

Single dose secnidazole treatment efficiency against naturally occurring *Giardia duodenalis* infection in calves

Eficacia del tratamiento con secnidazol en dosis única contra la infección natural de *Giardia duodenalis* en terneros

Göktuğ Toros¹ Ph.D, Kerem Ural^{1*} Ph.D.

¹University of Adnan Menderes, Faculty of Veterinary, Department of Internal Medicine, Aydin, Turkey

*Correspondence: uralkerem@gmail.com

Received: February 2017; Accepted: June 2017.

ABSTRACT

Objective. In the present study the aim was to establish the efficacy of 30 mg/kg single dose secnidazol in calves naturally infected with *Giardia duodenalis*. **Materials and methods.** In an attempt to perform original study a total of 18 calves, from various breed, age and of both sexes were enrolled. Diagnosis was based on detection of trophozoite and/or cysts on fecal flotation among calves naturally infected with *G. duodenalis*, besides by use of rapid diagnostic test kits working with solid phase immunochromatographic principles and β -giardin nested- Polymerase Chain Reaction application. Cyst count per gram of feces were performed among days 0, 3, 7 and 10 in all cases. On days 0 and 10 hematological (WBC, RBC, HCT, MCHC, PLT) and serum biochemical (ALT, AST, creatinine, urea) values were determined. **Results.** Two different groups of calves composed of secnidazole group (n:9) and control group (n:9) were enrolled. Among calves enrolled in treatment group secnidazole was administered at a single dosage of 30 mg/kg perorally on day 0, whereas control group were left without any active ingredient. Cyst count per gram feces, hematological and serum biochemical values were analyzed among groups and intragroup comparisons. *Giardia duodenalis* assemblage A3 was detected in all 18 calves. On days 3, 7, and 10 there was significant ($p < 0.001$) reduction in cyst excretion; whereas evaluation of mean geometric cyst excretion revealed 100% reduction on days 7 and 10. Among two group statistical analysis of hematological and serum biochemical variables revealed no statistical significance on days 0 and 10. **Conclusions.** In conclusion secnidazole at a single dose of 30 mg/kg might be practically applicable, reasonably priced, safety, completely effective and causing rapid recovery treatment protocols for therapy of calves with Giardiasis.

Keywords: *Giardia duodenalis*, calf, β -giardin nested PCR, secnidazol, treatment (Source: CAB).

RESUMEN

Objetivo. En el presente estudio se pretendía establecer la eficacia de 30 mg / kg de dosis única de secnidazol en terneros naturalmente infectados con *Giardia duodenalis*. **Materiales y métodos.** En un intento de realizar un estudio original, se matricularon 18 terneros, de distintas raza, edad y de ambos sexos. El diagnóstico se basó en la identificación de trofozoítos y /o quistes en la flotación fecal entre terneros naturalmente infectados con *G. duodenalis*, además de utilizar kits de diagnóstico rápido que funcionan con principios inmunocromatográficos en fase sólida y aplicación de Reacción en Cadena de Polimerasa anidada con β -giardina. El conteo de quistes por gramo de heces se realizó entre los días 0, 3, 7 y 10 en todos los casos. En los días 0 y 10 se determinaron los valores hematológicos (WBC,

RBC, HCT, MCHC, PLT) y suero bioquímico (ALT, AST, creatinina, urea). **Resultados.** Se inscribieron dos grupos diferentes de terneros tratados con secnidazol (n: 9) y el grupo control (n: 9). Entre los becerros incluidos en el grupo de tratamiento se administró secnidazol en una dosis única de 30 mg/kg oralmente al día 0, mientras que el grupo de control se dejó sin ningún ingrediente activo. Se analizó el conteo de quistes por gramo de heces, valores hematológicos y bioquímicos de suero entre grupos y comparaciones intragrupo. *Giardia duodenalis* ensamblaje A3 se identificó en los 18 terneros. En los días 3, 7 y 10 hubo una reducción significativa ($p < 0.001$) en la excreción de quistes; Mientras que la evaluación de la excreción geométrica promedio de quistes reveló una reducción del 100% en los días 7 y 10. Entre los dos grupos de análisis estadístico de las variables hematológicas y sero-bioquímicas no reveló significación estadística en los días 0 y 10. **Conclusión.** En conclusión secnidazol en una dosis única de 30 mg/kg podría ser prácticamente aplicable, a un precio razonable, la seguridad, completamente eficaz y causando un tratamiento de recuperación rápida protocolo para la terapia de terneros con Giardiasis.

Palabras clave: *Giardia duodenalis*, calf, β -giardin nested PCR, secnidazol, tratamiento (Fuente: CAB).

INTRODUCTION

The protozoan *Giardia duodenalis* (syn. *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*) has emerged as a significant parasite of livestock (1). Several previous reports indicated giardiasis in calves with changing prevalences and molecular analysis (2-11). Zoonotic *Giardia duodenalis* assemblage subgenotype A has been reported in up to 20% of either pre-weaned calves and post-weaned calves (12-15).

Even though livestock have emerged as a significant host for giardiasis, relatively few researches analyzed the efficacy of treatment in calves. Traditional anti-giardial armamentarium is composed of nitroimidazole compounds as first choice for many years (16,17) on the field and researches in veterinary Medicine. Given the latter compounds partial efficacy, cases refractory to therapy applications are widely observed (18). Given metronidazole as the most significant member of the nitroimidazole class available for therapy of giardiasis, the U.S. Food and Drug Administration has never approved it and resistance to metronidazole has been induced in vitro (19). It should not be unwise to draw suggestion that there is a necessity for establishing a new therapy choice in small ruminants. Thus in the present study, the purpose was to detect the efficacy of 30 mg/kg single dose secnidazol in calves naturally infected with *Giardia duodenalis*.

MATERIALS AND METHODS

Study design and calves population. The present field study was enrolled among 18 calves from two different farms, to those of special dairy farming operated as single/individual enterprise located in Aydın. The calves had a history of acute diarrhoea, of 2 different breeds (4 Simmental

INTRODUCCION

El protozoario *Giardia duodenalis* (*Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*) ha emergido como un importante parásito del ganado (1). Varios informes previos indicaron giardiasis en terneros con prevalencias cambiantes y análisis molecular (2-11). Se ha reportado el subtipo A del zoó- nito *Giardia duodenalis* en hasta 20% de terneros pre-destetados y terneros pos-destetados (12-15).

Aunque el ganado ha surgido como un hospedero significativo para la giardiasis, existe poca información con relación a la eficacia del tratamiento en terneros. El tradicional armamentarium anti-giardial se compone de compuestos de nitroimidazol como primera opción por muchos años (16,17) en el campo de investigación en medicina veterinaria. Dada la eficacia parcial de estos últimos compuestos, los casos refractarios a las aplicaciones terapéuticas son ampliamente observados (18). Dado metronidazol como el miembro más significativo de la clase de nitroimidazol disponible para el tratamiento de la giardiasis, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos nunca la ha aprobado y la resistencia al metronidazol ha sido inducida in vitro (19). No debe ser imprudente sugerir que existe la necesidad de establecer una nueva opción terapéutica en los pequeños rumiantes. Así, en el presente estudio, el propósito fue identificar la eficacia de 30 mg/kg de dosis única de secnidazol en terneros naturalmente infectados con *Giardia duodenalis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio y población de terneros. El presente estudio de campo se inscribió entre 18 terneros pertenecientes a diferentes fincas, a los de la granja lechera especial operado como una sola empresa / individual ubicada en Aydın.

and other 14 Holstein calves) of both sexes, at 20 to 75 days of age. The study protocol was approved by the institutional laboratory animals ethics committee of Adnan Menderes University HADYEK (with no:64583101/2014/119 and date 29/08/2014). Informed written consent was obtained from owners resided on the farms prior to initiation of the study. Necessary ethical guidelines were taken into consideration. Enrolled calves with naturally occurring giardiasis (n=18) were randomly (by coin toss) assigned into 1 of the 2 groups, as follows (Table 1).

Table 1. Group demographics enrolled in the present study.

Control group (n=9)	placebo
	Secnidazole*
Treatment group (n=9)	(30 mg/kg, Flagentyl® 500 mg tblt., Eczacıbasi, Turkey)

Both group of calves, were housed in separate boxes for preventing cross-contamination during the study. At the beginning of the study on day 0, the individual boxes where the calves were kept, were disinfected with a quaternary ammonium product. All calves were clinically examined within necessary laboratory analysis. All calves initially were observed for the presence of giardiasis, by ZnSO₄ flotation. Due to ethical concerns, only 9 calves were served as controls. Following completion of the study, all positive control calves were also treated with secnidazol.

Laboratory analysis

Haematological and serum biochemical analysis. Among aforementioned on days 0 and 10 hematological [(White blood cell (WBC), red blood cell (RBC), packed cell volume (HCT), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet (PLT)] and serum biochemical (ALT, AST, creatinine, urea) values were determined in an attempt to diagnose the hematological alterations during giardiasis by use of Abacus junior Vet 5 hematology cell counter and Samsung biochemistry analyzer, respectively. For his purpose a total 10 ml of blood was withdrawn from jugular vein from each calf enrolled and immediately forwarded to the lab.

Fecal Examination. During the allocation period (10 days) all calves were screened on days 3, 7, and 10. in an attempt to screen the presence/absence of *Giardia sp.* cysts. Initial day, before any drug administration, was designated as day 0 (D0), whereas D10 was denoted as the end of study. In each calf at least 2 native smear was used, in which fecal material was thoroughly mixed WITH 33% ZnSO₄ solution

Los terneros tenían antecedentes de diarrea aguda, de 2 razas diferentes (4 Simmental y otros 14 terneros Holstein) de ambos sexos, de 20 a 75 días de edad. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética de animales de laboratorio institucional de la Universidad Adnan Menderes HADYEK (con no: 64583101/2014/119 y fecha 29/08/2014). Se obtuvo el consentimiento por escrito de los propietarios residentes en las fincas antes de iniciar el estudio.

Los becerros con giardiasis natural (n=18) fueron asignados aleatoriamente a uno de los grupos, en el que 9 terneros se dividieron por grupos por lanzamiento de monedas. Las pautas éticas para la inscripción en los grupos. El primer grupo compuesto por terneros tratados con una sola dosis de 30 mg / kg de secnidazol (Flagentyl® 500 mg tblt., Eczacıbasi, Turquía) y el resto de terneros; II. Grupo izquierdo como control, y placebo (se administró el mismo volumen de agua). Al principio se desinfectaron las cajas individuales de los terneros con un producto que contenía amonio cuaternario. Ambos grupos de terneros, residían en cajas individuales que tenían instalaciones separadas para prevenir la contaminación cruzada durante el estudio. Todos los terneros fueron sometidos a examen clínico dentro de los análisis de laboratorio necesarios. Todos los terneros fueron inicialmente observados por la presencia de giardiasis, por flotación de ZnSO₄. Teniendo en cuenta las preocupaciones éticas, sólo 9 terneros fueron servidos como controles. Después de completar el estudio, todos los terneros de control positivo también fueron tratados con secnidazol en la misma dosis.

Análisis de laboratorio

Análisis hematológico y bioquímico sérico.

Los días 0 y 10 hematológicos [(glóbulos blancos (WBC), glóbulos rojos (RBC), volumen de células empaquetadas (HCT), concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC), plaquetas (PLT)] y suero bioquímico (ALT, AST, creatinina, urea) se determinaron los valores en un intento de diagnosticar las alteraciones hematológicas durante la giardiasis mediante el uso del contador de células hematológicas Abacus junior Vet 5 y el analizador bioquímico Samsung, respectivamente. Para su propósito, se extrajeron 10 ml de sangre de la vena yugular de cada uno ternero inscrito e inmediatamente reenviado al laboratorio.

Examen Fecal. Durante el período de asignación (10 días) todos los terneros fueron examinados en los días 3, 7 y 10. en un intento de detectar la presencia / ausencia de *Giardia sp.* Quistes El día inicial, antes de cualquier administración

then were transposed on to centrifuge tubes. Consequently, spinning in centrifuge [at 880 x g for 300 seconds] was achieved. Afterwards, selected and small portion of the fecal mixture was obtained, which then were transposed on a microscope slide covered with Lugol iodine. Achieved slide was observed under microscope, 40x power for probable determination of *Giardia* cysts. This was repeated twice for several samples obtained on D0. To those of solely mono infected calves with giardiasis were proven solely by microscopical examination. In addition *Giardia* antigen in calf feces were also analyzed with rapid immunochromatographic test kits for detection of giardiasis (Bovid-5® Anigen, Korea, solid phase immunochromatographic assay for rapid diagnosis of antigens directed against *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp., Rotavirus, Coronavirus and *Escherichia coli* k99).

Assessment of treatment efficacy. Secnidazol treatment efficacy in calves involved in this research was assessed by microscopic examination of fecal samples collected on D0 and D10, for prevention of bias that would interfere due to probable reinfection, and measured based on the reduction in cyst output in 2 groups of calves. Calculation of the reduction in cyst excretion was performed by use of the Henderson–Tilton formula, composed of geometric mean cyst counts similar to those of described previously by Geurden et al (21) and adapted by previous studies (22-24).

Molecular analysis. Among 18 calves involved in this research, DNA was extracted throughly from fecal material by use of QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) taking into account the manufacturer's manual. Polymerase chain reaction (PCR) analysis were occupied to genotype similar to what has been described previously by Lalle et al (25). Molecular analysis was performed via PCR amplification and sequencing of the 511 bp region of the *β-giardin* gene.

Statistical analysis. Statistical analysis comprised SPSS statistical software package with version 15; SPSS Inc., Chicago, IL. Faecal cyst count and related data in secnidazol treatment and control groups were analyzed for normality by use of Kolmogorov–Smirnov test. Even if faecal cyst count was not normally distributed; therefore, the data were log-transformed to achieve near-normality. Wilcoxon test was used in an attempt to comperatively evlaute faecal cyst counts before (D0) and after secnidazol treatment (D10). Intragroup baseline cyst value was compared via Mann-Whitney U test. Probability ($p < 0.05$) was deemed significant. Total data were shown as geometric mean and range.

de fármaco, se designó como día 0 (D0), mientras que D10 se designó como fin del estudio. En cada ternero se utilizó al menos 2 frotis nativos, en los que el material fecal se mezcló por completo con una solución de $ZnSO_4$ al 33% y después se trasladaron a tubos de centrifuga. Consecuentemente, se consiguió la centrifugación [a 880 x g durante 300 segundos]. Posteriormente, se obtuvo una parte seleccionada y pequeña de la mezcla fecal, que luego se transpusieron en una lámina de microscopio cubierta con lugol yodo. La diapositiva obtenida se observó bajo microscopio, 40x de potencia para la determinación probable de los quistes de *Giardia*. Esto se repitió dos veces para varias muestras obtenidas en D0. A los de terneros exclusivamente mono infectados con giardiasis se demostró únicamente mediante examen microscópico. Además, se analizó el antígeno *Giardia* en heces de ternera con kits rápidos de inmuno- cromatografía para la detección de giardiasis (Bovid-5® Anigen, Corea, ensayo inmunocromatográfico en fase sólida para el diagnóstico rápido de antígenos dirigidos contra *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp., Rotavirus, Coronavirus Y *Escherichia coli* k99).

Evaluación de la eficacia del tratamiento.

La eficacia del tratamiento con secnidazol en terneros involucrados en esta investigación se evaluó mediante el examen microscópico de muestras fecales recolectadas en D0 y D10, para la prevención de sesgo que interferiría debido a una probable reinfección y medido en base a la reducción en la producción de quistes en 2 grupos de terneros. El cálculo de la reducción en la excreción de quistes se realizó mediante el uso de la fórmula de Henderson-Tilton, compuesta de medias geométricas quistes contables similares a los descritos anteriormente por Geurden et al (21) y adaptado por estudios previos (22-24).

Análisis molecular. Entre 18 becerros involucrados en esta investigación, el ADN se extrajo completamente de material fecal mediante el uso de QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemania) teniendo en cuenta el manual del fabricante. El análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ocupó con un genotipo similar al descrito anteriormente por Lalle et al (25). El análisis molecular se realizó mediante amplificación por PCR y secuenciación de la región de 511 pb del gen *β-giardina*.

Análisis estadístico. El análisis estadístico comprendía el paquete de software estadístico SPSS con la versión 15; SPSS Inc., Chicago, IL. El recuento de quistes fecales y los datos relacionados en el tratamiento con secnidazol y los grupos de control se analizaron para la

RESULTS

Clinical findings. A total of 18 calves were enrolled (n=4 Simmental and n=14 Holstein calves). Calves were randomly classified into the groups. The geographical locations of the enterprises and demographic data regarding photos of the cases to those of which were included and shown on Google map. (Figure 1). All small scaled farms (Figure 2) were included in Aydin municipality of Turkey with geographic data: latitude: 37.8502777778, longitude: 27.84166666670. Clinical signs of diarrhoea were observed among all calves as shown in figure 3.

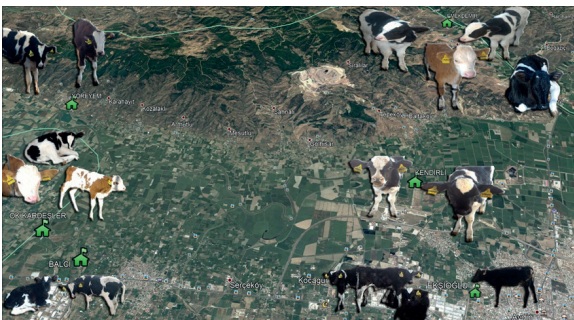


Figure 1. The geographical locations of the enterprises and demographic data regarding photos of the cases to those of which were included and shown on Google map.



Figure 2. Umurlu/Balci farm, where 9 calves were residing at the same area, to those of which diarrhoea was detected 2 calves with giardiasis.

Haematological and serum biochemical analysis. Among aforementioned parameters there was no intragroup or intergroup differences, as detected by mean values and statistical analysis, which were shown in tables 2 and 3.

Fecal Analysis.

Cyst excretion. Among 18 calves enrolled 7 of them presented cysts among fecal microscopic examination (Figure 4 and 5). Cyst counts and

normalidad mediante el uso de Kolmogorov-Smirnov prueba. Incluso si el recuento de quistes fecales no se distribuía normalmente; Por lo tanto, los datos fueron log-transformados para lograr casi normalidad. Se utilizó la prueba de Wilcoxon en un intento de evacuar compresivamente los recuentos de quistes fecales antes (D0) y después del tratamiento con secnidazol (D10). El valor intragrupal del quiste inicial se comparó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró que los valores de probabilidad ($p < 0.05$) eran significativos. Los datos totales se mostraron como media geométrica y rango.

RESULTADOS

Hallazgos clínicos. Un total de 18 terneros fueron matriculados (n = 4 Simmental y n = 14 terneros Holstein). Los terneros fueron clasificados al azar en los grupos. La ubicación geográfica de las empresas y los datos demográficos con respecto a las fotos de los casos a los que se incluyeron y se muestran en el mapa de Google (Figura 1). Se incluyeron todas las explotaciones de pequeña escala (Figura 2) localizadas en el municipio de Aydin en Turquía con datos geográficos: latitud: 37.8502777778, longitud: 27.84166666670". Se observaron signos clínicos de diarrea entre todos Terneros como se muestra en la figura 3.



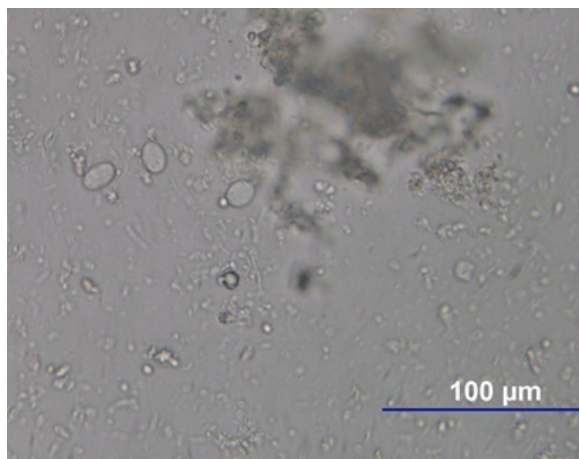
Figure 3. Clinical findings among calves with giardiasis; a) diarrhoea stools scattered in the middle, the animal is reluctant to move. b, c, d) Diarrhoea findings of giardiasis in different colors and concentrations in different animals. e) The posterior part of the wet rectum surrounds and the tarsal joints were dirty with stool. f) *Giardia sp.* associated stool on to the floor.

Table 2. Hematological data mean and statistical values.

Grup	Working period		Wilcoxon test	Mann-Whitney U test	
	Day 0	Day 10	P value	P value (Day 0)	P value (Day 10)
Mean WBC (10 ⁹ /l)					
Treatment	8.3889	7.0522	0.214	0.546	0.863
Control	7.4756	8.2789	0.314		
Mean RBC (10 ¹² /l)					
Treatment	7.5944	6.8033	0.314	0.136	0.863
Control	6.8711	6.9489	0.594		
Mean HGB (g/dl)					
Treatment	9.0444	8.4000	0.514	0.489	0.63
Control	9.6667	10.0333	0.483		
Mean HCT (%)					
Treatment	29.16	25.96	0.314	0.97	0.08
Control	31.50	30.45	0.678		
Mean MCV (fl)					
Treatment	38.00	37.00	0.677	0.796	0.258
Control	37.66	38.97	0.722		
Mean MCHC (pg)					
Treatment	32.22	29.13	0.208	0.387	0.387
Control	31.48	31.60	0.767		
Mean PLT (10 ⁹ /l)					
Treatment	272.88	361.77	0.021	0.436	0.024
Control	323.77	289.88	0.374		

WBC: leukocyte, RBC: erythrocytes, HCT: hematocrit, HGB: hemoglobin, MCV: mean erythrocyte volume, MCHC: mean erythrocyte hemoglobin concentration, PLT: thrombocyte N: number of animals

related results of the were presented in Table 3. Throughout the study period calves in control group remained positive with a significant cyst output, showing alteration on day 10 (ranged between 4000 to 140000) compared to the baseline values (ranged 8000-48000), whereas there was no statistical significance. Contrarily

**Figure 4.** *Giardia sp.* appearance of cysts on native fecal smear.

Análisis bioquímico hematológico y serológico. Entre los parámetros mencionados, no hubo diferencias intragrupo o intergrupales, como se detectó mediante los valores medios y el análisis estadístico, que se mostraron en las tablas 2 y 3.

Análisis Fecal

Excreción de quistes. De los 18 becerros matriculados, 7 presentaron quistes en el examen microscópico fecal (Figura 4 y 5). Durante el período de estudio, los terneros del grupo control permanecieron positivos con una producción significativa de quistes, mostrando alteración en el día 10 (osciló entre 4000 a 140000) en comparación con los valores basales (de 8000-48000), mientras que no hubo significación estadística. Al contrario, los terneros del grupo de tratamiento mostraron recuentos de quistes oscilados entre 8000-280000 en D0, mientras que las muestras fecales sin ningún quiste detectable de *Giardia sp.* Incluyeron muestras de todos los terneros en los días 7 y 10 (Tabla 3). En los días 7 y 10, después del tratamiento con secnidazol, el porcentaje de reducción en la excreción de quistes calculada sobre la base de la media geométrica fue del 100%. En el grupo de tratamiento, la media geométrica para la excreción de quistes disminuyó significativamente ($p < 0.001$) después del tratamiento. Entre los grupos hubo diferencias significativas en los días 3, 7 y 10 días ($p < 0.01$) (Tabla 4).

Table 3. Serum biochemical data mean and statistical values

Grup	Working period		Wilcoxon test	Mann-Whitney U test	
	Day 0	Day 10	P value	P value (Day 0)	P value (Day 10)
Mean ALT (U/l)					
Treatment	18.66	18.78	0.86	0.94	0.34
Control	22.00	41.00	0.95		
Mean AST (U/l)					
Treatment	39.33	35.55	0.59	0.86	0.39
Control	39.66	41.00	0.34		
Mean Creatinine (mg/dl)					
Treatment	0.86	0,8933	0.44	0.73	0.79
Control	0.86	0,8644	0.91		
Mean Urea (mg/dl)					
Treatment	19.33	20.66	0.44	0.07	0.09
Control	21.44	22.55	0.35		

ALT: Alanine aminotransferase, AST: Aspartate aminotransferase

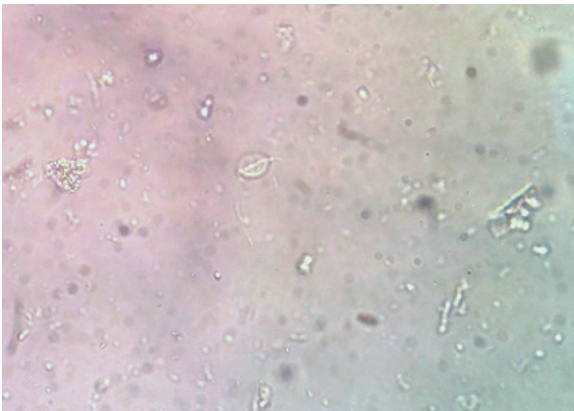


Figure 5. *Giardia sp.* cystic appearance (some of the flagelles are outside) on fecal smear.



Figure 6. One of the infected calves analyzed on Anigen Bovid 5 Rapid Test Kit; *Giardia* antigen positive.

treatment group calves showed cyst counts ranged between 8000-280000 on D0, whereas fecal samples without any detectable cysts of *Giardia sp.* included samples from all calves on days 7 and 10 (Table 3). On days 7 and 10, after secnidazol treatment, the percentage reduction in cyst excretion calculated based on geometric mean was 100%. In treatment group geometric mean for cyst excretion was significantly decreased ($p < 0.001$) after treatment. Between groups there were significant differences on days 3, 7, and 10 ($p < 0.01$) (Table 4).

Immunochromatographic test results. All calves were tested by Bovid-5 test kits showed positivity against *G. doudenalis* (Figure 6). To those of only mono-infected calves were chosen.

PCR amplification and sequence analysis of the β -giardina gene. Fecal samples of all 18 calves diagnosed *Giardia* positive by immunochromatographic test kits and microscopy, were positive by nested PCR (Figure 7). PCR products from each of the 18 *Giardia*-positive calf fecal samples were forwarded to

Resultados de la prueba inmunocromatográfica. Todos los terneros fueron probados por Bovid-5 kits de prueba mostró positividad contra *G. doudenalis* (Figura 6). Se eligieron las de sólo terneros mono-infectados.

Amplificación por PCR y análisis de secuencia del gen β -giardina. Las muestras fecales de los 18 terneros diagnosticados de *Giardia* positiva mediante kits de inmunocromatografía y microscopía fueron positivas por PCR anidada (Figura 7). Los productos de PCR de cada una de las 18 muestras fecales de ternera *Giardia*-positivas se enviaron a la caracterización molecular. El ensayo de PCR anidada con β -giardina se aplicó con éxito a 18 aislamientos. La secuencia de ADN obtenida de los aislamientos seleccionados se comparó con secuencias de referencia (número de acceso GenBank®: M36728 para el subensamblado A1, AY072723 para el subensayo A2, AY072724 para el subensayo A3). Se aisló el subtetipo A3 (13,15,26) del conjunto A de los 18 terneros matriculados.



Figure 7. Fecal samples of all 18 calves diagnosed *Giardia* positive by immunochromatographic test kits and microscopy, were positive by nested PCR. This figure showed 3 calves with giardiasis as detected by nested PCR products along with positive and negative controls.

Table 4. *G. duodenalis* cyst scatter in the control group and treatment groups were calculated as geometric mean (geom) (X_G) and minimum-maximum (min-max) at each sampling day (0. day before treatment and at 3, 7 and 10 days after treatment). Day 0 values reflect cyst distribution before treatment.

	Day 0 X_G	(min-max)	Day 3 X_G	(min-max)	Day 7 X_G	(min-max)	Day 10 X_G	(min-max)
Control group	15979.93 ^a	8000-48000	14035.64 ^a	4000-256000	12924.98 ^a	4000-80000	20592.60 ^a	4000-140000
Treatment group	29063.92 ^a	8000-280000	6.31 ^b	0-4000	0 ^b	0-0	0 ^b	0-0
P value	0.258		0.000		0.000		0.000	
Decrease in cyst excretion (%)			%99.97		%100		%100	

a, b: The differences between the averages with different letters in the same row and column are important. (P<0.001) (P<0.05) P: Statistical comparison of treatment and treatment groups

molecular characterization. The β -giardin nested PCR assay was successfully applied to 18 isolates. The achieved DNA sequence from the selected isolates was compared with reference sequences (GenBank[®] accession number: M36728 for sub-assembly A1, AY072723 for sub-assembly A2, AY072724 for sub-assembly A3). A3 subgenotype (13,15,26) of assembly A was isolated from all 18 calves enrolled.

DISCUSSION

Limited literature and treatment options are currently available for combatting against giardiasis in calves. Chloroquine (24,26) as a novel therapeutic choice has found great attention in the literature, in which must be investigated in larger calf populations. On the other hand previous literature indicating the efficacy of secnidazol against giardiasis in sheep (22,23), mice (27) all gave positive and encouraging results. As there was no previous study investigated secnidazol efficacy against giardiasis in calves, the proposed dosage in this study was adapted from previous works which included sheep (22,23) with giardiasis and cattle with balantidiasis (30).

Secnidazol has been the subject of prior studies regarding anti-giardial treatment in sheep (25,29), cats (30) and mice (29). To the present authors' knowledge complete (100%) efficacy (on days 7 and 10 following treatment) of a single dose of an oral treatment with secnidazole at proposed dosage for combatting against natural giardiasis in calves has been detected for the first time. In the present field and clinical trial, secnidazole caused no side effects nor clinical signs, thus did not require treatment intervention. Available evidence in this study suggested that secnidazole might be efficacious as other 5-nitroimidazole drugs as a therapeutic armamentarium for giardiasis in calves.

In a prior multidisciplinary research at agricultural and veterinary fields the efficacy of secnidazol

DISCUSSION

La literatura y las opciones de tratamiento disponibles actualmente están disponibles para combatir la giardiasis en terneros. La cloroquina (24, 26) como una nueva opción terapéutica ha encontrado gran atención en la literatura, en la que debe investigarse en poblaciones de terneros más grandes. Por otro lado, la literatura previa que indica la eficacia del secnidazol contra la giardiasis en ovinos (22,23), los ratones (27), todos dieron resultados positivos y alentadores. Como no se había investigado previamente la eficacia del secnidazol contra la giardiasis en terneros, la dosis propuesta en este estudio fue adaptada de trabajos previos que incluyeron ovejas (22,23) con giardiasis y ganado con balantidiasis (30).

El secnidazol ha sido objeto de estudios previos sobre el tratamiento antigienal en ovinos (25, 29), gatos (30) y ratones (29). Para los autores de la presente, se ha detectado por primera vez la eficacia completa (100%) de una dosis única de un tratamiento oral con secnidazol en dosis propuestas para combatir la giardiasis natural en becerros (en los días 7 y 10 después del tratamiento). En el presente campo y en el ensayo clínico, el secnidazol no causó efectos secundarios ni signos clínicos, por lo que no requirió intervención de tratamiento. La evidencia disponible en este estudio sugirió que el secnidazol podría ser eficaz como otros fármacos 5-nitroimidazol como un armamento terapéutico para la giardiasis en terneros.

En una investigación multidisciplinaria previa en campos agrícolas y veterinarios se evaluó la eficacia del tratamiento con secnidazol en la producción de leche en ovejas lecheras infectadas con *G. duodenalis*. El secnidazol solo a una dosis de 10 mg / kg-30 mg / kg reveló que había una reducción significativa en la excreción del quiste (22). Otro estudio determinó la administración de secnidazol a una dosis única de 10 mg / kg, por vía oral en corderos infectados naturalmente

treatment on milk production in dairy ewes infected with *G. duodenalis* was assessed. Single secnidazole at a dose of 10 mg/kg-30 mg/kg, revealed that there was a significant reduction in cyst excretion (22). Another study determined secnidazole administration at a single dose of 10 mg/kg, orally in lambs naturally infected with *G. duodenalis*. Twelve weeks of age weaned lambs were selected and randomly assigned into two groups based on placebo (n=7 untreated control group) or treatment (n=10 lambs treated with a single secnidazole; dosage 10 mg/kg). During the latter study a high (99.98%) reduction in cyst excretion in the secnidazol treatment group compared to the control group at day 10, revealed a significant ($p < 0.001$) reduction in cyst excretion (23). Another study reported the efficacy of three treatments measured against *Balantidium coli*, which is another parasite, in cattle. According to the latter authors obtained therapeutic efficacy rates as 37.5, 62.5, and 87.5% for metronidazole, oxytetracycline, and secnidazole, making secnidazole the most effective option (28).

In the present study Secnidazole treatment efficacy in calves might be comparatively discussed to what has been described in lambs naturally infected with giardiasis, in which a single and oral dosage of 30 mg/kg caused 99.98% efficacy, with no more cyst was determined in faeces 10 days after treatment (23). In the present study secnidazole therapy entirely and significantly reduced the cyst excretion calculated based on geometric mean by 100% on day 7 and 10 after the initiation of the treatment, resulting in a significant reduction ($p < 0.001$) in cyst excretion. It may be briefly suggested that the proposed single dosage of the latter compound, ease of administration, well toleration of calves, all could contribute making it a superior therapeutic armamentarium in contrast to other relevant nitroimidazole compounds

Given the efficacy of secnidazole (as it resulted in a significantly decreased cyst excretion) as a single dose for treatment of naturally occurring *Giardia* infection among Sakiz lambs involved in the present study, the usage of this of drug should be encouraged. The high cyst reducing activity of secnidazol against *G. duodenalis* may provide an important benefit in a clinical setting where a specific diagnosis is impossible or impractical, likewise livestock field condition. The availability of this inexpensive drug, the cost (approximately 2.2 dollars per a lamb for therapy) and the easily availability for market opportunity have been significant impediments for usage of this antiparasitic drug against giardiasis in sheep.

con *G. duodenalis*. Se seleccionaron 12 corderos destetados de edad y se asignaron aleatoriamente a dos grupos en base a placebo (n = 7 grupo de control no tratado) o tratamiento (n = 10 corderos tratados con un solo secnidazol, dosis 10 mg/kg). Durante el último estudio, una reducción alta (99.98%) en la excreción de quistes en el grupo de tratamiento con secnidazol en comparación con el grupo control en el día 10, reveló una reducción significativa ($p < 0.001$) en la excreción del quiste (23). Otro estudio informó la eficacia de tres tratamientos medidos contra *Balantidium coli*, que es otro parásito, en el ganado. Según este último, los autores obtuvieron tasas de eficacia terapéutica del 37.5, 62.5 y 87.5% para el metronidazol, la oxitetraciclina y el secnidazol, lo que hace que el secnidazol sea la opción más efectiva (28).

En el presente estudio, la eficacia del tratamiento con secnidazol en terneros se podría discutir de forma compacta con lo que se ha descrito en los corderos infectados naturalmente con giardiasis, en los que se determinó una dosis única y oral de 30 mg/kg con un 99.98% de eficacia, 10 días después del tratamiento (23). En el presente estudio, la terapia con secnidazol disminuyó de manera significativa y significativa la excreción de quistes calculada sobre la base de la media geométrica en un 100% el día 7 y 10 después del inicio del tratamiento, lo que resultó en una reducción significativa ($p < 0.001$) de la excreción de quistes. Se puede sugerir brevemente que la dosis única propuesta de este último compuesto, la facilidad de administración, la tolerancia de los terneros, todo podría contribuir a convertirlo en un armamentario terapéutico superior en contraste con otros compuestos relevantes de nitroimidazol

Dada la eficacia del secnidazol (ya que dio lugar a una disminución significativa de la excreción de quistes) como una dosis única para el tratamiento de la infección por *Giardia* de origen natural entre los corderos Sakiz implicados en el presente estudio, debe fomentarse el uso de este medicamento. La actividad reductora de quistes altos de secnidazol contra *G. duodenalis* puede proporcionar un beneficio importante en un entorno clínico en el que un diagnóstico específico es imposible o poco práctico, así como la condición de campo de ganado. La disponibilidad de este fármaco barato, el costo (aproximadamente 2.2 dólares por cordero para la terapia) y la fácil disponibilidad para oportunidades de mercado han sido impedimentos significativos para el uso de este antiparasitario contra la giardiasis en ovejas.

Acknowledgement

This study was summarized partially from a national Project and was funded by Adnan Menderes University Research Projects Funding Unit (ADU-BAP) with project number VTF-15048. This article was a PhD study with thesis no:440320 (Ulusal Tez Merkezi: National Thesis Center) regarding student Göktuğ Toros under advisory of Dr. Kerem Ural.

Agradecimiento

Este estudio se resumió parcialmente a partir de un Proyecto nacional y fue financiado por la Unidad de Financiamiento de Proyectos de Investigación Universitaria Adnan Menderes (ADU-BAP) con el número de proyecto VTF-15048. Este artículo fue un estudio de doctorado con tesis no. 440320 (Ulusal Tez Merkezi: Centro Nacional de Tesis) sobre el estudiante Göktuğ Toros bajo la asesoría del Dr. Kerem Ural.

REFERENCES

- O'Handley RM, Cockwill C, Jelinski M, McAllister TA, Olson ME. Effects of repeat fenbendazole treatment in dairy calves with giardiasis on cyst excretion, clinical signs and production. *Vet Parasitol.* 2000; 89(3):209-218.
- Barigye R, Dyer NW, Newell T, Khaitsa ML, Trout JM, Santin M, Fayer R. Molecular and immunohistochemical detection of assemblage E, *Giardia duodenalis* in scouring North Dakota calves *Vet Parasitol.* 2008; 157:196-202.
- Huang J, Yue D, Qi M, Wang R, Zhao J, Li J, Shi K, Wang M, Zhang L. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Ningxia, northwestern China. *BMC Vet Res.* 2014; 10(292):1-5.
- Lee SH, VanBik D, Kim HY, Cho A, Kim JW, Byun JW, Oem JK, Oh SI, Kwak D. Prevalence and molecular characterisation of *Giardia duodenalis* in calves with diarrhoea. *Vet Rec.* 2016; 178(25):633.
- Coklin T, Farber JM, Parrington LJ, Coklin Z, Ross WH, Brent R. DixonTemporal changes in the prevalence and shedding patterns of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in a herd of dairy calves in Ontario. *Can Vet J.* 2010; 51(8):841-846.
- Gharieb RMA, El-Ghany AMA. *Giardia lamblia* in household persons and buffalo calves; prevalence, molecular identification and associated risk factors. *Japan J Vet Res.* 2016; 64(2):15-22.
- Hamnes IS, Gjerde BK, Robertson LJ. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Vet Parasitol.* 2006; 140:204-216.
- Suman MSH, Alam MM, Pun SB, Khair A, Ahmed S, Uchida RY. Prevalence of *Giardia lamblia* infection in children and calves in Bangladesh *Bangl J Vet Med.* 2011; 9(2):177-182.
- Trout JM, Santin M, Greiner E, Fayer R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. *Vet Parasitol.* 2005; 130(3):177-183.
- Tiranti K, Larriestra A, Vissio C, Picco N, Alustiza F, Degioanni A, Vivas A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011; 20(2):140-147.
- Winkworth CL, Learmonth JJ, Matthaehi CD, Townsend CR. Molecular Characterization of *Giardia* Isolates from Calves and Humans in a Region in Which Dairy Farming Has Recently Intensified. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(16):5100-5105.
- Cacciò SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 2005; 21:430-437.
- Geurden T, Geldhof P, Levecke B, Martens C, Berkvens D, Casaert S, Vercruyssen J, Claerebout E. Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *Int J Parasitol.* 2008; 38(2): 259-264.

14. Itagaki T, Kikawa M, Terasaki K, Shibahara T, Fukuda K. Molecular characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Korea on the basis of DNA sequences of ribosomal ITS1 and mitochondrial NDI gene. *J Vet Med Sci.* 2005; 67:1115-1118.
15. Santina M, Dargatz D, Fayer R. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. *Vet Parasitol.* 2012; 183:231-236.
16. Ali V, Nozaki T. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20:164-187.
17. Tejman-Yarden N, Eckmann L. New approaches to the treatment of giardiasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2011; 24(5):451-456.
18. Schwartz E, Lachish T, Meltzer E. Treatment of Giardiasis after Nonresponse to Nitroimidazole. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20(10):1738-1740.
19. Boreham PFL, Phillips RE, Shepherd RW. Altered uptake of metronidazole in vitro by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988; 82:104-106.
20. Tangtrongsup S, Scorza V. Update on the Diagnosis and Management of *Giardia* spp. Infections in Dogs and Cats. *Topics in Companion Animal Medicine.* 2010; 25(3):155-162.
21. Geurden T, Pohleb H, Sarrea C, Dreesena L, Vercruyssa J, Claerebout E. The efficacy of a treatment with fenbendazole against an experimental *Giardia duodenalis* infection in lambs. *Small Rum Res.* 2011; 96(2-3):211-215.
22. Aliç Ural D, Ayan A, Aysul N, Balıkçı C, Ural K. Secnidazol Treatment to Improve Milk Yield in Sheep with Giardiasis. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg.* 2014; 9(2):74-82.
23. Ural K, Aysul N, Voyvoda H, Ulutas B, Aldemir OS, Eren H. Single dose of secnidazole treatment against naturally occurring *Giardia duodenalis* infection in Sakiz lambs. *Rev MVZ Cordoba.* 2014; 19(1):4023-4032.
24. Karademir U, Ural K, Aysul N, Ayan A, Toplu S, Ortlek O, Balıkçı C, Künyeli A, Erdogan H. The efficacy of chloroquine treatment against naturally occurring *Giardia duodenalis* infection in lambs. *Rev MVZ Córdoba.* 2016; 21(2):5328-5335.
25. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol.* 2005; 35(2):207-213.
26. Gultekin M, Ural K, Aysul N, Ayan A, Balıkçı C, Akyıldız G. The efficacy of chloroquine treatment of *Giardia duodenalis* infection in calves. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.* 2016; 85:335-341.
27. da Silva AS, da Silva MK, Oliveira CB, Zanette RA, Monteiro SV. Efficacy of drugs against *Giardia muris* in mice *Mus musculus* naturally infected *Ciencias Agrárias, Londrina,* 2008; 29(1):175-178.
28. Bilal CQ, Khan MS, Avais M, Ijaz M, Khan JA. Prevalence and chemotherapy of *Balantidium coli* in cattle in the River Ravi region, Lahore (Pakistan). *Vet Parasitol* 2009; 163(1-2):15-17.
29. Aliç Ural D, Aysul N, Gültekin M. The Efficacy of Oral Administration of Clinoptilolite Against Naturally Occurring Giardiasis in Calves. *Kocatepe Vet J.* 2016; 9(4):288-293.
30. DaSilva AS, Castro VSP, Tonin AA, Brendler S, Costa MM, Jaques JA, Bertoletti B, Zanette RA, Raiser AG, Mazzanti CM, Lopes STA, Monteiro SG. Secnidazole for the treatment of giardiasis in naturally infected cats. *Parasitol Int.* 2011; 60(4):429-432.