la giardiasis se detecta frecuentemente en relación con una variedad de patógenos gastrointestinales pro-inflamatorios (GI). Los pacientes humanos con infección por el aglutinamiento crónico B fueron detectados para presentar inflamación duodenal (6). Los estudios in vivo demostraron que las infecciones experimentales con *G. duodenalis* ensamblaje B estaban relacionadas con la infiltración post-infecciosa de neutrófilos en el íleon (8). o la respuesta inflamatoria intestinal (9). La investigación polarizada de humanos (10,11) y ruminantes (12), sugirió que algunas de las infecciones de *Giardia* podrían estar relacionadas con la eosinofilia; como también se describió previamente por infecciones in vivo con infecciones por H3 de ensamblaje B de *Giardia* (13) o productos excretorios / secretorios de parásitos (14). La inflamación duodenal (6) detectada por microscopía se detectó en pacientes humanos post-giardiasis (15). Los resultados de diversos estudios indicaron los papeles de las citoquinas pro-inflamatorias específicas en la giardiasis (16). Las condiciones proinflamatorias en pacientes hospitalizados críticamente enfermos causaron un aumento de los niveles de dímero-D a través de la activación de citoquinas de la cascada de coagulación y posterior inhibición de la fibrinólisis (17). Por el contrario, no se ha establecido tal

The elevated incidence of thromboembolic events in Inflammatory Bowel Disease (IBD) seems like having multifactorial etiology, where as the inflammatory process might itself participate (18, 19). Furthermore, a defective or impaired intestinal mucosa barrier function may as well contribute to the procoagulative state, specifically in humans with IBD (20, 21). The pathogenic mechanisms proposed for *Giardia* sp. infections also composed of induction of IBD (22, 23). To this context it may not be unwise to speculate that probable IBD in canine giardiasis might be promoting to a procoagulative state. The alteration of intestinal barrier function in IBD (21), and giardiasis (22-28) may be a cofactor promoting a procoagulative state.

Relevant data strongly suggested the presence of multifactorial post-infectious complications in giardiasis. One area of developing interest in giardiasis is that initiation of delayed immune-mediated pathophysiology during the acute stage of the infection. Furthermore a better knowledge of the conditions responsible for post-infectious manifestations of giardiasis might help explore common pathways leading to this disease to this context, a biochemical parameter, such as D-dimer, would have helped better understanding the relationship between probable inflammation and thrombosis. This may be briefly explained by some selected hypothesis. Given the relationship between D-dimer and C-reactive protein, indicating a connection between inflammation and thrombosis (29), each quartile in which C-reactive protein increased, there was a correlational elevation in D-dimer. The latter correlation suggested that as inflammation progresses, the likelihood of thromboembolism rises (29). Previous studies have investigated the responsible mechanisms in which inflammation might potentiate blood clotting. Inflammatory mediators might cause the expression of tissue factor on monocytes and, probably, endothelium, there by stimulating the coagulation cascade. Inflammation-induced thrombosis has long been recognized, indeed its pathogenesis remains complicated. Complex interactions between inflammation and hemostasis, composed of proinflammatory cytokines, and other relevant mediators might occur. Inflammation elevates procoagulant factors, additionally inhibits natural anticoagulant pathways and fibrinolytic activity, resulting with a thrombotic tendency.

To the present authors' knowledge no such correlation regarding probable thrombosis and inflammation in dogs with giardiasis was detected previously. To verify whether dogs might display a prothrombotic condition, plasma D-dimer was assessed for its value in inflammatory

relación entre los niveles de D-dímero, las citocinas proinflamatorias y la giardiasis.

La elevada incidencia de eventos tromboembólicos en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) parece tener una etiología multifactorial, donde el propio proceso inflamatorio puede participar (18, 19). Además, una función de barrera de la mucosa intestinal defectuosa o alterada puede contribuir también al estado procoagulativo, específicamente en los seres humanos con IBD (20, 21). Los mecanismos patógenos propuestos para *Giardia* sp. infecciones también compuestas por inducción de EII (22, 23). En este contexto, puede no ser imprudente especular que la probable IBD en la giardiasis canina podría ser la promoción de un estado procoagulativo. La alteración de la función de barrera intestinal en la EII (21) y la giardiasis (22-28) puede ser un cofactor que promueve un estado procoagulativo.

Los datos pertinentes sugirieron fuertemente la persistencia de complicaciones multifactoriales post-infecciosas en la giardiasis. Un área de interés en desarrollo en la giardiasis es que la iniciación de la patofisiología mediada por inmunidad retardada durante la fase aguda de la infección. Además, un mejor conocimiento de las condiciones responsables de las manifestaciones post-infecciosas de la giardiasis podría ayudar a explorar las vías comunes que conducen a esta enfermedad. En este contexto, un parámetro bioquímico, como el D-dímero, habría ayudado a comprender mejor la relación entre probable inflamación y trombosis. Esto puede ser explicado brevemente por una hipótesis seleccionada. Dada la relación entre el D-dímero y la proteína C reactiva, lo que indica una conexión entre la inflamación y la trombosis (29), cada cuartil en el que la proteína C reactiva aumentó, hubo una elevación correlacional en D-dímero. Esta última correlación sugiere que a medida que avanza la inflamación, aumenta la probabilidad de tromboembolismo (29). Estudios previos han investigado los mecanismos responsables en los que la inflamación podría potenciar la coagulación de la sangre. Los mediadores inflamatorios pueden causar la expresión del factor tisular sobre los monocitos y, probablemente, el endotelio, estimulando la cascada de la coagulación. La trombosis inducida por la inflamación ha sido reconocida desde hace mucho tiempo, de hecho su patogenia sigue siendo complicada. Pueden ocurrir interacciones complejas entre la inflamación y la hemostasia, compuestas de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores relevantes. La inflamación eleva los factores procoagulantes, además inhibe las vías anticoagulantes naturales y la actividad fibrinolítica, resultando con una tendencia trombótica.

disease activity in dogs with giardiasis. A furthermore another purpose was to analyze correlation between cyst excretion and D-dimer levels to those of dogs naturally infected with *Giardia sp.*

MATERIALS AND METHODS

Demographic data. All clinical records from November 2014 to January 2017 were searched to identify dogs with giardiasis for which Snap Giardia test kit analysis (Figure 1b), microscopical detection and a D-dimer test had been performed. A total of 51 cases were found that solely 25 met the criteria for involvement in the present study. These cases were then classified into groups I, II and III.

Classification of the dogs. Three groups of dogs were studied: group I consisted of 15 dogs naturally infected with giardiasis treated with anti-giardial protocole (secnidazole at a dose of 10 mg/kg at a single oral dose). Group II consisted of 10 dogs naturally infected with giardiasis without any treatment application, left as untreated control. Finally group III (n=17) were composed of those of healthy dogs, without giardiasis, presented for routine health screen and physical examination, without any apparent clinical signs.

Study duration. The study was performed in 10 days duration. Day 0 (D0) was designated as the initial day, prior to a single dose treatment, and Day 10 (D10) was designed as after treatment analysis day.

Laboratory analysis

Fecal Examination. During the allocation period all dogs (Figure 1a showed one of them) were screened twice with a 10 days interval to confirm the presence/absence of *Giardia sp.* cysts (Figure 1f). For an initial diagnosis two native smear was prepared to those of dogs with altered fecal consistency (Figure 1c). This was followed by fecal material mixed with 33% ZnSO₄ solution, added on to centrifuge tubes, which then was consequently spun in centrifuge at 880 x g for 300 seconds, similar to a prior study (30). Following centrifugation, some of the fecal mixture was separated, then were added on a microscope slide containing Lugol iodine, which was covered by a slip. The slide was microscopically examined under 40x power for detecting Giardia cysts by a specialized parasitologist. To those of solely mono infected dogs with *giardiasis* were proven only by microscopical examination was included. Furthermore Giardia antigens in canine feces were tested by use of a rapid enzyme immunoassay for detection of (SNAP® *Giardia* Test, IDEXX, USA), (Figure 1b).

Hasta el presente conocimiento de los autores no se detectó previamente ninguna correlación de este tipo con respecto a la probable trombosis e inflamación en perros con giardiasis. Para verificar si los perros pueden mostrar una condición protrombótica, el D-dímero de plasma se evaluó por su valor en la actividad de la enfermedad inflamatoria en perros con giardiasis. A Otro objetivo fue analizar la correlación entre la excreción de quistes y los niveles de D-dímero a los de perros naturalmente infectados con *Giardia sp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Datos demográficos. Se realizaron búsquedas en todos los registros clínicos de noviembre de 2014 a enero de 2017 para identificar perros con giardiasis para los que se había realizado el análisis del kit de prueba Snap Giardia (Figura 1b), detección microscópica y prueba de dímero D. Se encontró un total de 51 casos en los que sólo 25 cumplieron los criterios de participación en el presente estudio. Estos casos fueron clasificados en los grupos I, II y III.

Clasificación de los perros. Se estudiaron tres grupos de perros: el grupo I consistió en 15 perros naturalmente infectados con giardiasis tratados con protocolo anti-giardial (secnidazol a una dosis de 10 mg/kg en una sola dosis oral). El grupo II consistió en 10 perros naturalmente infectados con *Giardia sp.*, sin aplicación de tratamiento alguna, dejados como control no tratado. Finalmente el grupo III (n=17) estuvo compuesto por perros sanos, sin giardiasis, presentados para exámenes de rutina de salud y examen físico, sin signos clínicos evidentes.

Duración del estudio. El estudio se realizó en una duración de 10 días. El Día 0 (D0) fue designado como el día inicial, antes de un tratamiento de dosis única, y el Día 10 (D10) fue diseñado como después del día del análisis del tratamiento.

Análisis de laboratorio

Examen Fecal. Durante el período de asignación, todos los perros (Figura 1a mostraron uno de ellos) se examinaron dos veces con un intervalo de 10 días para confirmar la presencia / ausencia de *Giardia sp.*, quistes (Figura 1f). Para un diagnóstico inicial se preparó dos frotis nativos a los de perros con alteración de la consistencia fecal (Figura 1c). A esto siguió un material fecal mezclado con una solución de ZnSO₄ al 33%, añadido a los tubos de centrifuga, que a continuación se centrifugó a 880 x g por 300 segundos, similar a un estudio previo (30). Después de la centrifugación, se separó parte

Methodology for point of care D-dimer analysis. Two milliliters of sera samples were withdrawn from the vena cephalica of each dog into plain tubes without anticoagulant. Circulating D-dimer concentration was analyzed by use of the Point-of-Care fluorescent immunoassay (Figure 1d). The present author's private analytic room was specialized and utilized for the Wondfo Finecare FIA meter (FIAM) Fluorescence Immunoassay Rapid Quantitative Test, manufactured by; Guangzhou Wondfo Biotech Co. Ltd.; imported by RDA Grup, Turkey) which is automated. The use of FIAM D-dimer analyzer (Figure 1d, e) has been validated in veterinary practice in the present authors experience since 2014.

Briefly, the FIAM utilizes a Fluorescence Immunoassay methodology, in which 10 μ l of undiluted serum is required. A human anti-D-dimer monoclonal antibody was implanted into the well on a supplied test cartridge via the manufacturer. Obtained sera sample were then added; along with buffer solution, which were then shaken for half a minute. Out of those mixtures, 75 μ L was obtained, put on to the reading stribes and finally forwarded to the analyzer. The required duration for reading was 180 seconds, also composed of incubation. FIAM D-dimer analyzer is currently able to read ranges between 0.1-10 mg/L. Methodology was adapted with in the manufacturer directions. Elevated D-dimer levels was set as (>0.1 mg/L).

Statistical Analysis. Descriptive statistics of the patient and control groups were obtained as follows Unpaired Two-way analysis of variance was performed to determine the differences between groups. ROC (reciever operator characteristics curve) analysis method was used for predicting cutt-off values among D-dimer levels. Results were deemed statistically significant at $p < 0.05$ with 95% confidence interval. Regarding cyst counts on the basis of the number of 0 versus, 0 plus in dogs with giardiasis defining measurement of youden ROC analysis index >0.09 cutoff value was determined. The average data for performing two-way analysis of variance between groups, and the number of cysts were subjected to log transformation of the time domain. Charts were presented as the median number of cysts.

RESULTS

D-dimer levels in dogs with giardiasis.

Median D-dimer levels to those of dogs with giardiasis before (day 0) and after (day 10) treatment. Secnidazol treatment and untreated control groups were involved. Boxplots of median



Figure 1: a) A dog with giardiasis, b) Snap Giardia Test kit positive, c) fecal consistency, d) Finecare Immunofluorescent assay for circulating D-dimer levels, e) D-dimer analyte report [in this case above the reference range – detected within healthy dogs as <0.1 mg/dL-- as 5.5 mg/dL], f) appearance of *Giardia* sp., cyst at microscopic examination.

de la mezcla fecal y luego se añadieron en una lámina de microscopio que contenía yodo Lugol, que se cubrió con un deslizamiento. La diapositiva fue examinada microscópicamente bajo una potencia de 40x para detectar quistes de *Giardia* por un parasitólogo especializado. A los de los únicos perros mono infectados con giardiasis se demostró sólo mediante examen microscópico se incluyó. Además, el antígeno *Giardia* en heces caninas se ensayó mediante el uso de un inmunoensayo enzimático rápido para la detección de (SNAP® *Giardia* Test, IDEXX, USA) (Figura 1b).

Metodología para el análisis del D-dímero en el punto de atención.

Se extrajeron dos mililitros de muestras de suero de la vena cefalica de cada perro en tubos lisos sin anticoagulante. La concentración de D-dímero en circulación se analizó mediante el uso del inmunoensayo fluorescente Point-of-Care (Figura 1d). La sala

D-dimer levels in dogs with giardiasis before (day 0) and after (day 10) treatment were shown in Figure 2 (Table 1).

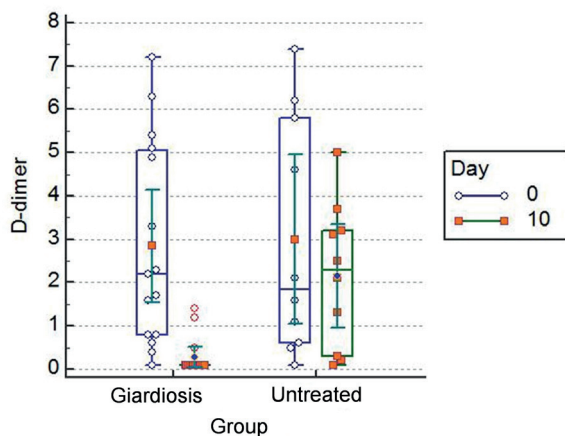


Figure 2: Boxplots of median D-dimer levels in dogs with giardiasis before (day 0) and after (day10) treatment. Secnidazol treatment and untreated control groups were involved. Bars Z median values; Whiskers Z smallest and largest values excluding extremes; top of box 75th percentile; bottom of box 25th percentile). *Statistically significant difference.

Table 1. The interactions between log cyst count and circulating D-dimer levels before (day 0) and after (day 10) treatment. Log cyst count per gram of feces (mean±SE, min-max at 95%CI) were compared to those D-dimer levels at 95% confidence interval. The effects of group, time and group x time were analyzed. Effects (mean±SE, min-max at 95%CI).

Effect	Factor	Log Cyst (/g) Mean± SE (95% CI)	d-dimer (ng/L) Mean± SE (95% CI)	
Group x Time Interaction	Untreated	0	5.35±0.27 (4.81-5.88)	2.99±0.61 (1.76-4.22)
		10	5.18±0.26 (4.64-5.71)	2.14±0.61 (0.91-3.37)
	Treated	0	5.28±0.21 (4.85-5.72)	2.84±0.50 (1.84-3.85)
		10	0.85±0.21 (0.42-1.30)	0.27±0.50 (0.72-1.28)
p		<0.001	0.13	

ROC curves analyses (Figure 3) were used to select D-dimer cutoff points of below 0.1 mg/L. The FIA meter assay had high specificity (90.9 %) at the 0.09 mg/L cutoff and relatively high sensitivity (87.2%) at the 0.09 mg/L cutoff, as shown in Figure 3 (Table 2).

analítica privada del presentador se especializó y utilizó para la Prueba Cuantitativa Rápida de Inmunoensayo de Fluorescencia FIAM (FIAM), fabricada por; Guangzhou Wondfo Biotech Co. Ltd.; importado por Atasan Atateknik Ltd. Sti, Turquía) que es automatizado. El uso del analizador FIAM D-dimer (Figura 1d, e) ha sido validado en la práctica veterinaria en la experiencia de los autores actuales desde 2014.

Brevemente, la FIAM utiliza una metodología de inmunoensayo de fluorescencia, en la que se requieren diez µl de suero no diluido. Se implantó un anticuerpo monoclonal anti-D-dímero humano en el pocillo en un cartucho de prueba suministrado a través del fabricante. A continuación se añadieron muestras de suero obtenidas; junto con solución tampón, que después se agitó durante medio minuto. De esa mezcla, se obtuvieron 75 µL, se pusieron en los patrones de lectura y finalmente se enviaron al analizador. La duración requerida para la lectura fue de 180 segundos, también compuesto de incubación. El analizador D-dimer de FIAM es actualmente capaz de leer rangos entre 0.1-10 mg/L. La metodología se adaptó con las instrucciones del fabricante. Los niveles elevados de dímero D se fijaron como (> 0.1 mg/L).

Análisis estadístico. La estadística descriptiva del paciente y los grupos de control se obtuvieron de la siguiente manera. Se realizaron análisis de varianza de dos vías sin pareja para determinar las diferencias entre los grupos. Se utilizó el método de análisis ROC (curva de características del operador receptor) para predecir valores de corte entre los niveles de D-dímero. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a p<0.05 con intervalo de confianza del 95%. En cuanto a los recuentos de quistes sobre la base del número de 0 versus, 0 más en perros con giardiasis definiendo la medición de youden ROC índice de análisis> 0.09 cutoff valor se determinó. Los datos promedio para realizar el análisis de varianza de dos vías entre los grupos, y el número de quistes fueron sometidos a la transformación logarítmica del dominio del tiempo. Las gráficas se presentaron como el número medio de quistes.

RESULTADOS

D-dímero en perros con giardiasis. Mediana de los niveles de dímero D a los de los perros con giardiasis antes (día 0) y después (día10) de tratamiento. El tratamiento con secnidazol y los grupos de control no tratados estuvieron involucrados. En la Figura 2 se mostraron los lotes de los niveles medianos de dímero D en perros con giardiasis antes (día 0) y después (día10) (Tabla 1).

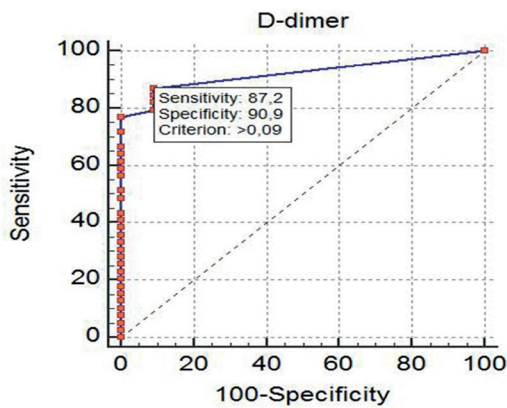


Figure 3: Receiver operating characteristics (ROC) curve for d-dimer. The area under curve (AUC) of the receiver operating characteristics for d-dimer was 0.922 (z-value=12.977, p<0.0001). The x-axis defines the value 100 – specificity, whereas the y-axis defines the sensitivity in a range from 0 to 100%.

NOTE: * Area Under Curve (AUC), the following is interpreted:

- 90-1.00 = excellent
- 80-.90 = good
- 70-.80 = medium
- 60-.70 = weak
- 50-.60 = failed

Therefore, the AUC value of 0.922 obtained in this test can be considered excellent.

*The greater the positive portion of Likelihoodratio, the smaller the negative portion, the higher the reliability. Therefore, 9.59 + LR and 0.14-LR are quite good results.

*Treshold value means that animals with values greater than 0.09 ng/L are likely to be sick.

Correlation between D-dimer levels and logarithmic cyst counts were shown in figure 4.

Se usaron análisis de curvas ROC (Figura 3) para seleccionar puntos de corte de dímero D por debajo de 0.1 mg/L. El ensayo con medidor de FIA tenía alta especificidad (90.9%) en el corte de 0.09 mg/L y sensibilidad relativamente alta (87.2%) en el corte de 0.09 mg/L, como se muestra en la Figura 3 (Tabla 2).

NOTA: * Área bajo curva (AUC), se interpreta lo siguiente:

- 90-1.00 = excelente
- 80-.90 = bueno
- 70-.80 = medio
- 60-.70 = débil
- 50-.60 = fallado

Por lo tanto, el valor AUC de 0.922 obtenido en esta prueba puede considerarse excelente.

* Cuanto mayor sea la porción positiva de Likelihoodratio, menor será la porción negativa, mayor será la fiabilidad. Por lo tanto, 9.59 + LR y 0.14-LR son muy buenos resultados.

* Valor umbral significa que los animales con valores superiores a 0.09 ng/L pueden estar enfermos.

La correlación entre los niveles de D-dímero y los recuentos de quistes logarítmicos se muestra en la Figura 4.

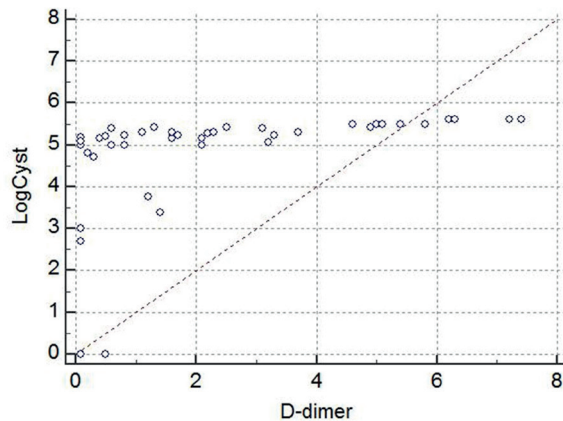


Figure 4: Correlation between D-dimer levels and logarythmic cyst counts

Table 2. The sensitivity and specificity of d-dimer determined by fluorescent immunoassay for cases with giardiasis.

Threshold Value ¹ (ng/l)	Sensitivity ² (95% CI)	Specificity ³ (95% CI)	Likelihoodratio (95% CI)		Predictivevalue (95% CI)		P-value
			Positive ⁴	Negative ⁵	Positive ⁶	Negative ⁷	
>0.09	87.18 (72.6-95.7)	90.91 (58.7-99.8)	9.59 (8.7-9.9)	0.14 (0.1-0.2)	97.16 (85.1-99.9)	66.38 (38.2-87.9)	<0.01

¹ Threshold value for d-dimer determined by the receiver operating characteristic (ROC) analysis.

² Sensitivity: Probability that a test result will be positive when 0thedisease is present (truepositive rate).

³ Specificity: Probability that a test result will be negativewhenthedisease is not present (truenegative rate).

⁴ Positivelikelihoodratio: Ratio between the probability of a positive test result given the presence of the disease and the probability of a positive test result given the absence of the disease.

⁵ Negative likelihood ratio: Ratio between the probability of a negative test result given the presence of the diseaseand the probability of a negative test result given the absence of the disease.

⁶ Positive predictive value: Probability that the disease is present when the test is positive.

⁷ Negative predictive value: Probability that the disease is not present when the test is negative

DISCUSSION

Giardia infections cause acute or chronic diarrhea, dehydration, abdominal disturbance and weight loss. Despite suffering from Giardia's disease, the underlying pathophysiological characteristics of the intestine and the disturbance in Giardia's disease are not fully understood. Giardiasis does not spread to other parts of the gastrointestinal tract, such as blood, but is limited to the lumen of the small intestine.

Interestingly, epithelial abnormalities responsible for intestinal malabsorption and responsible for diarrhea in giardiasis share similarities with those observed in other enteric disorders such as bacterial enteritis, small intestine bacterial overgrowth and chronic food allergies. It is understood that the pathology of the Giardia has emerged. These include disruption of the epithelial barrier, defects at the epithelial brush border, secretion of chloride ions, and hypermotility of the intestinal smooth muscles. The role of parasite virulence factors and host immune responses in these mechanisms has begun to be clarified, but much remains to be understood. The understanding immunity and pathogenesis of giardiasis has been notably developing, due to disparity in several investigations persist, remaining lot to be learned (1, 2). Different parasites have long been recognized to affect various aspects of their host's pro-inflammatory responses (3-5). Furthermore available evidence (i.e. findings from selected human researches and to those of experimental proof) suggested that *Giardia* sp., are able to modulate host pro-inflammatory response (6, 7). The latter knowledge has to be taken into consideration as giardiasis is frequently detected in relation with a variety of pro-inflammatory gastrointestinal (GI) pathogens. Proinflammatory cytokines are generally released by activated macrophages and are important in the inflammatory response. It has been suggested that D-dimer activation, which is induced by the activation of clotting factors due to the activation of inflammatory processes in this disease, might briefly support our findings as a preliminary marker. In this study, we demonstrated by statistical analysis that d-dimer concentrations, which are considered as proinflammatory markers, are important and specific in this disease by stimulating inflammatory processes after arithmetic and geometric averages of cyst counts before and after treatment. The interactions between log cyst count and circulating D-dimer levels before (day 0) and after (day 10) treatment was interesting. Log cyst count per gram of feces (mean±SE, min-max at 95%CI) was compared to those of D-dimer levels at 95% confidence

DISCUSIÓN

Las infecciones por Giardia causan diarrea aguda o crónica, deshidratación, alteración abdominal y pérdida de peso. A pesar del sufrimiento de la enfermedad de Giardia, las características fisiopatológicas subyacentes del intestino La perturbación en la enfermedad de Giardia no se entiende completamente.

La giardiasis no se propaga a otras partes del tracto gastrointestinal, como la sangre, sino que se limita a la luz del intestino delgado.

Curiosamente, las anomalías epiteliales responsables de la malabsorción intestinal y responsables de la diarrea en la giardiasis comparten similitudes con las observadas en otros trastornos entéricos como la enteritis bacteriana, el intestino delgado bacteriano sobre el crecimiento y las alergias alimentarias crónicas. Se entiende que la patología de la Giardia ha surgido. Estos incluyen la disrupción de la barrera epitelial, defectos en el borde cepillado epitelial, secreción de iones cloruro e hipermotilidad de los músculos lisos intestinales. El papel de los factores de virulencia del parásito y las respuestas inmunes del hospedero en estos mecanismos ha comenzado a aclararse, pero aún queda mucho por entender. La comprensión de la inmunidad y la patogénesis de la giardiasis se ha desarrollado notablemente, debido a la disparidad en varias investigaciones persisten, quedando mucho por aprender (1,2). Desde hace mucho tiempo se ha reconocido que diferentes parásitos afectan a varios aspectos de las respuestas proinflamatorias de su hospedero (3-5). Además, las pruebas disponibles (es decir, hallazgos de investigaciones humanas seleccionadas y de pruebas experimentales) sugirieron que *Giardia* sp. son capaces de modular la respuesta pro-inflamatoria del hospedero (6,7). Este último conocimiento tiene que ser tomado en consideración ya que la giardiasis se detecta frecuentemente en relación con una variedad de patógenos gastrointestinales pro-inflamatorios (GI). Las citoquinas proinflamatorias son liberadas generalmente por los macrófagos activados y son importantes en la respuesta inflamatoria. Se ha sugerido que la activación del dímero D, que es inducida por la activación de factores de coagulación debido a la activación de procesos inflamatorios en esta enfermedad, podría apoyar brevemente nuestros hallazgos como un marcador preliminar. En este estudio se demostró mediante análisis estadístico que las concentraciones de d-dímero, que se consideran marcadores proinflamatorios, son importantes y específicas en esta enfermedad mediante la estimulación de procesos inflamatorios después de promedios aritméticos y geométricos de conteo de quistes antes y después del tratamiento. Las interacciones entre el recuento de quistes

interval. The D-dimer range in healthy dogs was <0.1 mg/L. In dogs with giardiasis, the D-dimer concentrations were greater than those of healthy dogs ($p<0.05$) and ($p<0.01$), respectively. The mean initial plasma D-dimer level was 2.84 ± 0.50 and 2.99 ± 0.61 ng/L in treated and untreated control groups. At the final follow-up evaluation on day 10 was 0.27 ± 0.50 and 2.14 ± 0.61 ng/L, in treated and untreated control groups, respectively, which was significantly lower in treated group ($p<0.001$). The area under curve (AUC) of the receiver operating characteristics for d-dimer was 0.922 (z-value =12.977, $p<0.0001$). (95%CI: 0.780–0.885). At a cut-off value of 0.1 ng/L, the D-dimer measurement had a sensitivity of 87.2%, a specificity of 90.9%. There was a correlation between D-dimer levels and logarithmic cyst counts.

Biochemical markers are now being closely scrutinized for detecting disease activity. D-dimer, as a valuable and non-invasive thrombotic predictor, has currently been investigated for supporting a connection between thrombosis and inflammation along with other parameters. As a result, these D-dimer concentrations measured in this disease were concluded to be a pre-biomarker in the diagnosis of these and similar diseases. It should not be unwise to draw preliminary conclusions that D-dimer levels support the link between probable thrombosis and inflammation, namely low grade.

Acknowledgements

The present study was not supported by any financial entrepreneur and self funded by researcher group.

de registro y los niveles de D-dímero circulante antes (día 0) y después (día 10) de tratamiento. Se comparó el recuento de quistes de registro por gramo de heces (media \pm SE, min-máx. A IC del 95%) con los niveles de D-dímero con un intervalo de confianza del 95%. El rango de D-dímero en perros sanos fue <0.1 mg/L. En perros con giardiasis, las concentraciones de dímero D fueron mayores que las de perros sanos ($p<0.05$) y ($p<0.01$), respectivamente. El nivel inicial medio de D-dímero de plasma fue de 2.84 ± 0.50 y 2.99 ± 0.61 ng/L en los grupos de control tratados y no tratados. En la evaluación final de seguimiento al día 10 se obtuvieron 0.27 ± 0.50 y 2.14 ± 0.61 ng/L, tratados y no tratados, respectivamente, que fue significativamente menor en el grupo tratado ($p<0.001$). El área bajo curva (AUC) de las características de funcionamiento del receptor para el dímero d fue 0.922 (valor $z=12.977$, $p<0.0001$). (IC del 95%: 0.780-0.885). Con un valor de corte de 0.1 ng/L, la medida del dímero D tenía una sensibilidad de 87.2%, una especificidad de 90.9%. Hubo una correlación entre los niveles de D-dímero y los recuentos de quistes logarítmicos.

Los marcadores bioquímicos están siendo escudriñados de cerca para detectar la actividad de la enfermedad. D-dímero, como predictor trombotico valioso y no invasivo, se ha investigado actualmente para apoyar una conexión entre la trombosis y la inflamación junto con otros parámetros. Como resultado, estas concentraciones de D-dímero medidas en esta enfermedad se concluyeron como un pre-biomarcador en el diagnóstico de estas enfermedades y similares. No debe ser imprudente sacar conclusiones preliminares de que los niveles de D-dímero apoyan el vínculo entre la probable trombosis y la inflamación, es decir, bajo grado.

Agradecimientos

El presente estudio no fue apoyado por ningún entrepreneur financiero y auto financiado por el grupo de investigadores.

REFERENCES

1. Bartelt LA, Sartor RB. Advances in understanding *Giardia*: Determinants and mechanisms of chronic sequelae. F1000Prime Rep. 2015; 7:62.
2. Buret A, Amat C, Manko A, Beatty J, Halliez MM, Bhargava A, et al. *Giardia duodenalis*: New research developments in pathophysiology, pathogenesis, and virulence factors. Curr Trop Med Rep. 2015; 2(3):110–118.
3. Maizels RM. Parasite immunomodulation and polymorphisms of the immune system. J Biol. 2009; 8:62.
4. McSorley HJ, Maizels RM. Helminth infections and host immune regulation. Clin Microbiol Rev. 2012; 25:585–608.

5. Kissoon-Singh V, Moreau F, Trusevych E, Chadee K. *Entamoeba histolytica* exacerbates epithelial tight junction permeability and proinflammatory responses in Muc2(-/-) mice. *Am J Pathol.* 2013; 182:852-865.
6. Hanevik K, Hausken T, Morken MH, Strand EA, Mørch K, Coll P, Helgeland L, Langeland N. Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. *J Infect.* 2007; 55(6):524-530.
7. Sara D, Christine L, Kim N, Raymond D, Elaine H, Lars E. Novel model of colitis induced by a non-inflammatory small bowel infection. *J Immunol* 2011; 186: (1 Supplement) 166.10.
8. Chen TL, Chen S, Wu HW, Lee TC, Lu YZ, Wu LL, et al.. Persistent gut barrier damage and commensal bacterial influx following eradication of *Giardia* infection in mice. *Gut Pathog.* 2013; 5:26.
9. Benere E, Van Assche T, Van Ginneken C, Peulen O, Cos P, Maes L. Intestinal growth and pathology of *Giardia duodenalis* assemblage subtype a(i), a(ii), b and e in the gerbil model. *Parasitol.* 2012; 139:424-433.
10. Dos Santos JI, Vituri Cde L. Some hematimetric findings in human *Giardia lamblia* infection. *Rev Inst Med Trop.* 1996; 38:91-95.
11. Koot BG, Kate FJ, Juffrie M, Rosalina I, Taminiau JJ, Benninga MA. Does *Giardia lamblia* cause villous atrophy in children?: A retrospective cohort study of the histological abnormalities in giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009; 49:304-308.
12. Aloisio F, Filippini G, Antenucci P, Lepri E, Pezzotti G, Caccio SM, Pozio E. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage b. *Parasitol.* 2006; 142:154-158.
13. Bartelt LA, Roche J, Kolling G, Bolick D, Noronha F, Naylor C, Hoffman P, Warren C, Singer S, Guerrant R. Persistent *Giardia lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. *J Clin Investig.* 2013; 123:2672-2684.
14. Jimenez JC, Fontaine J, Grzych JM, Dei-Cas E, Capron M. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; 11:152-160.
15. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1824:68-88.
16. Zareie M, McKay DM, Kovarik GG, Perdue MH. Monocyte/macrophages evoke epithelial dysfunction: Indirect role of tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol.* 1998; 275:932-939.
17. Davison AM, Thomson D, Robson JS. Intravascular coagulation complicating influenza A virus infection. *Br Med J.* 1973; 1:654-655.
18. Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R, et al. Low vitamin B6 plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants. *Am J Gastroenter.* 2003; 98(1):112-117.
19. Saibeni S, Spina L, Vecchi M. Exploring the relationships between inflammatory response and coagulation cascade in inflammatory bowel disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2004; 8(5):205-208.
20. Pastorelli L, Salvo CD, Mercado J R, Vecchi M, Pizarro TT. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics. *Front Immunol.* 2013; 4:280.
21. Pastorelli L, Dozio E, Francesca LP, Anzoletti MB, Vianello E, Munizio N, et al. Procoagulatory state in inflammatory bowel diseases is promoted by impaired intestinal barrier function. *Gastroenterol Res Pract.* 2015; Article ID 189341.
22. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8:413-422.
23. Buret AG. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite.* 2008; 15:261-265.
24. Buret AG, Mitchell K, Muench DG, Scott KG. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitol.* 2002; 125:11-19.

25. Cotton JA, Beatty JK, Buret AG. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol.* 2011; 41:925-933.
26. Teoh DA, Kamieniecki D, Pang G, Buret AG. *Giardia lamblia* rearranges F-actin and alpha-actinin in human colonic and duodenal monolayers and reduces transepithelial electrical resistance. *J Parasitol.* 2000; 86:800-806.
27. Troeger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, Jelinek T, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial trans- port and barrier function in human duodenum. *Gut.* 2007; 56:328-335.
28. Scott KG, Meddings JB, Kirk DR, Lees-Miller SP, Buret AG. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterol.* 2002; 123:1179-1190.
29. Yuan SM, Shi YH, Wang JJ, Lü FQ, Gao S. Elevated plasma D-dimer and hypersensitive C-reactive protein levels may indicate aortic disorders. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2011, 26(4):573-81.
30. Ural DA, Ayan A, Aysul A, Balıkçı C, Ural K. Secnidazol treatment to improve milk yield in sheep with giardiasis. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg.* 2014, 9(2):74-82.