

eISSN: 2667-8292

Turk Vet J, Vol : 2 (2), 2020



Turk Vet J

---

TURKISH  
VETERINARY  
JOURNAL

---

Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Sivas Cumhuriyet University

### **Aims and Scope**

Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), aims to publish articles (original research article, short communication, letters to editor, review article, and case report) on Veterinary basic sciences, clinic or preclinical sciences, zootechnics, animal nutrition, food hygiene and technology both in Turkish or English. Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J) is an international, double peer reviewing scientific journal that publishes by Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine. Manuscript will be publish should not published before in elsewhere and should be based on the research (except review articles). Turk Vet J is published three in a year and an open access scientific journal. Special issues may be publishes by the decision of the journal administration. The journal accepts English or Turkish manuscripts. Turk Vet J doesn't asks fee for the processing the article.

### **Amaç ve Kapsam**

Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), Türkçe veya İngilizce olarak, temel bilimler, klinik ve klinik öncesi bilimler, zootekni, hayvan besleme ile gıda hijyeni ve teknoloji alanlarında makaleleri (araştırma makalesi, kısa bildiri, editöre mektup, derleme ve vaka takdimi türlerinde) yayımlamayı amaçlar. Turkish Veterinary Journal (Turk Vet J), Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi tarafından yayımlanan, uluslararası, çift hakemli bilimsel bir dergidir. Dergiye, ulusal ya da uluslararası ilgi ve uygulama içiren ve yeni bilgiler barındıran makaleler sunulabilir. Yayımlanacak makalelerin, daha önceden yayımlanmamış ve araştırma sonuçlarına dayalı olması gerekmektedir (derleme makaleleri hariç). Turk Vet J açık erişim sağlamak üzere yılda üç defa online olarak yayınlanır. Dergi yönetiminin kararları doğrultusunda özel ya da ek sayılar yayımlanabilir. Turk Vet J Türkçe ve İngilizce yayınları kabul eder. Turk Vet J makale işlem ücreti (değerlendirme ücreti veya basım ücreti) ve makalelere erişim için herhangi bir ücret talep etmez.

### **Owner / Sahibi**

Prof. Dr. Kürşat ALTAY

### **Editors / Editörler**

Prof. Dr. Alparslan COŞKUN (Editor in Chief / Baş Editör)

Dr. Öğ. Üyesi Hakan IŞIDAN (Managing Editor / Sorumlu Yazı İşleri Müdürü)

Dr. Öğ. Üyesi Alper KOÇYİĞİT (Editor / Editör)

### **Editorial Board / Editörler Kurulu**

Dr. Öğr. Üyesi Gökçe ÖZDEMİR

Dr. Öğr. Üyesi Hakan MURAT

Doç. Dr. Mustafa KOÇKAYA

Dr. Öğr. Üyesi Recep KALIN

Dr. Öğr. Üyesi Seyda ŞAHİN

+90 346 219 1812

<http://dergipark.gov.tr/turkvetj>, [turkvetj@cumhuriyet.edu.tr](mailto:turkvetj@cumhuriyet.edu.tr)

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 58140, Sivas; Türkiye

eISSN: 2667-8292

# CONTENTS / İÇİNDEKİLER

Turk Vet J (2)2

## Research Article / Araştırma Makalesi

- Demir, Potasyum, Magnezyum ve Sodyum Tuzlarını İçeren Mannitol Çözeltilerinin Liyofilizasyon Esnasında Kritik Formülasyon Sıcaklıklarının Differensiyel Termal Analiz (DTA) Cihazı ve Freeze Dry Mikroskop (FDM) ile Belirlenmesi** 39-44

*Determination of Critical Formulation Temperatures of Mannitol Solutions Containing Iron, Potassium, Magnesium and Sodium Salts by Differential Thermal Analysis (DTA) and Freeze Dry Microscope (FDM)*

Gülseren YILDIZ ÖZ

- Epidemiological Inspection of Canine Parvoviral Enteritis at Teaching Veterinary Hospital in Chattogram, Bangladesh** 45-53

*Bangladeş, Chattogram Veteriner Hekimliği Eğitim Hastanesinde Köpek Parvoviral Enteritisinin Epidemiyolojik İncelemesi*

Tanvir Ahmad NİZAMİ\*, Abdullah Al SATTAR, Sazedra AKTER, Md. Hafizar RAHMAN, Nurun Nahar CHİSTY, Mohammed Yousuf Elahi CHOWDHURY and Md. Ahasanul HOQUE

- CD3, CD79 $\alpha$ c $\gamma$ , Vimentin,  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin, S100 and Cytokeratin 5/6 Expression in Immunohistochemical Characterization of Dogs with Transmissible Venereal Tumors** 54-61

*Köpeklerin Bulaşıcı Veneral Tümörlerinin İmmunohistokimyasal Karakterizasyonunda CD3, CD79 $\alpha$ c $\gamma$ , Vimentin,  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin, S100 ve Sitokeratin 5/6 Ekspresyonları*

Emin KARAKURT\*, Mushap KURU, Serpil DAG, Enver BEYTUT, Hilmi NUHOGLU, Murat Can DEMİR, Ayfer YILDIZ, Cihan KACAR

- İshalli Yenidoğan Buzağılarda Elektrolit Bozukluklarının Prevalansı** 62-66

*Prevalence of Electrolyte Disorders in Neonatal Calves with Diarrhea*

Alparslan COŞKUN, Uğur AYDOĞDU, Onur BAŞBUĞ, Sefer TÜRK, Zahid Tefvik AĞAOĞLU

- Sıçanlarda Deneysel Oluşturulan Yara Modelinde Morus Alba Ekstraktının Etkinliğinin Belirlenmesi** 67-73

*Determination of the Efficiency of Morus Alba Extract in Experimental Wound Model Created in Rats*

Haki KARA\*, Mahmut ŞAHİN, Hüseyin GÜNGÖR, Alper Serhat KUMRU, Gökhan YILMAZ, Mehmet Önder KARAYİĞİT

## Case Report / Vaka Takdimi

- Ultrasonographic Examination as a Useful Tool Diagnose a Plastic Foreign Body Causing Duodenal Obstruction in a Cat** 74-79

*Bir Kedide Doudenal Obstruksiyona Neden Olan Plastik Yabancı Bir Cismin Faydalı Bir Tanı Metodu Olan Ultrasonografik Muayene İle Teşhisi*

Murat VURUCU\*, Ozan AVCI

- Penile Prolapse and Treatment in a Sugar Glider (Petaurus breviceps)** 80-83

*Bir Uçan Kuskusta Prolapsus Penis Olgusu ve Tedavisi (Petaurus breviceps)*

Tugba KURT\*, Ziyet Dila ATESPARE, Emine Esmâ CERKEZ

**Lumpy Skin Disease (LSD): Recent outbreak and threatening Smallholder Cattle farmer in Nepal** 84-86

*Yumrulu Deri Hastalığı (YDH): Son Salgın Nepal'de Küçükbaş Sığır Çiftçisini Tehdit Ediyor*

**Uddab POUDEL**


---



## Demir, Potasyum, Magnezyum ve Sodyum Tuzlarını İçeren Mannitol Çözeltilerinin Liyofilizasyon Esnasında Kritik Formülasyon Sıcaklıklarının Differensiyel Termal Analiz (DTA) Cihazı ve Freeze Dry Mikroskop (FDM) ile Belirlenmesi

Gülseren YILDIZ ÖZ

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, İstanbul

 Yıldız Oz G 0000-0003-1201-4920

\*Corresponding Author's E-Mail: gulseren.yildiz@tarimorman.gov.tr

### Özet

Bir maddenin kinetik saatinin yavaşlatıldığı liyofilizasyon süreci, her madde veya çözelti için özel olmaktadır. Her maddenin kendisine özel bazı önemli hal değişim sıcaklıkları bulunmaktadır. Ötektik nokta (Teu), camı geçiş sıcaklığı (Tg) ve çökme sıcaklığının (Tc) belirlenmesi maddenin tanımlanabilmesi ve kaliteli kuruma için reçete hazırlanmasında gerekli olmaktadır. Mannitol ve farklı mineral tuzlarını içeren çözeltilerin kurutma reçetelerini oluşturmak için gerekli olan kritik sıcaklık değerlerini belirlenmesi bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Bu amaçla demir, potasyum, magnezyum ve sodyum tuzlarını içeren mannitol çözeltilerinin kritik formülasyon sıcaklıkları, Differansiyel Termal Analiz (DTA) cihazı ve Freeze Dry Mikroskop (FDM) kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda mannitolün Teu ve Tc değerleri yüksek bulunmuştur. Ayrıca tuzların Teu ve Tc değerlerini düşürdüğü sonucuna varılmıştır. Mannitol için elde edilen Teu ve Tc değerleri liyofilizasyonu kalitesi açısından başarılı bir sonucu ifade etmektedir. Mannitol çözeltisine eklenen tuzlar ise primer kurutmanın daha düşük sıcaklıklarda bitirilmesini gerektirmektedir. Bu sonuç zor ve daha masraflı bir primer kurutma prosesini ifade etmektedir.

Received 02 April 2020  
Accepted 15 December 2020  
Published 30 December 2020

**Anahtar Kelimeler:**  
Liyofilizasyon, Mannitol, Mineral Tuzları

**Cite this article:** Yıldız Öz G (2020) Demir, Potasyum, Magnezyum ve Sodyum Tuzlarını İçeren Mannitol Çözeltilerinin Liyofilizasyon Esnasında Kritik Formülasyon Sıcaklıklarının Differensiyel Termal Analiz (DTA) Cihazı ve Freeze Dry Mikroskop (FDM) ile Belirlenmesi. Turk Vet J, 2(2):39-44.

### Determination of Critical Formulation Temperatures of Mannitol Solutions Containing Iron, Potassium, Magnesium and Sodium Salts by Differential Thermal Analysis (DTA) and Freeze Dry Microscope (FDM)

#### Abstract

The lyophilization process, in which the kinetic clock of a substance is slowed, is specific for each substance or solution. There are some important state-change temperatures specific to each substance. It is necessary to determine the collapse temperature (Tc), eutectic point (Teu) and glass transition (Tg), to prepare a prescription for quality drying and to define the material. The aim of the study is to determine the critical temperature values required to form drying recipes of solutions containing mannitol and different mineral salts. For this purpose, critical formulation temperatures of mannitol solutions containing iron, potassium, magnesium and sodium salts were determined using Differential Thermal Analysis (DTA) device and Freeze Dry Microscope (FDM). At the end of the study, Teu and Tc values of mannitol were found to be high. Also, it was concluded that salts reduce Teu and Tc values. The Teu and Tc values obtained for mannitol represent a successful result in terms of lyophilization quality. Salts added to the mannitol solution require primary drying to be completed at lower temperatures. This result represents a difficult and costly primary drying process.

**Keywords:** Lyophilization, Mannitol, Mineral Salts

#### Giriş

Modern teknolojinin gelişmesi ile birlikte biyolojik ve kimyasal maddelerin stabil ve canlı halde kalması liyofilizasyon teknolojisi ile mümkün kılınabilmektedir (Pikal, 2001). Mannitol liyofilizasyon prosesinde koruyucu olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Liyofilizasyon sırasında

donma süreci en önemli basamak olarak görüldüğünden bir molekülün nasıl donduğu araştırma konusu olmaktadır (Kasper ve Friess, 2011). Donmuş mannitol solüsyonu çoğunlukla kristal yapılıdır ve içerisinde bulunan tampon bileşenlerin (liyoprotektanlar veya proteinler gibi) varlığı mannitol kristalleşmesini inhibe veya teşvik

edebilmektedir (Lueckel ve ark., 1998). Özellikle izotoniklik ajanı veya stabilizatör amaçlı eklenen tuzlar, mannitol ve diğer yardımcı maddelerin fiziko-kimyasal özellikleri üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Shalaev ve Franks, 1996; Telang ve ark., 2003). Mannitol liyofilizasyondan sonra metastabil bir kristalin hidrat formuna dönüşebilmektedir. Manntiolün hidrat yapısının bozulması ile yapıdan su salınımı gerçekleşir ve nihai ürünün nem oranı artar. Nem oranının artışı ise stabilitenin bozulması neticesinde ürünün raf ömrünü azaltır (Yu ve ark., 1999). Amorf formda mannitol aktif ürünü moleküler etkileşimlerle stabilize edebilmektedir (Izutsu ve ark., 1994). Tuzların ise dondurma, tavlama ve kurutma sırasında formülasyonun fiziko-kimyasal özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmaktadır (Hawe ve Frieß., 2006).

Bir maddenin kristal veya amorf yapıları olmaları bu yapıların termal özelliklerinin bilinmesi açısından önemli olmaktadır. Maddelerin yapısına göre kritik formülasyon sıcaklıkları değişebilmekte ve liyofilizasyon reçetesinin optimize edilmesi gerekebilmektedir (Patel ve Hurtwitz, 1972). Kristal maddeler için kristalizasyon ve erime sıcaklığı, amorf maddeler için ise camsı geçiş sıcaklıklarının belirlendiği kritik noktalar numune ve referans malzeme arasındaki sıcaklık farkı ölçümüne dayalı bir metot kullanılarak (Differensiyel Termal Analiz-DTA) belirlenebilmektedir (Martin ve ark., 2007). Freze Dry Mikroskop (FDM) ile liyofilizasyonun ince bir film gibi ön incelemesinin yapılarak sıcaklık artışı ve basınç altında maddelerin çökme sıcaklığı belirlenmektedir (Arshad ve ark., 2014). Çözeltilerin içerisinde bulunan tuzların dezavantajı kritik formülasyon sıcaklıklarını düşürmesiyken, matriks olarak sağlam bir iskelet oluşturması tuzların avantajı olmaktadır (Hawe ve Frieß, 2006). Kristal yapı içerisinde bulunan su buharlaşırken canlı hücrelerin hücre duvarına zarar verdiği için oluşan kuruma kaliteli olamamakta ve rekonstrüksiyon sırasında canlılık kayıpları oluşabilmektedir (Day ve Stacey, 2007). Matriks olarak amorf maddelerin kullanılması canlı hücrelerin güvenliği açısından avantaj iken, amorf yapılar arasından bağlı suyun uzaklaştırılmasının çok zor olması dez avantaj olabilmektedir (Rey, 1960). Mannitol çözelti kompozisyonuna göre amorf ya da kristal gibi davranabilmektedir. Bu özelliğinden dolayı liyofilizasyonda kriyoprotektan olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Izutsu ve ark., 1994). Tuz varlığı ise mannitolün kristalleşmesini kritik sıcaklıklarda inhibe edebilmekte veya kritik sıcaklık değerlerini değiştirebilmektedir (Telang ve ark., 2003). Bu nedenle sunulan çalışmada mannitol çözeltisine

eklenen farklı tuzların donma sürecinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çözeltilerin kritik formülasyon sıcaklıklarını belirlemek için FDM ve DTA cihazları kullanılmıştır. Bu sayede çalışmada kullanılan farklı tuzların liyofilizasyon esnasında mannitolün primer kurutmasına etkileri incelenmiştir. Ayrıca daha verimli bir nihai ürün elde etmek için primer kurutmanın daha yüksek sıcaklıklarda bittiği mannitol-tuz çözeltisi belirlenmeye çalışılmıştır.

## **Materyal ve Metot**

### **Materyal**

Bu çalışmada materyal olarak D-Mannitol (cas no: 69-65-8) kullanılmıştır. Mannitol ile tuzlu çözeltiler hazırlanmıştır; tuz olarak Sodyum klorür (NaCl) (cas no: 7647-14-5), Potasyum klorür (KCl) (cas no: 7447-40-7), Demir klorür (FeCl<sub>3</sub>) (cas no: 7705-08-0) ve Magnezyum klorür (MgCl<sub>2</sub>) (cas no: 7786-30-3) kullanılmıştır.

Kritik formülasyon sıcaklıklarının belirlenmesi için DTA (Lyotherm2, Biopharma Tch. Ltd, UK) ve FDM (Lyostat2, Biopharma Tch. Ltd, UK) cihazları kullanılmıştır.

### **Metot**

Tuz içeren Mannitol Çözeltilerinin Hazırlanması  
Saf mannitol ve 0,1/1 oranında NaCl, KCl, FeCl<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub> içeren olmak üzere beş farklı mannitol çözeltisi hazırlanmıştır.

### **DTA analizi**

DTA analizi için alüminyum blok içerisinde bulunan üç adet kuyucuğa referans solüsyon ve numuneler 3 ml olarak doldurulmuştur. Hazırlanan NaCl, KCl, FeCl<sub>3</sub> ve MgCl<sub>2</sub> içeren Mannitol çözeltileri ayrı ayrı cihaza yüklenmiştir. Çözelti hazırlanırken kullanılan distile su DTA cihazında referans madde olarak kullanılmıştır. Sonrasında kuyucuklara örnek, referans ve impedans için 3 adet ve alüminyum blok için 1 adet olmak üzere 4 adet prob yerleştirilmiştir. Alüminyum blok hazneye yerleştirilmeden önce, haznenin 1/3' ü sıvı azot ile doldurulmuştur. Cihazda yer alan ısı geçirgen bloğun ısı tank içerisinde sıvı azot yardımı ile başlangıçta -100 °C'ye kadar düşürülmüştür. Tüm problemler 0°C'yi gösterene kadar ısıtma işlemine devam edilmiştir. Sonrasında aktivasyon ile blok ısınmaya başladığında, moleküler hareketlilik başlayana kadarki statik durum monitördeki programda taban çizgisi olarak gözlenmiştir. Cihaz dosyasından ham veriler excel dosyasına aktarılmıştır. DTA eğrisinde, numunenin endotermik değişiminden kaynaklanan sıcaklık

farkları negatif yönde, ekzotermik değişimden kaynaklanan sıcaklık farkları ise pozitif yöndeki sapma olarak değerlendirilmiştir (Andrade ve ark., 2018).

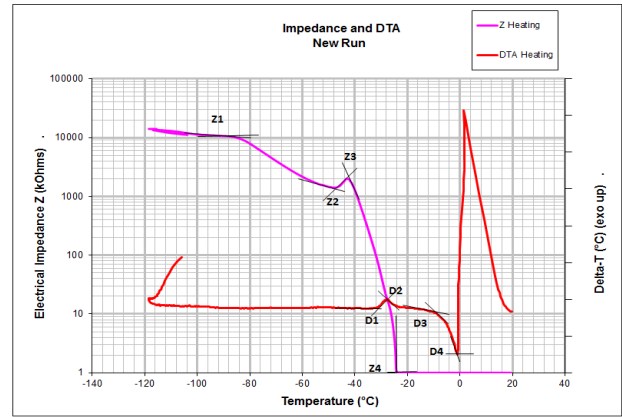
### FDM analizi

FDM donmuş materyalin yapısını mikroskop altında incelemeye izin vermektedir. Çalışma sırasında 16-20 mm çapında quartz lam, mikroskop altına gümüş blok üzerine yerleştirilmiştir. Mikroskopun lamına 2 µl kadar materyal damlatılarak üzerine önce 70 µ yüksekliğinde alüminyum spacer ve sonra 13 mm çapında cam lamel kapatılmıştır. Vakum ve sıcaklık kontrol altında tutularak liyofilizasyon prosesi başlatılmıştır. İlk olarak 20 °C/dk'lık soğutma ivmesi ile ürün sıcaklığının -60 °C'ye soğuması sağlanmıştır. Sonrasında vakum pompası devreye sokularak donmuş ürünün kuruma prosesi başlatılmıştır. Ürün vakum altında sıcaklık dakikada 1°C düşürülerek ısıtılmış ve bu süre boyunca her 10 saniyede mikroskopta elde edilen görüntü kayıt altına alınmıştır. Bu görüntülerde süblimizasyon ara yüzeyinde oluşan değişiklikler gözlemlenmiş ve yapıda bozulmaya sebep olan sıcaklık dereceleri kayıt altına alınmıştır. Böylece her çözelti için liyofilizasyon prosesi incelenmiş ve karşılaştırılmıştır (Meister ve Gieseler, 2009).

### Bulgular

Diferansiyel termal analiz işlemi sonunda elde edilen impedans ve DTA eğrileri Şekil.1 de gösterilmektedir. Şekil üzerinde mor renkte gösterilen impedans eğrisi üzerinde belirlenen Z1 noktası maddelerin yapısında meydana gelen stabilizasyonun ve kararsızlığın başladığı nokta olarak değerlendirilmektedir. Bu sıcaklıkta bu çizgide meydana gelen negatif sapma liyofilizasyon prosesini etkilememektedir. Z2 noktasında meydana gelen yeniden kristalleşmenin ardından Z3 noktasında yapıda yumuşama başlamakta ve bu sıcaklığın üzerinde yapı hızla bozulmaktadır. Bu sıcaklık değeri liyofilizasyon için önemlidir ve kritik

formülasyon sıcaklıklarından birini tanımlamaktadır. Buz kristallerinin hareketlilik ve füzyonu ile ilişkili olarak asgari empedans değeri Z4 olarak gösterilmektedir. Kırmızı olarak gösterilen DTA eğrisi üzerinde işaretli D1 noktası kristalizasyon başlangıcı olarak değerlendirilmiştir. DTA'da elde edilen düz çizgiden (base line) ilk sapmanın başladığı sıcaklık bulunarak maddenin kararlı olduğu sıcaklık limiti belirlenmiştir. D2 de kristalizasyonun inhibisyonu gözlenmiş, D3 de termal erime başlangıcı belirlenmiştir. Aynı zamanda D3, DTA grafiğinde donmuş matrisin dengesizleşmesiyle ilgili olayların göstergesi olan endotermik bir patern başladığını göstermektedir. DTA'daki D4 noktasındaki keskinlik erimeyi ve D3 ile başlatılan mükemmel tanımlanmış bu endotermik pik, buz kristallerinin füzyonunun başladığını göstermektedir. DTA ve Z eğrileri birlikte değerlendirildiğinde DTA'nın ekzotermik piki ile impedansın artmaya başladığı nokta arasındaki ilişki donmuş yapının yeniden düzenlenmesini ifade etmektedir. İmpedans eğrisinin ekzotermik bir pikin ardından aşağı doğru hızla artarak düşüşü ile DTA'daki endotermik pikin başlangıcı donmuş maddenin yumuşadığını maddenin erimeye başlayarak faz değiştirdiğini göstermektedir. Eğriler üzerinde belirli kritik noktalar işaretlenerek Tablo 1 de gösterilmiştir.

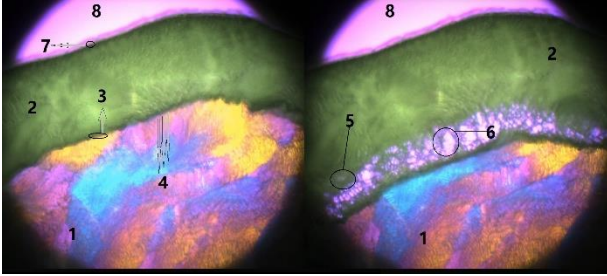


Şekil 1. Diferansiyel Termal Analiz Cihazında Elde Edilen DTA ve İmpedans Isınma Eğrileri

**Tablo 1.** Farklı Mineral Tuzlarını İçeren Mannitol Çözeltilerinin DTA (D) ve İmpedans (Z) Eğrilerinde İşaretlenen Kritik Noktalar

	Z1	Z2	Z3	Z4	D1	D2	D3	D4
NaCl+ Mannitol	-87,53	-47	-42,28	-23,42	-31,4	-27	-9,48	-1,06
KCl+ Mannitol	-86,56	-33,25	-24,38	-13,56	-33,57	-29,16	-8,54	-0,85
MgCl <sub>2</sub> + Mannitol	-117,91	-91,43	-79,74	-26,51	-39,99	-24,95	-9,99	-1,02
FeCl <sub>3</sub> + Mannitol	-99,15	-58,32	-46,98	-24,28	-34,83	-26,94	-9,98	-1
Mannitol	-40,76	-6,71	-3,88	-0,52	-28,11	-24,41	-5,13	-0,08

Dondurulmuş üründeki sıcaklığın artırılması ile FDM de elde edilen görüntü Şekil 2’de verilmiştir. Şekil üzerindeki 8 numaralı alan mikroskop lamını, 1 numaralı alan materyalin donduğu alanı, 2 numaralı alan ise donmanın ardından kurumanın başladığı alanı göstermektedir. 7 numaralı numune hattından başlayan süblimizasyon oranı 4 numara ile gösterilen süblimizasyon hareket yönünde devam etmektedir. 3 numaralı süblimizasyon hattından 1 numaralı donmuş alana doğru süblimizasyon devam ederken çökmenin başladığı noktalar tespit edilmiştir. 5 numaralı bölgede başlayan çökmeler 6 numaralı bölgede tam çökmenin gözlemlenmesiyle daha net fark edilmektedir. Sıcaklık artırılırken gözlemlenen örnek kurutma şeklinin sol tarafında, tam çöküşün yaşandığı (Tc / Teu) sıcaklık değeri ise şeklinin sağ tarafında gösterilmektedir. Kristalizasyon (Tc), çökmenin olabileceği ötektik sıcaklık (Teu) ve erimenin olduğu (Te) sıcaklıkları çalışma sonunda Tablo 2’de verilmiştir.



Şekil 2. Freeze Dry Mikroskop Görüntüsü

**Tablo 2.** Farklı Mineral Tuzlarını İçeren Mannitol Çözeltilerinin DTA ve FDM ile Belirlenen Liyofilizasyon Prosesini Etkileyen Kritik Kontrol Noktaları

	Teu/Tc	Te	Tcry/Tg
NaCl	-40,46	-1,06	-42,28
KCl	-22,56	-0,85	-25,38
MgCl <sub>2</sub>	-77,92	-1,02	-79,74
FeCl <sub>3</sub>	-45,16	-1	-46,98
Mannitol	-2,01	-0,08	-3,88

## Tartışma

Biyolojik maddelerin kurutulmasında koruyucu ajanların kullanılması önemli olmaktadır ve liyofilizasyon öncesi çözeltilerin termal analizleri yapılması gerekmektedir (Zhai ve ark., 2003; Baheti ve ark., 2010). Kurutulduğunda yeterince sağlam bir çatı oluşması açısından dondurarak kurutulacak çözeltinin katı içeriğinin belirli bir derişimde olması istenmektedir (Ito, 1971; Johnson ve ark., 2002). Tuzların liyofilize ürün satabilizörü olarak kullanılması ve konsantrasyon ayarlaması önem arz etmektedir. Tuzlar kristal yapıya sahip olduklarından yüksek konsantrasyonlarda kullanılması hücrenin canlılığını etkilemekte ve

liyofilizasyon sonrasında sağ kalım oranının düşürmektedir. Bu sebeple kullanılan tuzun yapısı ve konsantrasyonunun belirlenmesi gerekmektedir (Hawe ve Frieß, 2006). Kristal iskeletin arasından buharlaşma kolay olduğu için liyofilizasyon sonrası nem oranı düşük olması tuzların avantajı olarak görülmektedir. Diğer yandan amorf yapılar canlı hücreler için mükemmel bir matris oluştururken, su tutuşu yüksek olan bu yapılarda buharlaşma yavaş olmakta ve çoğu zaman bağlı su uzaklaştırılmamaktadır (Shah ve ark., 2006). Bu nedenle de farmakolojik ürünün neminin yüksek depolama süresinin ise kısa olması dezavantaj olarak görülmektedir (Jenning, 1999). Mannitol molekülü liyofilize edilecek numuneleri stabilize etmek yerine sağlam ve zarif kek yapıları sağlayan kristal yapı iskeletleri oluşturmaktadır. Dondurularak kurutma işlemi sırasında kısmi kristalleşme depolanma sırasında amorf fraksiyonun daha sonra kristalleşmesine neden olduğu için, kontrollü ve eksiksiz kristalleşmeler daha değerli olmaktadır. Kısmi kristalleşme, nihai ürünün yapısının bozulmasına ve dolayısıyla raf ömrünün azalmasına neden olduğu için istenmemektedir. Kristalleşme temel olarak, kurutma başlamadan önce ısı işlem sırasında meydana gelmektedir (Horn ve Friess, 2018). Mannitol kendi başına kristal ya da amorf gibi davranabilmektedir (Cavatur ve ark., 2002). Bu nedenle bu çalışma ile belirlenen farklı tuzları içeren mannitol solüsyonlarının liyofilizasyon prosesini etkileyen kritik sıcaklıkları önemli olmaktadır. Bu çalışmada mannitolün Teu ve Tc değerleri yüksek olduğu için (Tablo 2) bu değerler liyofilizasyonun kalitesi açısından başarılı bir sonucu ifade etmektedir (Rey, 1960). Tuzlu mannitol çözeltilerinde ise kritik sıcaklıklar daha düşük bulunmuştur. Özellikle Mg ve Fe tuzları çözeltinin Teu ve Tc değerlerini düşürerek primer kurutmanın daha düşük sıcaklıklarda bitirilmesini gerektirmektedir. Bu nedenle Magnezyum (Mg) ve Demir (Fe) tuzlarının liyofilizasyonda ekşiyan olarak kullanılması tavsiye edilmemektedir. Çünkü bu sonuç zor ve daha masraflı bir primer kurutma prosesini ifade etmektedir. Tüm bunlara rağmen tuzların daha stabil ve kaliteli kuruma sağladıkları ve mannitolün yapısını güçlendirdikleri bilinmektedir (Telang ve ark., 2003).

Çalışmada elde edilen verilere göre (Tablo 1) mannitol çözeltilerine eklenen Sodyum (Na) ve Potasyum (K) tuzları diğer tuzlara göre daha yüksek sıcaklıklarda kararsızlaştıkları için kryoprezervatif olarak tercih edilmelidir. Fakat belirlenen primer kurutma üst limitlerinin 1-3 °C altında primer kurutma bitmiş olması gerekmektedir (Adams ve ark., 2015). Ayrıca belirlenen Tc de maddenin kararlı kalması için sıcaklık-vakum dengesinin iyi



ayarlanması, Te de maddenin içerisinde bağlı su mümkün olduğunca uzaklaşmış olması gerekmektedir (Tablo 2). Tc değerlerinin, çoğu zaman karşılık gelen Tg 'değerlerinden daha yüksek (2-5°C) olduğu rapor edilmiştir (Meister ve ark., 2009).

Donma prosesi ile maddelerin yapısında oluşan buzun süblimasyonunu sağlamak için her solüsyonun kendi üçlü noktasının altındaki sıcaklık ve basınç koşullarında primer kurutması gerçekleştirilmelidir (Tablo 1). Primer kurutma sıcaklığının, kek yapısının kaybını önlemek için mümkün olduğu kadar yüksek, ancak kritik işlem sıcaklığının altında tutulması gerekmektedir (Pikal, 1990). NaCl liyofilizasyonda yaygın olarak kullanılan ekşiyan olduğu için mannitol ile etkileşimi daha çok araştırılmaktadır (Lu ve Pikal, 2004). Na, Mg, K ve Fe tuzlarının nem tutucu özelliğinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Van den Berg ve Rose, 1959, Thorat ve ark., 2017). Na, Mg, K ve Fe tuzlarını içeren mannitol çözeltileri için sunulan çalışma sonuçları dikkate alınarak primer kurutma prosesi düzenlenmesi tavsiye edilmektedir.

## Kaynaklar

- Adams GDJ, Cook I, Ward KR (2015) The principles of freeze-drying. *Methods Mol Biol* 1257:121-143. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_4)
- Andrade ÂL, Militani IA, de Almeida KJ, Belchior JC, dos Reis SC, Costa e Silva RMF, Domingues RZ (2018) Theoretical and experimental studies of the controlled release of tetracycline incorporated into bioactive glasses. *AAPS PharmSciTech* 19 (3), 1287-1296. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0931-x>
- Arshad MS, Smith G, Polygalov E, Ermolina I (2014) Through-vial impedance spectroscopy of critical events during the freezing stage of the lyophilization cycle: the example of the impact of sucrose on the crystallization of mannitol. *Eur. J Pharm Biopharm* 87, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.05.005>
- Baheti A, Kumar L, Bansal AK (2010) Excipients used in lyophilization of small molecules. *J Excipients and Food Chem* 1, 41-54. <https://ojs.abo.fi/ojs/index.php/jefc/article/view/21>
- Cavatur RK, Vemuri NM, Pyne A, Chrzan Z, Toledo-Velasquez D, Suryanarayanan R (2002) Crystallization behavior of mannitol in frozen aqueous solutions. *Pharm Res*, 19 (6), 894–900. <https://doi.org/10.1023/a:1016177404647>
- Day JG, Stacey GN (2007) Cryopreservation and freeze-drying protocols. Human Press, New Jersey.
- Hawe A, Friess W (2006) Impact of freezing procedure and annealing on the physico-chemical properties and the formation of mannitol hydrate in mannitol-sucrose-NaCl formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 64, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.06.002>
- Horn J, Friess W (2018) Detection of collapse and crystallization of saccharide, protein, and mannitol formulations by optical fibers in lyophilization. *Frontiers in Chemistry* 6 (4) 1-9 <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00004>
- Ito K (1971) Freeze drying of pharmaceuticals. Eutectic temperature and collapse temperature of solute matrix upon freeze drying of three component systems. *Chem Pharm Bull* 19 (6), 1095–102. <https://doi.org/10.1248/cpb.19.1095>
- Izutsu K, Yoshioka S, Terao T (1994) Effect of mannitol crystallinity on the stabilization of enzymes during freeze-drying. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 42 (1), 5-8. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.5>
- Jennings AT (1999) Lyophilization, introduction and basic principles. CRC Press, USA.
- Johnson RE, Kirchoff CF, Gaud HT (2002) Mannitol-sucrose mixtures-versatile formulations for protein lyophilization. *Journal Pharm Sci* 91 (4), 914-922. <https://doi.org/10.1002/jps.10094>
- Kasper JC, Friess W (2011) The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality at-tributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm* 78, 248-263. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.010>
- Lu X, Pikal MJ (2004) Freeze-Drying of mannitol-trehalose-sodium chloride-based formulations: the impact of annealing on dry layer resistance to mass transfer and cake structure. *Pharm Dev Technol*, 9 (1), 85-95. <https://doi.org/10.1081/PDT-120027421>
- Lueckel B, Bodmer D, Helk B, Leuenberger H (1998) Formulations of sugars with amino acids or mannitol – influence of concentration ratio on properties of the freeze-concentrate and the lyophilisate. *Pharm Dev Technol*, 3, 325–336. <https://doi.org/10.3109/10837459809009860>
- Martin C, Ross C, Peacock T, Ward K R (2007) Application of electrical impedance analysis for investigation of nutraceutical formulation stability in the frozen state. SET for Britain presented at the House of Commons, London,
- Meister E, Gieseler H (2009) Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures: drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to corresponding glass transition data. *J PharmSci*, 98(9), 3072-3087. <https://doi.org/10.1002/jps.21586>
- Meister E, Šaši S, Gieseler H (2009) Freeze-dry microscopy: impact of nucleation temperature and excipient concentration on collapse temperature data. *AAPS Pharm Sci Tech* 10 (2), 582-588. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9245-y>
- Patel RM, Hurwitz A (1972) Eutectic temperature determination of preformulation systems and evaluation by controlled freeze drying. *J Pharm Sci* 61 (11), 1806-1810. <https://doi.org/10.1002/jps.2600611125>

- Pikal MJ** (1990) The collapse temperature in freeze drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. *Inter J Pharm*, 62, 165-186. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90231-R](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90231-R)
- Pikal MJ** (2001) Lyophilization. In encyclopedia of pharmaceutical technology; Swarbrick, J, Boylan, J.C., Eds.; Marcel Dekker, New York, USA.
- Rey L** (1960) Thermal analysis of eutectics in freezing solutions. *Ann NY Acad Sci* 85(2), 510-34. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb49979.x>
- Shah B, Kakumanu VK, Bansal AK** (2006) Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids. *J Pharm Sci* 95, 1641-1665. <https://doi.org/10.1002/jps.20644>
- Shalaev EY, Franks F** (1996) Crystalline and amorphous phases in the ternary system water-sucrose-sodium chloride. *J Phys Chem*, 100, 1144-1152. <https://doi.org/10.1021/jp951052r>
- Telang C, Yu L, Suryanarayanan R** (2003) Effective inhibition of mannitol crystallization in frozen solutions by sodium chloride. *Pharm Res* 20 (4), 660-667. <https://doi.org/10.1023/a:1023263203188>
- Thorat AA, Forny L, Meunier V, Taylor LS, Mauer LJ** (2017) Effects of chloride and sulfate salts on the inhibition or promotion of sucrose crystallization in initially amorphous sucrose-salt blends *J Agric Food Chem* 65, (51), 11259-11272. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04746>
- Van den Berg L, Rose D** (1959) Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocal system  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$ . *Arch Biochem Biophys*, 81 (2), 319-29. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90209-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90209-7)
- Yu L, Milton N, Groleau E, Mishra D, Vansickle R** (1999) Existence of a mannitol hydrate during freeze-drying and practical implications. *J Pharm Sci* 88, 196-198. <https://doi.org/10.1021/js980323h>
- Zhai S, Taylor R, Sanches R, Slater NKH** (2003) Measurement of lyophilisation primary drying rates by freeze drying microscopy. *Chem Eng Sci* 58 (11), 2313-2323. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(03\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(03)00090-3) andr



## Epidemiological Inspection of Canine Parvoviral Enteritis at Teaching Veterinary Hospital in Chattogram, Bangladesh

Tanvir Ahmad NİZAMİ\*, Abdullah Al SATTAR, Sazedra AKTER, Md. Hafizar RAHMAN, Nurun Nahar CHİSTY, Mohammed Yousuf Elahi CHOWDHURY and Md. Ahasanul HOQUE

Chattogram Veterinary and Animal Sciences University, Zakir Hossain Road, Khulshi, Chattogram, Bangladesh

**ID** Nizami TA 0000-0002-7024-4970 Sattar AA 0000-0002-3255-4601 Akter S 0000-0003-3128-1047 Rahman MH 0000-0003-4637-4289  
Chisty NN 0000-0003-2439-318X Chowdhury MYE 0000-0003-0935-705X Hoque MA 0000-0002-4407-1404

\*Corresponding Author's E-Mail: tanvir.vet@gmail.com

### Abstract

A descriptive epidemiological study followed by a case-control study was conducted using a 5-year data set (January 2013- November 2018) at Teaching Veterinary Hospital (TVH), Chattogram Veterinary and Animal Sciences University (CVASU). Epidemiological data were collected and analyzed by STATA-IC-13 software to estimate the proportionate prevalence of parvoviral enteritis, determine associated risk factors, and describe drug prescription patterns. The proportionate prevalence of parvoviral enteritis was 5.8% (N=568). The proportionate prevalence of parvoviral enteritis was higher in 2016 (21.3%) and spring (February-March) (13.1%). The significant risk factors determined for parvoviral enteritis were winter (OR=4.8, 95% CI: 1.5-14.8), young age (OR=4.5, 95% CI: 2.0-9.9), local breeds (OR=3.7, 95% CI: 1.7-8.1), non-vaccination status (OR=3.5, 95% CI: 1.2-9.7) and male (OR=1.3, 95% CI: 0.5-2.8) ( $p \leq 0.05$ ). Ceftriaxone (51.5%), Cholera saline (66.7%), Ondansetron (45.5%) and Ranitidine (46%) were mostly prescribed drugs for the supportive treatment of parvoviral enteritis. This study provides basic epidemiological aspects of canine parvoviral enteritis at TVH of CVASU, Bangladesh. However, modifying identified risk factors such as ensuring vaccination of young puppies, special care during spring, proper therapeutic management, and effective control measures can reduce the level of the occurrence of parvoviral enteritis in dogs.

Received 8 May 2020  
Accepted 21 December 2020  
Published 30 December 2020

**Keywords:** Parvoviral enteritis, Epidemiology, Drugs, Age, Chattogram

**Cite this article:** Nizami TA, Sattar AA, Akter S, Rahman MH, Chisty NN, Chowdhury MYE, Hoque MA (2020) Epidemiological Inspection of Canine Parvoviral enteritis at Teaching Veterinary Hospital in Chattogram, Bangladesh. Turk Vet J, 2(2):45-53.

### Bangladeş, Chattogram Veteriner Hekimliği Eğitim Hastanesinde Köpek Parvoviral Enteritisinin Epidemiyolojik İncelemesi

#### Özet

Chattogram Veteriner ve Hayvan Bilimleri Üniversitesi (CVASU) Veteriner Hekimliği Eğitim Hastanesi'nde (TVH), tanımlayıcı epidemiyolojik bir çalışma olan vaka-kontrol araştırması, 5 yıllık bir veri seti (Ocak 2013 - Kasım 2018) kullanılarak gerçekleştirildi. Parvoviral enteritin prevalansını, ilişkili risk faktörlerini ve reçete tiplerini ortaya koymak için epidemiyolojik veriler toplanarak STATA-IC-13 yazılımı ile analiz edildi. Orantılı parvoviral enterit prevalansı % 5,8 (N = 568) olarak hesaplandı. Orantılı parvoviral enterit prevalansı 2016 (% 21,3) ve ilkbaharda (şubat-Mart) (% 13,1) daha yüksekti. Parvoviral enterit için önemli risk faktörleri; kiş mevsimi (OR = 4.8, % 95 CI: 1.5-14.8), genç yaş (OR = 4.5, % 95 CI: 2.0-9.9), yerli ırklar (OR = 3.7, % 95 CI : 1.78.1), aşsız olma (OR = 3.5, % 95 CI: 1.2-9.7) ve erkek cinsiyeti (OR = 1.3, % 95 CI: 0.5-2.8) olarak belirlendi ( $p \leq 0.05$ ). Ceftriaxone (% 51.5), Cholera saline (% 66.7), Ondansetron (% 45.5) ve Ranitidin (% 46) parvoviral enteritin destek tedavisi için en çok reçete edilen ilaçlardı. Bu alışma, Bangladeş'teki CVASU TVH'de köpek parvoviral enteritinin temel epidemiyolojik durumunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, yavru köpeklerin aşlanması, ilkbahar boyunca daha özenli yaklaşım gösterilmesi, uygun tedavi yönetiminin gerçekleştirilmesi ve etkili kontrol önlemlerinin alınması gibi bilinen risk faktörlerinin modifiye edilmesiyle, kpeklerde parvoviral enterit oluşma dzeyini azaltabilir.

**Anahtar kelimeler:** Parvoviral enterit, Epidemiyoloji, İlalar, Yaş, Chattogram

### Introduction

Companion animals like dogs and cats play an important role in societies by providing physical, social, and emotional satisfaction to the people (Robertson et al., 2000). In view of the need of dogs in these above aspects, it is necessary to study the various diseases and disease conditions that are producing high morbidity and mortality. Among the viral diseases of dogs, the predominantly occurring

diseases include canine parvoviral enteritis, canine distemper, coronavirus infection, canine hepatitis, canine para-influenza and rabies. Canine parvoviral enteritis is a highly infectious disease of dogs of great concern to pet owners, practicing veterinarians, and scientists due to its high morbidity and mortality rates (Bargujar et al., 2011). However,

systematic epidemiological studies on canine parvoviral enteritis are not enough in Bangladesh.

Canine parvoviral (CPV) enteritis is caused by the virus strains CPV2a, CPV2b, and CPV2c belonging to parvovirus type 2 (CPV-2), and Protoparvovirus type 1 species. Protoparvovirus genus and Parvoviridae family emerged in the 1970s (Decaro and Buonavoglia, 2012; Ortega et al., 2017).

The virus spreads via fecal-oral route through contact with infected faeces or contaminated surfaces and indirectly by contact with contaminated fomites such as clothing, hospital benches and tables, food pans and kennel floors (Foster and Smith, 2011; Hoelzer et al., 2008). This virus causes high morbidity (100%) and frequent mortality up to 10% in adult dogs and 91% in pups (Pandya et al., 2017). Previous studies show that CPV enteritis has a 13.9-42% proportionate prevalence in Bangladesh (Islam et al., 2014; Sen et al., 2016; Hasan et al., 2018; Roy et al., 2018).

Clinical signs of CPV enteritis include fever, anorexia, lethargy, depression, vomiting, mucoid to hemorrhagic diarrhea, and sometimes leukopenia (Prittie, 2004; Markovich et al., 2012). Myocarditis, an acute form, may be seen in neonatal puppies after weeks of infection (Sime et al., 2015). Due to large fluid and protein losses through the gastrointestinal tract, dehydration and hypovolemic shock often develop rapidly (Prittie, 2004).

The significant risk factors include immature dogs less than 6 months old (OR=3.5), unvaccinated puppies (OR=12.7), male dogs (OR=2), breeds (Doberman pinschers, Rottweilers, English Springer Spaniels, Alsatians and indigenous dogs), and seasons like rainy and autumn (July-September, OR=3) (Glickman et al., 1985; Houston et al; 1996).

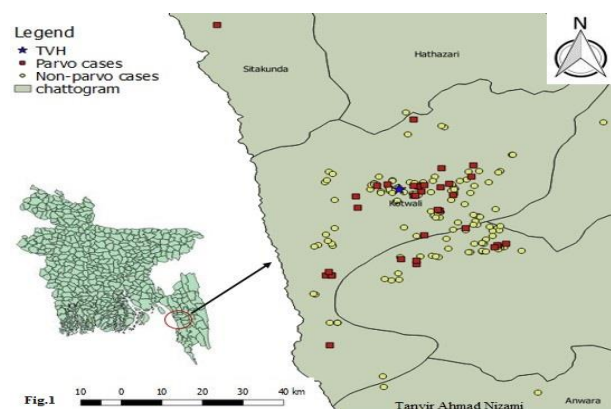
The main prevention and control measure for the disease is vaccination and vigilant disinfection (Mylonakis et al., 2016). Treatment is mainly vigorous supportive management by effectively and adequately replacing lost fluid using poly ionic isotonic dextrose solution, normal saline, lactated ringers' solution given intravenously, in less severe cases subcutaneously or orally (Foster and Smith 2011; Nwoha,2011). Administration of broad-spectrum antibiotics such as cefixime, metronidazole, ticarcillin-clavulanate or enrofloxacin with adequate amount of vitamin B complexes, iron dextrans, antiemetics, analgesics, enteral nutritional support, and anthelmintics are indicated for treatment (Ettinger et al., 1995; Foster and Smith 2011; Mylonakis et al., 2016). Once an infected dog recovers from the disease, it becomes immune for life (Foster and Smith, 2011).

As previously described, Canine parvoviral enteritis causes high morbidity and mortality in dogs and limited studies have previously been conducted in Bangladesh. Therefore, the present research work was undertaken to i) estimate the proportionate prevalence of parvoviral enteritis in dogs, ii) identify risk factors associated with parvoviral enteritis, and iii) describe drug prescription pattern against parvoviral enteritis in Teaching Veterinary Hospital, Chattogram Veterinary and Animal Sciences University, Bangladesh.

## Materials and methods

### Study design and clinical cases

A hospital based descriptive epidemiological study was conducted on different clinical cases of dogs presented at TVH of CVASU, Bangladesh from January 2013 to November 2018. A total of 617 cases were extracted from the paper-based recording system in TVH of which 568 cases were clinically diagnosed by registered and experienced pet veterinarians or clinical faculty of CVASU. The Diagnosis of 49 cases was inconclusive, so they were considered for the present study. However, 248 of 519 (568-49) cases had no missing information which was therefore used for conducting a case-control study as well. All 33 parvoviral enteritis cases without any missing information and randomly selected 142 non-parvo enteritis cases (1 case per 4 controls) (N=215) were considered for the case-control study. The distribution of cases and controls are presented in Figure 1. The figure was produced by spatial data from the online portfolio GPS Geoplaner (<http://www.geoplaner.com>) and analysis of spatial data was done by using QGIS software version 2.18.13 (<http://qgis.org/downloads/>).



**Figure 1.** Distribution cases (parvoviral enteritis) and controls (non-parvo enteritis) in Chattogram Metropolitan area

### **Definition of case and control**

An individual dog with the clinical signs of severe vomiting, diarrhoea, foul smelly dark faeces and fever or hypothermia along with the duration of illness of 3 to 7 days were defined as a parvoviral enteritis case (Foster and Smith, 2011). An individual dog without the above mentioned signs of parvoviral enteritis was treated as a control.

### **Use of epidemiological data**

Date of administration, source, breed, age, sex, weight, temperature, deworming, and vaccination status (combined vaccine of canine distemper, canine adenoviruses, canine parvovirus, parainfluenza type-2, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, and rabies) of parvoviral and non-parvoviral cases were used for the study. Clinical diagnostic information of each dog (parvoviral enteritis or not) was recorded. Prescribed drugs against each patient (parvoviral enteritis) were obtained to assess their pattern of uses.

### **Statistical evaluation**

The extracted data as required from the hospital paper-based recording system were entered into Microsoft Excel 2010 spreadsheet. Data were then cleaned for errors and inconsistencies, sorted, coded and checked for integrity in MS Excel 2010. Afterward, data were exported to STATA-IC-13 (Statacorp, 4905, Lakeway Drive, College station, Texas, USA) for conducting the statistical analysis.

### **Descriptive analysis**

Cases were grouped according to the classes of diseases or disease conditions and then the proportionate prevalence was calculated for each item by using the total number of cases under each item (Numerator) divided by the total number of cases (Denominator), irrespective of classes. Distribution of parvoviral enteritis cases in dogs by year, season and month were also computed. Descriptive statistics on clinical signs of parvoviral enteritis cases in dogs along with prescribed drugs were performed. The results were expressed in frequency numbers and percentages.

### **Risk factor analysis**

Univariable chi-square test was performed to evaluate the association between the binary response variable of parvoviral enteritis case (yes/no) and six independent variables: year classed in terms of three categories (2013-14/2015-16/2017-18), season counted as three categories (summer, monsoon and winter), breed of dog (local/exotic breed), sex (male/female), age as measured in terms of two categories ( $\leq 4$ / $> 4$  months) and status of vaccination (yes/no). Individual variable was categorized to make enough frequency number of each class for increasing power of the statistical test. Univariable logistic regression was conducted to assess the effect of each of the aforementioned six independent variables on the occurrence of parvoviral enteritis cases (yes/no) (Dohoo et al., 2003). Likelihood ratio test (Wald test) with the p value 0.05 or less was used to identify the factor as significant. Multivariate logistic regression was not considered because of variables were highly correlated with each other (Chi-square test,  $p \leq 0.05$ ). The results were presented as odds ratio (OR), 95% confidence interval and p value.

## **Results**

### **Prevalence of canine parvoviral enteritis cases at Teaching Veterinary Hospital**

The proportionate prevalence (PP) of parvoviral enteritis at TVH was 5.8% (N=568) (Suppl. Table 1)

**Suppl. Table 1.** Prevalence of clinical dog diseases or disease conditions registered at Teaching Veterinary Hospital, Chattogram Veterinary and Animal Sciences University, Bangladesh (2013-2018) (N=568)

<b>Diseases or disease condition</b>	<b>No. of cases</b>	<b>%</b>
Parvoviral enteritis	33	5.8
Other diseases or disease condition	535	94.2

### **Distribution of parvoviral enteritis cases in dogs at Teaching Veterinary Hospital**

The PP of parvoviral enteritis was higher in 2016 (21.3%) followed by 2017 (14.6%) and 2014 (6.9%) (Table 1). Spring (13.1%) had higher PP of parvoviral enteritis followed by winter (7.8%), Monsoon (4.4%) and late autumn (4.3%) (Table 2).

**Table 1.** Distribution of parvoviral enteritis cases in dogs registered at Teaching Veterinary Hospital, Chattogram Veterinary and Animal Sciences University (2013-2018) by year (N=568)

Year	No of total cases	Number of parvo cases	% of parvo cases
2013	50	1	2.0
2014	158	4	6.9
2015	141	2	1.4
2016	61	13	21.3
2017	41	6	14.6
2018	117	7	6.0
Total	568	33	5.8

**Table 2.** Distribution of parvoviral enteritis cases in dogs registered at Teaching Veterinary Hospital, Chattogram Veterinary and Animal Sciences University (2013-2018) by Season (N=568)

Season	No of total cases	Number of parvo cases	% of parvo cases
Summer (April-May)	30	0	0.0
Monsoon (June-July)	91	4	4.4
Autumn (August-September)	127	1	0.8
Late Autumn (October- November)	94	4	4.3
Winter (December-January)	104	8	7.8
Spring (February-March)	122	16	13.1

### ***Risk factor analysis for parvoviral enteritis in dogs***

#### ***Univariable analysis***

The proportion of parvoviral enteritis cases significantly varied between the categories of each of the following factors: year, season, breed, age and vaccination status ( $p \leq 0.05$ ) (Table 3)

**Table 3.** Univariable association between parvoviral enteritis cases and the selected factors

Factor	Category	Parvoviral enteritis cases		p
		Yes (%)	No	
Year	2013-14	5 (8.5)	54	0.034
	2015-16	15 (26.8)	41	
	2017-18	13 (21.7)	47	
Season	Summer	6 (18.2)	45	0.003
	Monsoon	4 (12.1)	44	
	Winter	23 (29.5)	53	
Breed	Local	21 (31.3)	46	0.001
	Others	12 (11.1)	96	
Sex	Male	22 (20.2)	87	0.564
	Female	11 (16.7)	55	
Age (Months)	0.1-4	21 (34.4)	40	<0.001
	4.1-156	12 (10.5)	102	
Vaccination	Yes	5 (8.3)	55	0.010
	No	28 (24.4)	87	

P = Probability

#### Univariate logistic regression

The magnitude of parvoviral enteritis in 2015-16 was 5.3 (95% CI: 1.6-16.9) times and 2017-18 was 3.7 (95% CI: 1.1-12.2) times higher odds than that of 2013-14. Winter season had 4.8 times (95% CI: 1.5-14.8) greater odds of parvoviral enteritis compared with monsoon season. Dogs aged less than 4 months had 4.5 (95% CI: 2.0-9.9) times

higher odds of parvoviral enteritis compared with dogs aged between 7 months and 13 years. Local breed had 3.7 (95% CI: 1.7-8.1) times greater odds of parvoviral enteritis than other breeds. Non-vaccinated dogs had 3.5 (95% CI: 1.2-9.7) greater odds of parvoviral enteritis than the vaccinated individuals (Table 4)

**Table 4.** Univariate logistic regression to identify risk factors associated with the binary response variable of parvoviral enteritis in dog

Factor	Category	OR	95% CI	P
Year	2013-2014	1.0		
	2015-2016	5.3	1.6, 16.9	0.005
	2017-2018	3.7	1.1, 12.2	0.03
Season	Monsoon	1.0		
	Summer	1.5	0.3, 5.6	0.573
	Winter	4.8	1.5, 14.8	0.007
Age(month)	4.1-156	1.0		
	0.1-4	4.5	2.0, 9.9	≤0.001
Breed	Others	1.0		
	Local	3.7	1.7, 8.1	0.001
Vaccination	Yes	1.0		
	No	3.5	1.2, 9.7	0.014
Sex	Female	1.0		
	Male	1.3	0.5, 2.8	0.565

OR = Odd ratio; P = Probability

#### Pattern of drug prescribed for parvoviral enteritis cases at Teaching Veterinary Hospital of Chattogram Veterinary and Animal Sciences University

Ceftriaxone (51.5%) was used most frequently for treatment. Besides, cholera saline (66.7%) and Ondansetron (45.5%) were mostly prescribed as fluid therapy and anti-emetics, respectively. In 45.5% of cases, ranitidine was also prescribed. The more details of drug prescribed against parvoviral enteritis cases are presented in Suppl. Table 2.

**Suppl. Table 2.** Patterns of drugs prescribed against parvoviral enteritis at Teaching Veterinary Hospital, Chattogram Veterinary and Animal Sciences University (N=33)

Drugs	Classes	n, Frequency numbers	%
Antibiotics/Sulphur drugs	Ceftriaxone	17	51.5
	Metronidazole	11	33.3
	Amoxicillin	4	12.1
	Oxytetracycline	1	3.0
Antihistaminic	Ranitidine	15	45.5
	Pheniramine maleate	1	3.0
Fluid therapy	Cholera saline	22	66.7
	Dextrose normal saline	8	24.2
	Oral rehydration solution	2	6.1
Steroid	Dexamethasone	4	12.1
Anti-emetics	Ondansetron	15	45.5

## Discussion

The current study explored the proportionate prevalence, risk factors and drug use pattern of parvoviral enteritis in dogs admitted to TVH, CVASU. This section of the report has discussed important findings of the present study, their implications, limitations, conclusion, and recommendations.

This study estimated an overall proportionate prevalence of parvoviral enteritis 5.8%, which is lower than the estimates reported by many previous studies in Bangladesh (13.9% in Dhaka, 30% in Mymensingh and 42% in Chattogram) (Islam et al., 2014; Sen et al., 2016; Hasan et al., 2018; Roy et al., 2018). The variation is due to the lower number of parvoviral enteritis cases recorded in the hospital in contrast to the total number of cases at TVH. The variable prevalence of parvoviral enteritis was also reported in pet dogs of neighboring countries such as 22.7% in Pakistan, 40.9% in India, and 77-80.4% in Thailand (Umar et al., 2015; Behera et al., 2015). This discrepancy of the prevalence of parvoviral enteritis could be due to variation in dog management systems, time and geographical locations (Hiby and Hiby, 2017).

The proportionate prevalence of parvoviral enteritis was higher in recent years (2014, 2016 and 2017) in this study. This might be due to the increased capacity of TVH (diagnostic and veterinary experience) to diagnose the cases along with the increase number of cases presented in recent years. Recent climate changes (temperature, humidity, and rainfall) might have contributed to the more parvoviral enteritis (Clark et al., 2018).

Spring (February-March) had a higher proportionate prevalence of parvoviral enteritis (13.1%) than other seasons. Whereas, Roy et al. (2018) reported 17.5% in summer (April-May) and 12.1% in winter

(December-January) in Dhaka city. However, there are variable reports of seasonal occurrence of parvoviral enteritis in pet dogs in the world. For example, the prevalence of parvoviral enteritis was documented to be higher in summer (June-September) in Pakistan (62%) (Umar et al., 2015) and winter (November-April, peak in January) in Nigeria (17.2% in January) (Shima et al., 2015). The season specific occurrence of parvoviral enteritis could also be related to diurnal temperature differences and changeable climates during these seasons. (Qi et al., 2020).

Winter (December-January) had contributed 4.8 times more odds of parvoviral enteritis compared with other seasons which disagree with the findings of Houston et al. (1996), reported monsoon and autumn seasons (July, August and September) together had 3 times more odds of parvoviral enteritis than other seasons.

Immature dogs ( $\leq 4$  months) had a significantly higher risk of parvoviral enteritis (OR=4.5), consistent with Glickman et al. (1985) who also reported higher risk in immature dogs ( $\leq 6$  months) (OR=3.5). Puppies are very susceptible to this disease due to the low level of maternal antibodies from the disease and vaccination reaction at the same time, leaving the puppies defenseless. Adult dogs are generally resistant to viruses that have been exposed earlier. Immunity to parvoviral enteritis is known to be long lasting except for immunosuppressive dogs (Akgul et al., 2019).

Local breeds had more risk of parvoviral enteritis (OR=3.7) than exotic breeds which disagree with Houston et al. (1996) and Glickman et al. (1985) reported higher risk in exotic breeds. Frequent occurrence in local breeds might be due to their high population density that increases the chances to spread the infection or poor vaccination schedule



being followed by the owners. No specific comments can be made on breed susceptibility as the population density of breeds varies from one geographical area to another (Behera et al., 2015).

Unvaccinated dogs had a higher risk of parvoviral enteritis (OR=3.5), supported by Houston et al. (1996) who reported higher odds (OR=12.7) in unvaccinated dogs than vaccinated dogs. The higher risk of parvoviral enteritis in non-vaccinated dogs may be due to lack of protective immunity (Godsall et al., 2010).

Male dogs had an increased risk of parvoviral enteritis (OR=1.3) than females, which is consistent with Houston et al. (1996) and Glickman et al. (1985) who also reported higher risk in males than females (OR=2). Male dogs have high prevalence which might be due to more chance of exposure to certain behavioral patterns and selective preference of keeping male dogs by pet owners (Behera et al., 2015).

Although antibiotics don't work against any viral disease, these drugs were frequently used in this exploration. Ceftriaxone (in 51.5% cases) and metronidazole (in 33.3% cases) were the prescribed antibiotics to prevent endotoxaemia and secondary bacterial complications. A previous study also explored the antibiotic use in parvoviral enteritis cases (Macinitire, 2004) that suggests the following antibiotics: enrofloxacin, ticarcillin-clavulanate, metronidazole and cefixime. The use of antibiotics in parvoviral enteritis may save dog live by preventing secondary bacterial complications. But they also lead to antibiotic resistance (Llor and Bjerrum, 2014).

Cholera saline was given to 66.7% parvoviral enteritis cases in this study which is justified to replace lost electrolytes because of diarrhea and vomiting. Fluid therapy of 5% dextrose and 0.9% saline was given to a significant number of cases which was the rationale choice to replace lost of fluid and electrolytes. These treatment strategies are in line with Foster and Smith (2011) who said that the recovery of an infected puppy from parvoviral enteritis is dependent on effective and adequate fluid replacement. However, the use of lactated ringers' solution would have been better in replacing lost electrolytes (Nwoha, 2011).

Ondansetron was administered in 45.5% parvoviral cases. The serotonin receptor antagonists (Ondansetron or Dolasetron) may be used in cases of intractable vomiting (Prittie, 2004). However, metoclopramide and maropitant are also effective in reducing the frequency and severity of vomiting (Yalcin and Keser, 2017). Dexamethasone was

administered in 12.1% cases. Glucocorticoids have anti-shock effects in all forms of shock, but they also impair the ability of the body to fight infection. So, it is better to avoid glucocorticoids in viral diseases (Aberdein and Singer, 2005; Tams, 2011).

The study was conducted only in TVH, CVASU and therefore the sample size of parvo enteritis cases was not big enough. Any statistical assumptions were not considered to calculate sample size for the case control study which is a limitation of the study. The cases and controls were recruited from the clinics only which limits the generality of findings. As some of the variables were highly correlated with each other (Chi-square test,  $p \leq 0.05$ ), we were not able to conduct a multivariable logistic regression model to determine potential adjusted effect risk factors on the occurrence of parvoviral enteritis. Missing epidemiological information might have reduced overall study power which restricted the analysis data to conduct only univariable logistic regression as well. Diagnosis of parvoviral enteritis and other cases were mainly done based on history and clinico-epidemiological findings, and the cases were overseen by experienced veterinarians. However, the sensitivity and specificity of clinical-based diagnosis were not out of question. Although a structured record-keeping sheet from hospital-based recording system was used to obtain required epidemiological information we could not completely rule out the recall bias, for example, if the clients could not recall the exact date of deworming/vaccination.

In conclusion, the proportionate prevalence of parvoviral enteritis was 5.8%. The occurrence of parvoviral enteritis was more in recent years and winter months. The risk factors associated with parvoviral enteritis were young age, male, local breed, spring season and non-vaccinated dogs. Administration of fluids with supportive treatment is most important in parvoviral enteritis while broad spectrum antibiotics should be secondary concern. Although the occurrence of parvoviral enteritis is low in this study, modifying identified risk factors (e.g. maintaining vaccination schedule, special hygienic care of puppies, etc.) can reduce the level of parvoviral enteritis.

### **Statement of animal rights**

As the study was conducted through clinico-epidemiological data collection, so there was no existence of animal ethical issues.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Aberdein** J, Singer M (2005) Clinical review: a systematic review of corticosteroid use in infections. *Crit Care* 10:203.
- Akgul** G, Bıçıcı O, Sahın T, Baldaz V, Celik OY, Erdeger A (2019) Clinical pictures and some risk factors associated with canine parvoviral enteritis in dogs at Siirt city of Turkey. *Alex J Vet Sci* 60:10-14. <https://doi.org/10.5455/ajvs.16358>
- Bargujar** J, Ahuja A, Bihani DK, Kataria N, Dhuria D (2011) Studies on prevalence, clinical manifestations and therapeutic management in dogs suffering from canine parvovirus infection. *J Canine Dev Res* 7:9-16.
- Behera** M, Panda SK, Sahoo PK, Acharya AP, Patra RC, Das S, Pati S (2015) Epidemiological study of canine parvovirus infection in and around Bhubaneswar, Odisha, India. *Vet World* 8:33. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.33-37>.
- Clark** NJ, Seddon JM, Kyaw-Tanner M, Al-Alawneh J, Harper G, McDonagh P, Meers J (2018) Emergence of canine parvovirus subtype 2b (CPV-2b) infections in Australian dogs. *INFECT GENET EVOL* 58:50-55. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.013>
- Decaro** N, Buonavoglia C (2012) Canine parvovirus - a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol* 155:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.007>
- Dohoo** I, Martin W, Stryhn H (2003) Veterinary epidemiologic research. AVC Inc., Charlottetown, PE, Canada.
- Ettinger** S, Feldman F, Edward C (1995) Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat. W.B. Saunders Company.
- Foster**, Smith (2011) Parvovirus: serious diarrhea in puppies & dogs. Veterinary and Aquatic Services Department, Foster and Smith, Inc. - 2253 Air Park Road, P.O. Box 100, Rhinelander, Wisconsin, 54501.
- Glickman** LT, Domanski LM, Patronek GJ, Visintainer F (1985) Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis. *J Am Vet Med Assoc* 187:589-594.
- Godsall** SA, Clegg SR, Stavisky JH, Radford AD, Pinchbeck G (2010) Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhoea to PDSA Pet Aid hospitals. *Vet Rec* 167:196-201. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.c3095>
- Gps** Geoplaner online (2019). <http://www.geoplaner.com>. Accessed 2 May 2019
- Hasan** T, Bairagi N, Hossan MM (2018) Prevalence of canine parvovirus infection in dog in relation to CVASU, Bangladesh and VCRI-MVC, India. *Int J Curr Res* 10:67720-67725.
- Hiby** E, Hiby L (2017) Direct observation of dog density and composition during street counts as a resource efficient method of measuring variation in roaming dog populations over time and between locations. *Animals* 7:57. <https://doi.org/10.3390/ani7080057>
- Houston** DM, Ribble CS, Head LL (1996) Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *J Am Vet Med Assoc* 208:542-546.
- Hoelzer** K, Shackelton LA, Holmes EC, Parrish CR (2008) Within-host genetic diversity of endemic and emerging parvoviruses of dogs and cats. *J Virol* 82: 11096-11105. <https://doi.org/10.1128/JVI.01003-08>
- Index** of/downloads-QGIS (2019). <http://qgis.org/downloads>. Accessed 2 May 2019
- Islam** MR, Islam MA, Rahman MS, Uddin MJ, Sarker MAS, Akter L, Alam E (2014) Prevalence of canine parvovirus infection in street dogs in Mymensingh Municipality area, Bangladesh. *Microbes and Health* 3:5-6. <https://doi.org/10.3329/mh.v3i1.19768>
- Llor** C, Bjerrum L (2014) Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther Adv Drug Saf* 5:229-241. <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>
- Macintire** DK (2004) Management of severe parvoviral enteritis. Western veterinary conference. <http://www.vin.com>. Accessed 18 May 2019
- Manzoor** S, Jamil A (2013) Canine parvovirus associated with bloody diarrhea in Labrador retriever pup. *Res J Vet Pract* 1:34-35.
- Markovich** JE, Stucker KM, Carr AH, Harbison CE, Scarlett JM, Parrish CR (2012) Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 241:66-72. <https://doi.org/10.2460/javma.241.1.66>
- Mylonakis** ME, Kalli I, Rallis TS (2016) Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 7: 91. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S80971>
- Nwoha** RIO (2011) Parvoviral enteritis in a dog: case report and review of the literature. *C J Vet Sci* 5:6-10.
- Ortega** AF, Martínez-Castañeda JS, Bautista-Gómez LG, Muñoz RF, Hernández IQ (2017) Identification of co-infection by rotavirus and parvovirus in dogs with gastroenteritis in Mexico. *Braz J Microbiol* 48:769-773. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.008>
- Pandya** MS, Sharma KK, Kalyani HI, Sakhare SP (2017) Study on host predisposing factors and diagnostic tests for canine parvovirus (CPV-2) infection in dogs. *J Anim Res* 7:897-902.
- Pollock** RV, Carmichael LE (1982) Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *J Am Vet Med Assoc* 180:37-42.
- Prittie** J (2004) Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *J Vet Emerg Crit Care* 14:167-176. <https://doi.org/10.1111/j.1534-6935.2004.04020.x>

**Robertson ID**, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RCA (2000) The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol* 30:1369-1377. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00134-X)

**Roy S**, Ahmed SU, Alam S, Chowdhury QMK, Sujaur M (2018) Prevalence of canine parvoviral enteritis in pet dogs at Dhaka city of Bangladesh. *Int J Biol Res* 6:14-17. <https://doi.org/10.14419/ijbr.v6i1.9374>

**Sen S**, Rahman MS, Nag M, Rahman MM, Sarker RR, Kabir SL (2016) Prevalence of canine parvovirus and canine influenza virus infection in dogs in Dhaka, Mymensingh, Feni and Chittagong districts of Bangladesh. *Asian J Med Biol Res* 2:138-142. <https://doi.org/10.3329/ajmbr.v2i1.27579>

**Qi S**, Zhao J, Guo D, Sun D (2020) A Mini-Review on the Epidemiology of Canine Parvovirus in China. *Front Vet Sci*, 7:5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00005>

**Shima FK**, Apaa TT, Mosugu JI (2015) Epidemiology of canine parvovirus enteritis among hospitalized dogs in Effurun/Warri metropolitan region of Delta state,

Nigeria. *O A Lib J* 2:1-7. <https://doi.org/10.4236/oalib.1101208>

**Sime TA**, Powell LL, Schildt JC, Olson EJ, 2015. Parvoviral myocarditis in a 5-week-old Dachshund. *J Vet Emerg Crit Care* 25:765-769. <https://doi.org/10.1111/vec.12347>

**Tams TR** (2011) Managing patients with parvoviral enteritis. <http://veterinarycalendar.dvm360.com>. Accessed 19 May 2019

**Thomson GW**, Gagnon AN (1978) Canine gastroenteritis associated with a parvovirus-like agent. *Can Vet J* 19:346.

**Umar S**, Ali A, Younus M, Maan MK, Shahzad A, Khan WA, Irfan M (2015) Prevalence of canine parvovirus infection at different pet clinics in Lahore, Pakistan. *Pak J Zool* 47:657-663.

**Yalcin E**, and Keser GO (2017) Comparative efficacy of metoclopramide, ondansetron and maropitant in preventing parvoviral enteritis-induced emesis in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 40: 599-603.




## CD3, CD79 $\alpha$ , Vimentin, $\alpha$ -Smooth Muscle Actin, S100 and Cytokeratin 5/6 Expression in Immunohistochemical Characterization of Dogs with Transmissible Venereal Tumors

Emin KARAKURT<sup>1\*</sup>, Mushap KURU<sup>2</sup>, Serpil DAG<sup>1</sup>, Enver BEYTUT<sup>1</sup>, Hilmi NUHOGLU<sup>1</sup>, Murat Can DEMİR<sup>2</sup>, Ayfer YILDIZ<sup>3</sup>, Cihan KACAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kafkas University, Veterinary Faculty, Pathology Department, 36100, Kars, Turkey

<sup>2</sup>Kafkas University, Veterinary Faculty, Department of Obstetrics and Gynecology, 36100, Kars, Turkey

<sup>3</sup>Kafkas University, Institute Health Sciences, 36100, Kars, Turkey

 Karakurt E 0000-0003-2019-3690 Kuru M 0000-0003-4409-251X Dağ S 0000-0001-7667-689X Beytut E 0000-0003-3360-2940

Nuhoglu H 0000-0003-2530-2542 Demir MC 0000-0002-3803-069X Yıldız A 0000-0002-6569-5435 Kaçar C 0000-0002-2642-697X

\*Corresponding Author's E-Mail: mehmeteminkarakurt@hotmail.com

### Abstract

Transmissible Venereal Tumor (TVT) is a highly contagious round cell tumor and its origin is unknown. In our study, we aimed to evaluate CD3, CD79 $\alpha$ , vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin, S100, and cytokeratin 5/6 expressions immunohistochemically in order to reveal the cellular characterization of TVT. The material of this study consisted of ten dog tissue sections, six females and four males diagnosed with TVT. Tissue samples from dogs were fixed in a 10% buffered formaldehyde solution. After routine tissue procedures follow-up, Hematoxylin & Eosin stain was applied to the sections and investigated under a light microscope. The smear prepared from the tumor was examined with the Diff-Quick method for cytologically. Immunohistochemical staining was performed on the tissues using the avidin-biotin immune peroxidase complex method. Based on macroscopic, histopathological and cytological findings, we decided that the cases were TVT. All cases were negative for all markers except vimentin expression in round tumoral cells. The negative immunoreactivity of CD3, CD79 $\alpha$ ,  $\alpha$ -smooth muscle actin, and cytokeratin 5/6 in tumor cells suggests that the origin of the tumor is not lymphocytic, smooth muscle cells or epithelial. Only the option of histiocytic origin remains.

Received 3 July 2020  
Accepted 5 November 2020  
Published 30 December 2020

### Key words:

Dog, immunophenotype, transmissible venereal tumor

**Cite this article:** Karakurt E, Kuru M, Dag S, Beytut E, Nuhoglu H, Demir MC, Yıldız A, Kaçar C (2020) CD3, CD79 $\alpha$ , Vimentin,  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin, S100 and Cytokeratin 5/6 Expression in Immunohistochemical Characterization of Dogs with Transmissible Venereal Tumors. Turk Vet J, 2(2):54-61.

### Köpeklerin Bulaşıcı Veneral Tümörlerinin İmmunohistokimyasal Karakterizasyonunda CD3, CD79 $\alpha$ , Vimentin, $\alpha$ -Smooth Muscle Actin, S100 ve Sitokeratin 5/6 Ekspresyonları

#### Özet

Bulaşıcı Veneral Tümör (BVT) oldukça bulaşıcı, yuvarlak hücreli bir tümördür ve tümörün kökeni bilinmemektedir. Bu çalışmamızda BVT'nin hücresel karakterizasyonu ortaya koymak amacıyla CD3, CD79 $\alpha$ , vimentin,  $\alpha$ -düz kas aktin, S100 ve sitokeratin 5/6 ekspresyonlarını immunohistokimyasal olarak değerlendirmeyi amaçladık. Bu çalışmanın materyalini altısı dişi ve dördü erkek olmak üzere toplamda on adet BVT teşhisi konulmuş kesit oluşturdu. Köpeklerden alınan doku kesitleri %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Rutin doku işlemleri ardından kesitlere Hematoksilen & Eozin boyası uygulandı. Kesitler ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Sitolojik incelemeler için kitlelerden alınan smearlere Diff-Quick metodu uygulandı. İmmunohistokimyasal boyama olarak avidin biotin immune peroksidaz kompleksi yöntemi uygulandı. Makrosobik, histopatolojik ve sitolojik bulgular temelinde vakalara TVT teşhisi konuldu. Tüm vakalar yuvarlak tümör hücrelerinde vimentin ekspresyonu dışında tüm belirteçler için negatifti. CD3, CD79 $\alpha$ , S100, sitokeratin 5/6 and  $\alpha$ -düz kas aktin immunoreaktivitesi açısından negatiflik tümörün kökeninin lenfositler, düz kas hücreleri ya da epitelyal kökenli olmadığını düşündürmektedir. Geriye kalan tek seçenek tümörün histiyositer kökenli olabileceği yönündedir.

**Anahtar sözcükler:** Bulaşıcı veneral tümör, immunfenotip, köpek

### Introduction

Transmissible Venereal Tumor (TVT), also known as Sticker's tumor, transmissible lenfosarcoma, venereal granuloma, infectious sarcoma, is a benign tumor of dogs (Pir Yağcı & Kalender 2008). TVT is an immune related highly contagious round cell tumor and its origin is unknown (Park et al. 2006;

Farjanikish 2017). This tumor, especially seen in sexually active and young female dogs, is transmitted among dogs through mating (Çeşme et al. 2015). Transmission can also occur via behavioral social expressions such as biting, sniffing or licking (Sudjaidee et al. 2015).

The tumor is mostly seen in external genital organs and less frequently in internal genital organs (Oruç et al. 2011). In female dogs, the localization of the tumor is usually in the posterior aspect of the vagina, where it usually joins the vestibule. Sometimes it surrounds the urethral orifice and can come out of the vulva. The tumor is located especially on the penis in male dogs, it can sometimes be observed on the prepuce (Akkoc et al. 2017). Although this tumor has been detected in many regions worldwide, it is more common in dogs that show free movement populations in tropical and subtropical countries (Özenç et al. 2016; Oguş & Özmen 2018). There are opinions of different researchers that the tumor may be of different cell origin, such as lymphocyte, histiocyte, and reticulum cells (Çizmecı et al. 2012). It is thought that it may be associated with a viral agent (Uçar 2016).

CD3 is a surface antigen specific for T lymphocytes, indicating the T cell distribution in tissues. Normally, CD3 has both inducer suppressive cytotoxic effects in mature peripheral T lymphocytes. In immunohistochemical analysis, it interacts with the epsilon chain and reacts in T cells (Beverley 1981; Mukaratirwa & Gruys 2003). CD79 is a transmembrane protein that complexes with B cell receptors and consists of two chains, CD79A and CD79B. CD79 antigen B forms part of the lymphocyte receptor complex and plays a role in mediating the transport of IgM to the cell surface. CD79 is not found in myeloid and T cells. Therefore, it is stained to identify B cell neoplasms (Astsaturov 1996; Milner 1996; Pérez et al. 1998). Vimentin is one of the 5 main types of cytoplasmic intermediate filaments and is the first type 3 intermediate filament to be expressed in all mesenchymal embryonic cells. Endothelial cells are found in mesenchymal origin cells such as fibroblast and vascular smooth muscle cells. They also constitute the important skeletal structure of these cells (Rosai 1996; Marchal et al. 1997; Tosun 2009). Vimentin is also expressed by TVT cells (Araújo et al. 2012). Cytokeratin 5 / 6 is a cytoplasmic intermediate filament produced mainly in keratinized and non-keratinized epithelium, prostate basal cells, salivary gland and breast cells (David et al. 2003; Akpınar, 2010). The S100 protein is used to distinguish the infectious venereal tumor of dogs from amelanotic melanoma. While amelanotic melanomas express the S100 protein, the infectious venereal tumor of dogs does not express this protein (Sandusky et al. 1987; Mozos et al. 1996).  $\alpha$ -smooth muscle actin, encoded by the ACTA2 gene, is an isoform of vascular smooth muscle actin. Typically expressed in vascular smooth muscle cells that contribute to vascular motility and contraction (Yuan, 2015). This

antibody has specificity to muscle cells (Mukaratirwa and Gruys, 2003).

In this study, we aimed to evaluate CD3, CD79  $\alpha$ cy, vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin, S100, and cytokeratin 5/6 expressions immunohistochemically in order to reveal the cellular characterization of Kangal and Kangal hybrid dogs with TVT.

## Materials and methods

### *Animals and ethics committee*

The material of this study consisted of ten dog tissue sections, six females and four males diagnosed with TVT, with histopathological findings brought to our department between 2010 and 2020. Metastatic cases were not found in clinical and radiographic examinations. When the routine treatments of the patients were completed in the clinic, they were discharged. Sex, breed, age, location of the tumor, stage, and metastasis information of the animals were given in Table 1. The ethics committee report of this study was obtained from Kafkas University Animal Experiments Local Ethics Committee.

### *Histopathological, Diff-Quick and immunohistochemical methods*

Tissue samples from dogs were fixed in a 10% buffered formaldehyde solution. After routine tissue procedures follow-up, 5  $\mu$ m thick sections were taken from paraffin blocks. To reveal histopathological changes, Hematoxylin & Eosin (H&E) stain was applied to the sections. Sections were investigated under a light microscope (Olympus Bx53) and photographed with Cell ^P Program (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, 3,4). The smear taken as sliding over the mass was used with the Diff-Quick method for cytological examinations. Diff-Quick staining, a modified version of Giemsa staining, is one of the fastest methods. This method used in our clinical routine is easy and reliable to apply. Swaps and smear samples were taken from the masses in the vagina or penis. Spread the sample onto the slide and dry it. For Diff-Quick staining, methanol is kept for 20 seconds in fixative, 20 seconds in orange solution (solution I), 20 seconds in purple solution (solution II), and 10 seconds in distilled water. It was then kept in ethanol (95%) for 10 seconds, dried in air, and kept in xylol for 15 seconds, then sealed with entellan (Dinç 2005). Immunohistochemical staining was performed on the tissues using the avidin-biotin immune peroxidase complex method. For immunohistochemical staining, sections of 4  $\mu$ m thick from paraffin blocks were rehydrated.

**Table 1.** Sex, breed, age, location of the tumor, stage and metastasis information of the animals

Case No	Sex	Breed	Age	Location	Stage	Metastasis
Case 1	Female	Kangal	3	Vagina	Progression	-
Case 2	Female	Kangal	5	Vagina	Progression	-
Case 3	Male	Kangal	5	Penis	Progression	-
Case 4	Female	Kangal hybrid	5	Vulva	Progression	-
Case 5	Male	Kangal	4	Prepuce	Progression	-
Case 6	Female	Kangal hybrid	5	Vagina	Progression	-
Case 7	Male	Kangal	3	Penis	Progression	-
Case 8	Male	Kangal hybrid	4	Penis	Progression	-
Case 9	Female	Kangal	5	Vulva	Progression	-
Case 10	Female	Kangal	4	Vagina	Progression	-

To prevent endogenous peroxidase activity, the sections were treated with 3% hydrogen peroxide solution for 15 minutes. The microwave method was applied to the sections to reveal the antigenic receptors (Citrate Buffer Solution pH 6 for 25 min). In order to prevent nonspecific staining, the sections were incubated for 30 minutes with non-immune serum (Genemed Biotechnologies REF 54-0003). Following treatment with Phosphate Buffered Salt Solution (PBS) with different antibodies; (CD3: Thermo Fisher Scientific, MA1-90582, ready to use), (CD79 $\alpha$ : Thermo Fisher Scientific, SP7, Dilution Ratio 1:400), (Vimentin: Thermo Fisher Scientific, SP-20, ready to use), ( $\alpha$ -smooth muscle actin Ab-1: Thermo Fisher Scientific, 1A4, ready to use), (S100: Thermo Fisher Scientific, 4C4.9, ready to use) and (Cytokeratin 5/6: Thermo Fisher Scientific, D5/16 B4, ready to use) were incubated for overnight. The sections were washed 3 times in PBS solution for 5 minutes, and the biotinylated secondary antibody (Genemed Biotechnologies REF 54-0003) was applied to them at room temperature for 30 minutes. After washing in PBS (3-5 min), all sections were incubated with peroxidase-bound Strep Avidin (Genemed Biotechnologies REF 54-0003) for 30 minutes. A solution of 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Genemed Biotechnologies REF 10-0048) was used as color revealing substrate. The sections were stained with Mayer Hematoxylin and coated with immune mount. While primary antibodies were not applied to negative control sections, diluted normal serum was applied to these sections. The sections prepared after the covering were examined under a light microscope (Olympus Bx53) and photographed via the Cell^P program (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, 3,4).

## Results

### Macroscopical results

Female dogs brought to our clinic with complaints of bloody discharge in the vulva, external appearance of the mass and frequent licking of the area, and male dogs with swelling in the penis / prepuce area, sometimes with serosanguinous or hemorrhage.

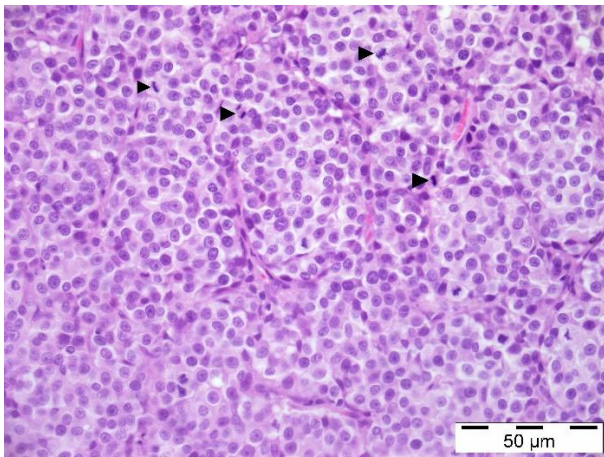
When examined clinically, masses have cauliflower appearance, nodular structure, ranging from 5 mm to 15 mm, with a crunchy consistency, ulcers with ulcers and/or inflammation, sometimes with bleeding were determined. In females, it was determined that the masses were located in the vagina and vulva, whereas in males, the masses were located in the caudal part of the penis. None of the patients brought to our clinic has a history of chemotherapy before. Besides, we learned from the animal owners that they encountered such a situation for the first time in the anamnesis information received. (Figure 1).



**Figure 1.** Macroscopic appearance of the tumor

### **Histopathological Results**

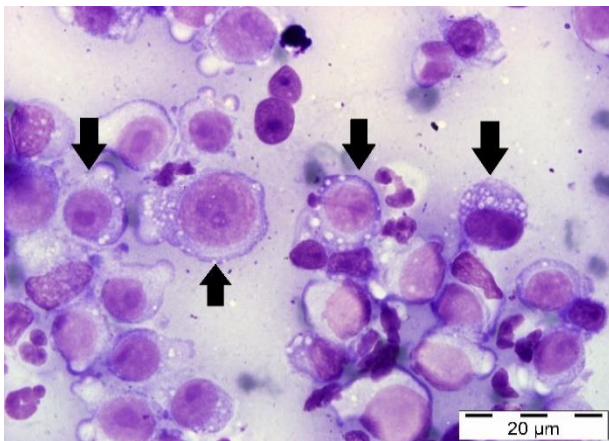
In histopathological examination, we observed that tumor cells as confluent layers or solid masses. We detected tumor cells with hyperchromatic nuclei surrounded by thin stroma. The nuclei of the tumor cells were eccentrically located. In addition, we detected the presence of a large number of mitotic figures. When the developmental stages of the tumors were examined, we determined that all of them were in the stage of progression. We demonstrated mononuclear cell infiltrations, mostly lymphocytes, among tumor cells. Necrosis and hemorrhage in some cases were other remarkable findings (Figure 2).



**Figure 2.** Tumor cells surrounded by thin stroma, and mitotic figures (arrowheads), H&E, Bar=50  $\mu$ m.

### **Cytological Results**

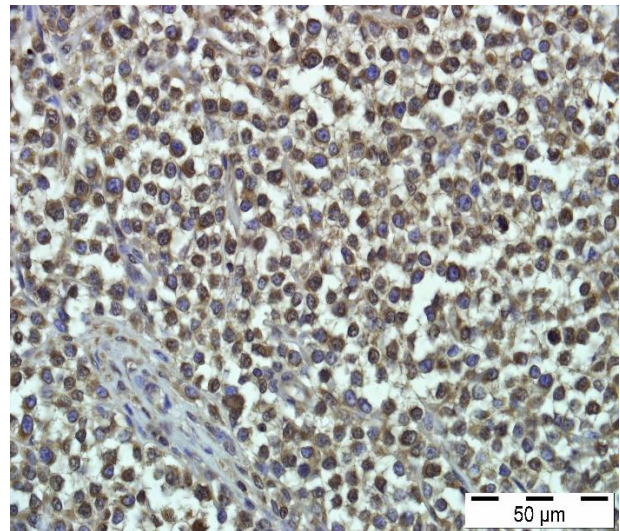
In cytological examinations, we detected tumor cells with large and vacuolar cytoplasm, hyperchromatic and prominent nuclei. We also found that the nucleus / cytoplasm ratio increased in favor of the nucleus. The increase in the nucleoli number was one of the other cytological findings. (Figure 3).



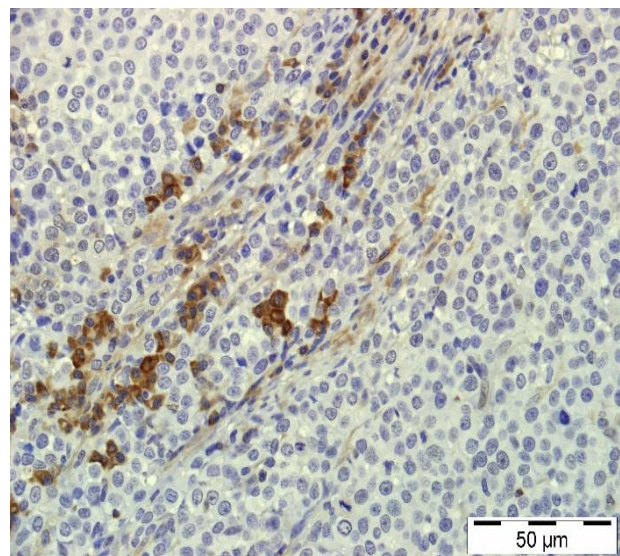
**Figure 3.** Cytological appearance of TVT cells (arrows), Diff-Quick, Bar=20  $\mu$ m.

### **Immunohistochemical Results**

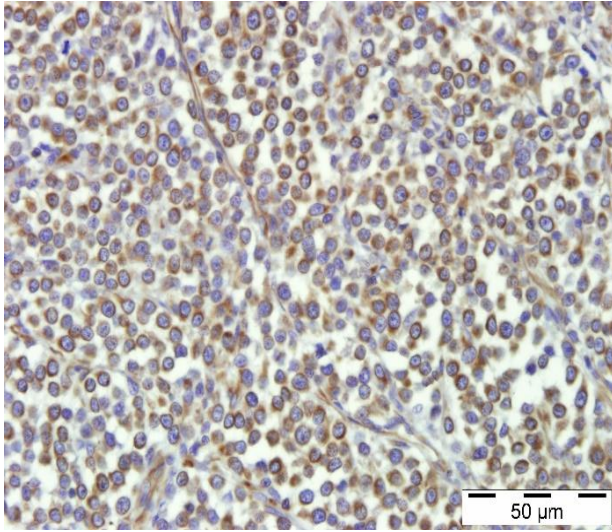
CD3 immunoreaction was strongly with intra- and peritumoral infiltrated lymphocytes. We did not detect CD3 immunoreactivity in TVT tumoral cells (Figure 4). We observed that CD79 $\alpha$ cy expression in intra-tumoural infiltrating lymphocytes and plasma cells very strong (Figure 5). We detected vimentin expression in round tumoral cells. The cytoplasm of cells was stained densely (Figure 6).  $\alpha$ -smooth muscle actin expression was observed in stromal cells and muscle cells from blood vessel walls (Figure 7). All TVT cases were negative for S100 and cytokeratin 5/6 immunoreactivity (Table 2).



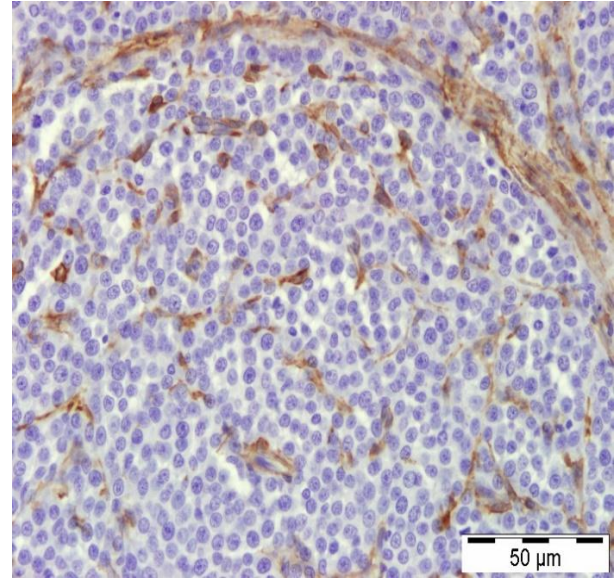
**Figure 4.** CD3 expression in intra-tumoural infiltrating lymphocytes, IHC, Bar=50  $\mu$ m.



**Figure 5.** CD79 $\alpha$ cy+ diffuse cytoplasmic expression in intra-tumoural infiltrating lymphocytes, IHC, Bar=50  $\mu$ m



**Figure 6.** Vimentin expressions in round tumoral cells, IHC, Bar=50 µm.



**Figure 7.** α-Smooth Muscle Actin expression in stromal cells and muscle cells, IHC, Bar=50 µm.

**Table 2.** IHC marker expressions of all animal

Case No	CD3	CD79acy	Vimentin	α-Smooth Muscle Actin	S100	Cytokeratin 5/6
Case 1	-	-	+	-	-	-
Case 2	-	-	+	-	-	-
Case 3	-	-	+	-	-	-
Case 4	-	-	+	-	-	-
Case 5	-	-	+	-	-	-
Case 6	-	-	+	-	-	-
Case 7	-	-	+	-	-	-
Case 8	-	-	+	-	-	-
Case 9	-	-	+	-	-	-
Case 10	-	-	+	-	-	-

## Discussion

Although TVT is more common in all breeds, 2-8 years old, sexually active free-roaming animals, it has been detected more often in female (64.5%) dogs than in male (35.5%) dogs (Pir Yağcı and Kalender, 2008; Oruç et al., 2011; Oguş and Özmen, 2018). Similar to the literature data, six of the ten TVT cases that constituted our study were female and the mean age was between 3 and 5 (Pir Yağcı and Kalender, 2008; Oruç et al., 2011; Oguş and Özmen, 2018). Although there was no dog breed that TVT showed particularly affinity, most of the dogs in our study were Kangal and Kangal hybrid. In female dogs, the localization of the tumor is usually in the posterior aspect of the vagina, where it usually joins the vestibule. The tumor sometimes surrounds the urethral orifice and can come out of the vulva. In male dogs, the localization of the tumor is mostly on the penis. It can sometimes be observed

on the prepuce (Çeşme et al., 2015; Akkoc et al., 2017; Farjanikish et al., 2017). Similar to literature data, we found tumors mostly on the vagina and vulva in female dogs, and on the penis and prepuce in male dogs.

Cytology, histopathology, immunohistochemical staining and molecular methods are used for definitive diagnosis of this tumor (Nak et al., 2004; Park et al. 2006). Macroscopically, tumoral masses are nodular, irregular and fragile, and may show ulceration. The tumor may have cauliflower-like shape, and may also be nodular, papillary or multilobular (Vermooten, 1987; Mısırlıoğlu et al., 1999; Özyurtlu et al., 2008). Microscopically, regular-sized dense cells arranged in solid masses and confluent sheets interlaced by a thin fibrous stroma (Akkoc et al., 2017; Farjanikish et al., 2017). Tumor cells have been found to have vesicular



structures, large oval or round nuclei and prominent hyperchromatic nucleoli, with vacuolar cytoplasm (Nak et al., 2004; Özyurtlu et al., 2008). The nucleus / cytoplasm ratio has been reported to increase in favor of the nucleus (Farjanikish et al., 2017). In some areas, the presence of mononuclear cells in the focal areas between tumor cells has been revealed (Gülbahar and Hazıroğlu, 1995; Park et al., 2006). Increased mitotic activity, anisonucleosis, anisocytosis, necrosis and hemorrhage in tumors are also common findings (Oruç et al., 2011; Özenç, 2016; Oguş and Özmen, 2018). Fibrovascular stroma is scanty in the early stage of the tumor and quite abundant in the following stages (Agnew and MacLachlan, 2017). In cytological examinations, round or oval polyhedral cells are mostly seen with thin cytoplasm with the eosinophilic vacuole, round hyperchromatic nucleus, nucleolus and a reasonable number of mitotic figures (Mısırlıoğlu et al., 1999; Pir Yağcı and Kalender, 2008; Çizmeci et al., 2012; Çeşme et al., 2015). In addition, the ratio of nucleus / cytoplasm increased in favor of the nucleus (Park et al., 2006; Özyurtlu et al., 2008; Ayala-Díaz et al., 2019). TVT cases presented in our study were also evaluated in accordance with the results reported in previous studies in terms of macroscopic, histopathological and cytological features.

The phenotype of TVT is controversial, while some researchers focus on a histiocytic origin, but it is also claimed to be an immature leukocyte phenotype and myeloid origin (Alzate et al., 2019). CD3 antibody shows cellular affinity especially to T lymphocytes (Mukaratirwa and Gruys, 2003). Various researchers have reported that tumoral cells are negative for CD3 expression. They have observed CD3 positive reactions especially in infiltrating lymphocytes located in and around the tumoral tissue (Mozos et al., 1996; Marchal et al., 1997; Pérez et al., 1998; Araújo et al., 2012). The CD3 positive reaction increases in the infiltrating regressive stage of TVT and can be used as an important marker in distinguishing TVT from lymphomas (Mozos et al., 1996). In accordance with the literature data, we detected CD3 positive reactions especially in the cytoplasm of lymphocytes, which are abundant in tumoral areas. It was noteworthy that tumoral cells were negative in terms of CD3 reaction. CD79 $\alpha$  antibody show cellular affinity especially to B lymphocytes (Pérez et al., 1998). As previously reported (Pérez et al., 1998; Araújo et al., 2012), tumoral cells were negative in terms of CD79  $\alpha$  expression. Cells that received a positive reaction were particularly B lymphocytes and plasma cells. In parallel with the literature data, we found that CD79 $\alpha$  expression in intra-tumoural infiltrating lymphocytes and

plasma cells very strong. Vimentin is an important marker of mesenchymal cells and is also expressed by TVT cells (Araújo et al., 2012). In previous studies (Sandusky et al., 1987; Mozos et al., 1996; Marchal et al., 1997; Mukaratirwa et al., 2004; Araújo et al., 2012), the researchers have demonstrated that all TVT cases reacted positively by vimentin immunohistochemically. Similar to literature data, we found the reaction of vimentin positive in all cases. S100 protein is an important protein used in the differential diagnosis between TVT and amelanotic melanoma (Mozos et al., 1996). It has been reported by various researchers that TVT is negative in terms of S100 expression (Sandusky et al., 1985; Sandusky et al., 1987; Mozos et al., 1996; Pereira et al., 2000). Similar to the literature data, we detected S100 negative reactions in all TVT cases. As previously reported (Marchal et al., 1997; Mukaratirwa and Gruys, 2003; Mukaratirwa et al., 2004)  $\alpha$ -smooth muscle actin was negative for all TVT cases. We did not detect the  $\alpha$ -smooth muscle actin reaction of tumor cells. However, the reaction was observed in stromal cells and muscle cells from blood vessel walls. Various researchers have mentioned cytokeratin expressions were negative in TVT cases (Sandusky et al., 1987; Mozos et al., 1996; Pereira et al., 2000; Mukaratirwa and Gruys, 2003). We could not determine the cytokeratin 5/6 reaction in tumoral cells.

In conclusion, the negative immunoreactivity of CD3, CD79  $\alpha$ cy+,  $\alpha$ -smooth muscle actin and cytokeratin 5/6 in tumor cells suggests that the origin of the tumor is not lymphocytic, smooth muscle cells or epithelial. Only the possibility of histiocytic origin remains. However, some researchers have claimed that the tumor is not of histiocytic origin as a result of their immunohistochemical examinations (Mascarenhas et al., 2014). We conclude that S100 and vimentin are usable markers in the differential diagnosis of TVT. In order to get more precise results, we believe that molecular methods should be used and the number of samples should be increased.

### **Conflict of Interest Statement**

The authors declare no conflicts of interest with respect to the publication of this manuscript.

## References

- Agnew DW, MacLachlan NJ (2017)** Tumors of the genital systems. In : Moulton JE (ed) Tumors of domestic animals, 5th edn, Wiley Blackwell, Iowa, pp 356-424
- Akkoc A, Nak D, Demirer A, Şimşek G (2017)** Immunocharacterization of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in canine transmissible venereal tumors. *Biotech Histochem* 92:100-106. <https://doi.org/10.1080/10520295.2016.1259500>
- Akpınar E (2010)** Malign plevral mezoteyomlarda doku mikroyarı yöntemlerle immünohistokimyasal incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye
- Alzate JM, Montoya-Florez LM, Pérez JE, Rocha NS, Pedraza-Ordóñez FJ (2019)** The role of the multi-drug resistance 1, p53, b cell lymphoma 2, and bcl 2-associated X genes in the biologic behavior and chemotherapeutic resistance of canine transmissible venereal tumors. *Vet Clin Pathol* 48:730-739 <https://doi.org/10.1111/vcp.12805>
- Araújo MR, Preis IS, Lavallo GE, Cassali GD, Ecco R (2012)** Histomorphological and immunohistochemical characterization of 172 cutaneous round cell tumours in dogs. *Pesq Vet Bras* 32:772-780 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000800016>
- Astsaturov IA, Matutes E, Morilla R, Seon BK, Mason DY, Farahat N, Catovsky D (1996)** Differential expression of B29 (CD79b) and mb-1 (CD79a) proteins in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 10:769 - 773.
- Ayala-Díaz S, Jiménez-Lima R, Ramírez-Alcántara KM, Lizano M, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, Arroyo-Ledezma J, Manzo-Merino J (2019)** Presence of Papillomavirus DNA sequences in the canine transmissible venereal tumor (CTVT). *PeerJ* 7:e7962. <https://doi.org/10.7717/peerj.7962>
- Beverley PCL (1981)** Anti-CD3 (T Cell). *Eur J Immunol* 11: 329-334.
- Çeşme H, İpek V, Akkoç A, Salcı H (2015)** Bir köpekte primer intranasal transmissible venereal tümör (TVT). *Uludağ Univ J Fac Vet Med* 34:85-88. <https://doi.org/10.30782/uluvfd.393266>
- Çizmeçi SÜ, Köse AM, Aydın İ, Dinç DA, Maden M, Köse Sİ (2012)** Transmissible venereal tümörlü dişi köpeklerde otojen aşı uygulaması. *Eurasian J Vet Sci* 28:220-223.
- David EE, Rosalie E, George FM, Xiaowei X (2003)** Benign pigmented lesions and malignant melanoma. In: David EE (ed): *Lever's Histopathology of the Skin*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 715-804
- Dinç DA (2005)** Karnivorlarda infertilite In: Alaçam E (ed): *Evcil hayvanlarda doğum ve infertilite*. Medisan, Ankara, pp 331-336
- Farjanikish G (2017)** Morphoathological description of an extra genital canine transmissible venereal tumor. *J Fac Vet Med Istanbul Univ* 43:74-76. <https://doi.org/10.16988/iuvfd.266473>
- Gülbahar MY, Hazıroğlu R (1995)** Bir köpekte ekstragenital metastazlı transmissible venereal tümör olgusu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 42:441-445.
- Marchal T, Chabanne L, Kaplanski C, Rigal D, Magnol JP (1997)** Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. *Vet Immunol Immunopathol* 57:1-11. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(96\)05757-1](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(96)05757-1)
- Mascarenhas MB, Peixoto PV, Ramadinha RR, Yamasaki EM, Costa SZR, Driemeier D, Sonne L, França TN (2014)** Immunohistochemical study of genital and extragenital forms of canine transmissible venereal tumor in Brazil. *Pesq Vet Bras* 34:250-254. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000300009>
- Mısırlıoğlu D, Seyrek İntaş K, Kahraman MM, Özyiğit MÖ, Cangül İT, Sevimli A, Büyükçoban M (1999)** Canine transmissible venereal tümör (CTVT) olgularında paramunite aktivatörü baypamun n'in profilaksi ve sağaltım üzerine etkilerinin incelenmesi – makroskopik bulgular. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 5:1-8.
- Milner RJ (1996)** Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-fixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. *OJVR* 63:309-313.
- Mukaratırwa S, Chimonyo M, Obwolo M, Gruys E, Nederbragt H (2004)** Stromal cells and extracellular matrix components in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Histol Histopathol* 19:1117-1123. <https://doi.org/10.14670/HH-19.1117>
- Mukaratırwa S, Gruys E (2003)** Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *Vet Q* 25:101-111. <https://doi.org/10.1080/01652176.2003.9695151>
- Mozos E, Méndez A, Gómez-Villamandos JC, Martín De Las Mulas J, Pérez J (1996)** Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. *Vet Pathol* 33:257-263 <https://doi.org/10.1177/030098589603300301>
- Nak D, Mısırlıoğlu D, Nak Y, Seyrek İntaş K, Tek HB (2004)** Bir köpekte meme metastazlı transmissible venereal tümör olgusu. *Vet Bil Derg* 20:99-102.
- Oguş E, Özmen Ö (2018)** Immunohistochemical determination of the matrix metalloproteinase-2 and -7 expression in transmissible venereal tumor in dogs. *MAE Vet Fak Derg* 3:106-110. <https://doi.org/10.24880/maevfd.481960>
- Oruç E, Sağlam YS, Cengiz M, Polat B (2011)** Bir köpekte bulaşıcı venereal tümör meme metastazının ince iğne aspirasyonu ile sitolojik teşhisi ve vincristine sülfat ile tedavisi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg* 6:63-69.
- Özenç E, Baki Acar D, Birdane MK, Bozkurt MF (2016)** Bir köpekte prolapsus vajina ile birlikte gözlemlenen transmissible venereal tümör olgusu. *Kocatepe Vet J* 9:255-258. <https://doi.org/10.5578/kvj.27798>
- Özyurtlu N, Bademkiran S, Ünver Ö, Yıldız F, İçen H (2008)** Dişi bir köpekte transmissible venereal tümörün

abdominal ve subkutan inguinal bölgeye metastazı. Dicle Üniv Vet Fak Derg 1:48-51.

**Park MS, Kim Y, Kang MS, Oh SY, Cho DY, Shin NS, Kim DY (2006)** Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. *J Vet Diagn Invest* 18:130-133. <https://doi.org/10.1177/104063870601800123>

**Pereira JS, Silva AB, Martins AL, Ferreira AM, Brooks DE (2000)** Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumor. *Vet Ophthalmol* 3:43-47. <https://doi.org/10.1046/j.1463-5224.2000.00097.x>

**Pérez J, Day MJ, Mozos E (1998)** Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Vet Immunol Immunopathol* 64:133-147. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(98\)00131-7](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(98)00131-7)

**Pir Yağcı İ, Kalender H (2008)** Bir erkek köpekte transmissible venereal tumor (TVT) olgusunun vincristine sulphate ile sağaltımı. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 14:105-108.

**Rosai J (1996)** Gastrointestinal tract. In: Rosai J (ed), *Ackerman's surgical pathology*. Elsevier, Philadelphia, pp 589-816

**Sandusky GE, Carlton WW, Wightman KA (1987)** Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. *Vet Pathol* 24:495-499. <https://doi.org/10.1177/030098588702400604>

**Sandusky GE Jr, Carlton WW, Wightman KA (1985)** Immunohistochemical staining for S100 protein in the diagnosis of canine amelanotic melanoma. *Vet Pathol* 22:577-581 <https://doi.org/10.1177/030098588502200611/>.

**Sudjaidee P, Ponglowhapan S, Tummaruk P, Chatdarong K (2015)** Factors affecting treatment outcome of canine transmissible venereal tumor: a retrospective study. *Thai J Vet Med* 45:535-541.

**Tosun İ (2009)** Gastrointestinal stromal tümörlerde immünohistokimyasal yöntemle saptanan P16 protein ekspresyonunun prognostik önemi. *Uzmanlık Tezi, Haydar Paşa Numune Eğitim Araştırma Hastahanesi, İstanbul, Türkiye*

**Uçar M (2016)** Transmissible venereal tumor: a review. *Kocatepe Vet J* 9:230-235. <https://doi.org/10.5578/kvj.26524>

**Vermooten MI (1987)** Canine transmissible venereal tumor (TVT): a review. *J S Afr Vet Assoc* 58:147-150.

**Yuan SM (2015)**  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin and ACTA2 Gene Expressions in Vasculopathies. *Braz J Cardiovasc Surg* 30:644-649. <https://doi.org/10.5935/1678-9741.20150081>




## İshalli Yenidoğan Buzağılarda Elektrolit Bozukluklarının Prevalansı

Alparslan COŞKUN\*<sup>1</sup>, Uğur AYDOĞDU<sup>2</sup>, Onur BAŞBUĞ<sup>1</sup>, Sefer TÜRK<sup>1</sup>, Zahid Tevfik AĞAOĞLU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Sivas Türkiye

<sup>2</sup>Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

 Coskun A 0000-0002-2242-9647 Aydogdu U 0000-0002-9828-9863 Basbug O 0000-0003-3136-0589 Turk S 0000-0003-4683-5217  
Agaoglu ZT 0000-0001-5963-173

\*Corresponding Author's E-Mail: acoskun@cumhuriyet.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada, ishalleri olan yenidoğan buzağılarda elektrolit bozukluklarının prevalansının belirlenmesi amaçlandı. Çalışma, 126 baş ishalleri olan yenidoğan buzağı üzerinde gerçekleştirildi. 126 buzağının 89'unda en az bir elektrolit bozukluk gözlenirken, 37 buzağıda ise herhangi bir elektrolit bozukluğu belirlenmedi. İshalleri olan buzağının 50'sinde hiponatremi, 50'sinde hiperkalemi ve 38'inde ise hipokloremi belirlendi. Ayrıca buzağının 3'ünde hipernatremi, 10'unda hipokalemi ve 15 buzağıda da hiperkloremi tespit edildi. Sonuç olarak, ishalleri olan yenidoğan buzağılarda en yaygın gözlenen elektrolit bozukluklarının hiponatremi ve hipokloremi ile hiperkalemi olduğu ve bu elektrolit bozukluklarının ishalleri olan buzağının tedavisinde göz önüne alınması gerektiği kanısına varıldı.

Received 16 September 2020  
Accepted 23 November 2020  
Published 30 December 2020

#### Anahtar kelimeler:

Buzağı, İshal, Elektrolit Bozuklukları.

**Cite this article:** Coşkun A, Aydoğdu U, Başbuğ O, Türk S, Ağaoglu ZT (2020) İshalleri Olan Yenidoğan Buzağılarda Elektrolit Bozukluklarının Prevalansının Belirlenmesi Turk Vet J, 2(2):62-66.

### Prevalence of Electrolyte Disorders in Neonatal Calves with Diarrhea

#### Abstract

In this study, it was aimed to determine the prevalence of electrolyte disorders in newborn calves with diarrhea. The study was carried out on 126 newborn calves with diarrhea. At least one electrolyte disturbance was observed in 89 of the 126 calves, while no electrolyte disturbance was detected in the 37 calves. In the calves with diarrhea, 50 had hyponatremia, 50 had hyperkalemia and 38 had hypochloremia. In addition, 10 of the calves had hypokalemia, 3 had hypernatremia and 15 had hyperchloremia. As a result, it was determined that hyponatremia, hypochloremia and hyperkalemia were the most common electrolyte disorders observed in newborn calves with diarrheal. Furthermore, it was concluded that these electrolyte disorders should be considered in the treatment of diarrhea in calves.

**Key words:** Calf, Diarrhea, Electrolyte Disorders

### Giriş

Buzağı ishalleri özellikle neonatal dönemde sığırların işletmelerinin en önemli sorunlarından birisi olup aynı zamanda sığırların işletmelerindeki önemli ekonomik kayıplardan da sorumludur. Ekonomik kayıplar iş gücü, tedavi masrafları, ölüm ve uzun vadedeki verim kayıplarını içermektedir (Donovan ve ark. 1998; Smith ve Berchtold, 2014; Aydoğdu ve ark. 2018). Buzağılarda ishal ile birlikte sıvı ve elektrolitlerin vücuttan kaybı şekillenerek metabolik asidoz, laktik asidoz, azotemi ve elektrolit bozukluklarını da içeren çeşitli metabolik anormallikler gözlenmektedir. Bu değişiklikler etiyolojik ajandan bağımsız olarak ishallerin neden olduğu bağırsaklardan sıvı ve elektrolitlerin kaybı ile ilişkilidir. (Sen ve ark., 2006; Guzelbektes ve ark., 2007; Sen ve ark., 2009; Coskun ve ark., 2010;

Sen ve Constable, 2013; Şen ve ark., 2013; Aydoğdu ve ark., 2018; Aydoğdu ve ark., 2019). Buzağı ishallerinde ölümlerin en önemli sebeplerinden birisi dehidratyon ve elektrolit bozukluklarının uygun olmayan tedavisidir. Ayrıca dehidratyon düzeltilse bile organizmada meydana gelen metabolik değişiklikler (elektrik bozuklukları ve metabolik asidoz) düzeltilmedikçe tedavide başarılı sonuçların elde edilmesi zorlaşır (Yağcı ve Parlatur, 2018).

İshalleri olan buzağılardaki asit-baz dengesi ve elektrolit bozukluklarının yaygınlığının bilinmesi uygun tedavi girişimlerinin sağlanmasına ve böylece ölüm oranlarının azaltılmasına katkı sağlayabilir. Sunulan bu çalışmada ishalleri olan buzağılarda gözlenen elektrolit

bozukluklarının prevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesine 2015-2017 yılları arasında teşhis ve tedavi amacıyla getirilen farklı ırk ve cinsiyette 126 baş ishali yenidoğan buzağının geriye dönük kan gaz analiz sonuçlarının incelenmesiyle gerçekleştirildi. Kan gaz analizleri buzağuların vena jugularisinden antikoagülsüz enjektörlere alınan kan örneklerinden kan gaz analizör (Epoc, Kanada) kullanılarak yapıldı.

## İstatistiksel analiz

Veriler ortalama ve standart sapma olarak sunuldu. Buzağuların pH ve elektrolit düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmak için pearson korelasyonu kullanıldı. İstatistiksel önemin seviyesi  $P < 0.05$  olarak kabul edildi. Veri analizi için SPSS (Versiyon 22) paket programı kullanıldı.

## Sonuçlar

Çalışmadaki tüm buzağular  $< 28$  günlük yaşta idi. Buzağularda 1-5 gün devam eden ishal, dehidrasyon, halsizlik, depresyon, emme refleksinde zayıflık veya emme refleksin olmaması, pek çoğunda hipotermi, bazılarında ayakta durma zorluğu veya sternal ya da lateral yatış tespit edildi. 126 buzağının 89'unda en az bir elektrolitte anormal değer gözlenirken, 37 buzağıda ise bir elektrolit dengesizlik belirlenmedi. İshali buzağuların 50'sinde hiponatremi, 50'sinde hiperkalemi ve 38'inde ise hipokloremi belirlendi. Ayrıca buzağuların 3'ünde hipernatremi, 10'unda hipokalemi ve 15 buzağıda da hiperkloremi belirlendi (Tablo 1). Buzağuların elektrolit düzeyleri arasındaki korelasyon seviyeleri Tablo 2'de sunuldu. Korelasyon analizleri incelendiğinde,  $Na^+$ 'un  $K^+$  ile negatif,  $Cl^-$  ile ise pozitif korele olduğu saptandı.

## Tartışma

Elektrolitler normal hücre metabolik fonksiyonlar için gereklidir. Buzağı sağlığı için gerekli önemli elektrolitler sodyum (Na), potasyum (K), hidrojen (H), klor (Cl) ve bikarbonattır. Elektrolit ihtiyaçları genellikle yem, tuz ve mineral takviyesi tüketimi ile karşılanmaktadır (England ve Williams. 2018). Buzağularda neonatal dönemin en önemli sağlık problemlerinden birisi olarak kabul

edilen ishal, elektrolitlerin önemli oranda kaybına ve buna bağlı olarak da vücutta önemli değişimlerine neden olmaktadır.

**Tablo 1.** İshali buzağuların elektrolit bozukluklarının prevalansı

Parametreler	N (%)	Referans Değerler*
Sodyum (mmol/L)		
Hiponatremi (<132)	50 (39.68)	132-152
Normonatremi(132-152)	73 (57.93)	
Hipernatremi (>152)	3 (2.38)	
Potasyum (mmol/L)		
Hipokalemi (<3,9)	10 (7.93)	3.9-5.8
Normokalemi (3,9-5,8)	66 (52.38)	
Hiperkalemi (>5,8)	50 (39.68)	
Klor (mmol/L)		
Hipokloremi (<95)	38 (30.16)	95-110
Normokloremi(95-110)	73 (57.93)	
Hiperkloremi (>110)	15 (11.90)	

\*Constable ve ark 2018

**Tablo 2.** İshali buzağuların Na, K ve Cl düzeylerinin korelasyonu

	Na	K	Cl
pH	,115	-,287**	-,406**
Na		-,359**	,702**
K			-,162

\*\*Korelasyonun önem seviyesi  $P < 0.01$

İshali buzağularda dışkıyla birlikte su ve başta bikarbonat, sodyum, klor ve potasyum olmak üzere önemli düzeyde elektrolit kaybı şekillenmektedir (Sen ve Constable, 2013; Şen ve ark., 2013; Aydoğdu ve ark., 2018; Constable ve ark., 2018). İshali buzağulardaki serum elektrolit düzeyleri dışkı ile kaybın dışında azalan gıda alımından da etkilenebilmekte ve ayrıca hemokonsantrasyonla da maskelenebilmektedir (Grove-White ve Michell, 2001).

Sodyum, hücre dışı sıvının temel katyonudur ve esas olarak hücre dışı sıvının ozmotik basıncının korunmasından sorumludur. Hiponatreminin en yaygın nedeni enteropatilerde bağırsak yolundan sodyum kaybının artmasıdır. Bu, özellikle orta derecede akut ishali buzağularda belirgindir.

Enterotoksijenik *Escherichia coli*'nin neden olduğu akut ishalleri buzağılarda, enterotoksine yanıt olarak salgılanan bağırsak sıvısının sodyum konsantrasyonu plazmaninkine benzerdir ve genellikle hiponatremi (hipotonik dehidratasyon) tablosu oluşmaktadır. İshali devam ettikçe hayvanlar büyük miktarlarda sodyum kaybetmeye devam ederler ve hiponatremi şiddetli hale gelebilir. Hiponatremi, halihazırda hiponatremik hayvanlarda tek sıvı tedavisi olarak sodyumsuz su veya % 5 dekstroz kullanıldığında da daha şiddetli hale gelebilir (Constable ve ark., 2005; Berchtold, 2009, Aydoğdu ve ark., 2018; Hallowell ve Remnant, 2016, Constable ve ark., 2018-Kitap). Bu çalışmada, 126 buzağının 50 (~ %40)'sinde hiponatremi tespit edilmiştir. Lee ve ark. (2020) ishalleri buzağuların % 67,2'sinde hiponatremi gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu oran bizim çalışmamıza göre oldukça yüksek bulunmuştur. Bu fark muhtemelen referans aralıkların aynı olmaması ile ilişkilidir. Çünkü Lee ve ark. (2020) çalışmamıza göre çok daha dar bir referans aralık (136,5-142,4 mmol/L) kullanmıştır. Hipernatremi ise ishalleri yenidoğan buzağılarda karşılaşılan nadir bir elektrolit bozukluğudur (Abutarbush ve Petrie, 2007; Berchtold, 2009). Genelde hipernatremi, hayvanın vücudundan aşırı su kaybedildiğinde (yaygın olan sodyum konsantrasyonu artacağından dolayı), fazla sodyum içeren tuzlar tüketildiğinde veya terapötik olarak verildiğinde (nadiren) gelişir (Feig 1981, Brobst 1984, Hardy 1989). Yenidoğan buzağılarda hipernatreminin patogenezi, yeterli miktarda su olmadan aşırı sodyum alımını (oral elektrolit karıştırma hataları), aşırı su kaybını veya serbest suya erişimi olmayan ishalleri buzağulara uzun süreli izotonik sıvı verilmesini içerir (Angelos ve ark 1999, Abutarbush ve Petrie 2007). Lee ve ark. (2020) ishalleri buzağuların % 14,4'ünde hipernatremi gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise 126 buzağının yalnızca 3 (%2,38)'ünde hipernatreminin gözlemlenmiş olup Lee ve ark. (2020)'ye göre düşük bulunmuştur. Bu fark, hiponatremi oranları arasındaki farklılıkta olduğu gibi referans aralıkların aynı olmamasına bağlı tespit edilmiş olabilir. Çalışma sonuçları ishalleri buzağılarda hipernatremiyi yaygın bir elektrolit anormalliğinin olmadığını göstermiştir. Klor, ekstraselüler sıvının majör anyonu olup, ozmolalite ve asit-baz dengesi için önemlidir. İshalleri buzağılarda her ne kadar ishal sırasında klor kaybı şekillense de, bu kayıp sodyum ile aynı derecede olmamaktadır (Constable ve ark., 2005; Constable ve ark., 2018). Bu yüzden akut diyarede serum Cl<sup>-</sup> seviyesi normal veya normalin altında olabilir (Lee ve ark., 2020). Hipokloremi, enteritte bağırsak yolunda net elektrolit kaybının artması sonucu oluşabilmektedir (Constable ve ark.,

2018). Lee ve ark. (2020) ishalleri buzağuların % 18,6'sında hipokloremi, % 33,1'inde ise hiperkloremi saptamışlardır. Sunulan bu çalışmada ise ishalleri buzağuların yaklaşık % 30'unda hipokloremi belirlenirken yaklaşık %12'sinde hiperkloremi tespit edilmiş olup Lee ve ark. (2020)'ninkinden farklılık göstermiştir. Bu farklılığın muhtemel sebebi alınan referans aralık değerlerinin her iki çalışmada aynı olmamasından kaynaklanmaktadır.

İshalleri buzağılarda sodyum ve klor gibi elektrolitlerin yanında dışkıyla potasyumun da kaybı şekillenmektedir. Bundan dolayı tüm ishalleri buzağılarda total vücut potasyumu eksilmektedir (Lewis ve Phillips, 1972; Constable ve ark., 2018). Buna karşın akut ishalleri buzağılarda, şiddetli metabolik asidoz ve asidemiyeye cevap olarak ortaya çıkan hiperkalemi tablosuyla sıklıkla karşılaşılabilmektedir. Genellikle metabolik asidozun şiddetiyle orantılı olarak hiperkaleminin şiddetinde de artış gözlenmektedir (Smith ve Berchtold, 2014; Trefz ve ark, 2013ab; Basoglu ve Aydogdu, 2013). Metabolik asidozda hiperkaleminin gelişimi için klasik açıklama, potasyumun hücre içi boşluktan hücre dışı boşluğa geçişini içerir, çünkü fazla hidrojen iyonlarının büyük bir kısmı hücre içinde tamponlanır. Bu nedenle, elektronöraliteyi korumak için potasyumun hücre zarı boyunca hidrojen iyonları ile değiştirildiği varsayılır. Yaygın olarak kabul edilmesine rağmen, bu iddia edilen mekanizma hiçbir zaman sağlam bir fizyokimyasal temele sahip olmamıştır. Asidemik hayvanlarda hiperkaleminin gelişmesi için ilgi çekici bir hipotez de, düşük hücre içi pH'nın Na-K-ATPaz aktivitesini yavaşlatması ve potasyum iyonlarının hücre içinden hücre dışı boşluğa sızmasına neden olmasıdır; bununla birlikte, Na-K-ATPase aktivitesinin fizyolojik aralık içindeki pH'dan doğrudan etkilendiğini gösteren deneysel veri yoktur (Smith, 2009; Basoglu ve Aydogdu, 2013, Constable ve ark, 2018). Asidemi durumlarında insüline bağımlı hücre potasyum alımının engellenmesi, hiperkalemi ve asidemi arasındaki ilişki için ikinci bir potansiyel mekanizma olarak karşımıza çıkabilir. Çünkü kan pH'sındaki hafif düşüşler insülin direncine neden olabilir. İnsülin, glikoz ve potasyumun transselüler değişimini tetiklediğinden, insüline karşı doku direnci hiperkalemiye katkıda bulunma potansiyeline sahiptir. Asidemiyeye bağlı hiperkalemi için üçüncü bir potansiyel mekanizma, düşük hücre içi pH ile TREK-1 adı verilen bir hücre zarı potasyum kanalının aktivasyonudur ve bu, hücre potasyum akışına neden olur (Constable ve Grünberg, 2013). Ayrıca hipovolemiye bağlı K<sup>+</sup>'ın renal atılımının bozulmasının da hiperkalemiyi daha

da şiddetlendirebileceği ifade edilmektedir (Sweeney, 1999, Carlson ve Bruss, 2008). İshalli buzağılarda Trefz ve ark. (2013b) %34 oranında, Lee ve ark. (2020) ise %42.2 oranında hiperkaleminin bulunduğunu ifade etmişlerdir. Sunulan bu çalışmada, 126 buzağının 50 (~%40)'sinde hiperkalemi tespit edilmiş olup önceki çalışmalar (Trefz ve ark., 2013b; Lee ve ark., 2020) ile benzerlik göstermiştir. Kan potasyum düzeyi ile pH arasında da önemli negatif korelasyonun bulunması metabolik asidozun şiddeti ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. Hiperkalemi, yaşamı tehdit eden önemli bir elektrolit bozukluğudur ve özellikle 7-8 mmol/ L'nin üzerinde olduğu zaman kalp fonksiyonu üzerinde derin bir etkisi vardır. Genellikle belirgin bradikardi ve aritmi göze çarparken ani kalp durması da meydana gelebilir (Basoglu ve Aydogdu, 2013; Constable ve ark., 2018). Bu yüzden çalışma sonuçlarının da gösterdiği gibi ishalli buzağuların tedavisinde her zaman hiperkalemi göz önünde bulundurulmalıdır. Bunun yanında, dışkıyla K'un kaybındaki artışa bağlı olarak, hücre içi ve total vücut potasyum seviyelerinde azalma ortaya çıkar. İshalli buzağılarda dehidrasyon ile ilişkili aldosteron salınımı şekillenmektedir. Aldosteron böbrekler üzerine etkiyerek Na ve suyun vücutta tutulmasını sağlarken K'un vücuttan atılmasına neden olur. Bu durum, özellikle kronik ishalli buzağılarda, vücut potasyum depolarında derin tükenişlere neden olmaktadır. Böylece serum K konsantrasyonları azalarak hipokalemi tablosu ortaya çıkmaktadır. Kronik ishalli hipokalemik buzağılarda klinik olarak sıklıkla derin kas zayıflığı göze çarpar (Smith, 2009; Smith ve Berchtold, 2014; Aydoğdu ve ark., 2018). Bu çalışmada ishalli buzağuların yalnızca yaklaşık %8'inde hipokalemi tablosu gözlenmiş olup bu oranın Trefz ve ark. (2013b)'nin yapmış olduğu çalışma (%10) ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak çalışmamızın sonuçları Lee ve ark. (2020)'nin bildirdiği orandan (%15) düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu düşüklük muhtemelen alınan referans değerlerin farklılığından kaynaklanmaktadır. Sonuçlar göstermektedir ki hipokalemi ishalli buzağılarda yaygın gözlenen bir komplikasyon değildir.

Sonuç olarak, ishalli buzağılarda elektrolit bozukluklarının yaygın bir şekilde gözleendiği ve en sık karşılaşılan elektrolit bozukluklarının hiponatremi, hiperkalemi ve hipokloremi olduğunu saptanmıştır.

## Kaynaklar

- Abutarbush SM, Petrie L (2007)** Treatment of hypernatremia in neonatal calves with diarrhea. *Can Vet J.* 48(2): 84–187.
- Angelos SM, Smith BP, George LW (1999)** et al. Treatment of hypernatremia in an acidotic neonatal calf. *J Am Vet Med Assoc* 214:1364–1367.
- Aydogdu U, Isik N, Derinbay Ekici O, Yildiz R, Sen I, Coskun A (2018)** Comparison of the Effectiveness of Halofuginone Lactate and Paromomycin in the Treatment of Calves Naturally Infected with *Cryptosporidium parvum*. *Acta Scientiae Veterinariae* 46: 1524.
- Aydoğdu U, Gülersoy E, Şen İ (2018)** Buzağı İshalleri ve Oral Sıvı Takviyeleri. *Türkiye Klinikleri J Anim Nutr&Nutr Dis Special Topics* 4(1):56-64.
- Aydoğdu U, Yıldız R, Güzelbekteş H, Coşkun A, Şen İ (2019)**. Yenidoğan ishalli buzağılarda mortalite indikatörü olarak kan laktat, glikoz, total protein ve gama glutamil transferaz seviyeleri. *F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg.*, 33, 201-206.
- Aydogdu U, Yildiz R, Guzelbektes H, Naseri A, Akyuz E, Sen I (2018)** Effect of combinations of intravenous small-volume hypertonic sodium chloride, acetate Ringer, sodium bicarbonate, and lactate Ringer solutions along with oral fluid on the treatment of calf diarrhea. *Pol J Vet Sci* 21(2):273-280.
- Basoglu A, Aydogdu U (2013)** Terminal atrial standstill with ventricular escape rhythm in a neonatal calf with acute diarrhea. *Turk J Vet Anim Sci*;37:362-365.
- Brobst D (1984)** Abnormalities of plasma sodium concentrations and water balance: A review. *Calif Vet* 38:20–23.
- Carlson G.P, Bruss M (2008)** Fluid, electrolyte, and acid–base balance. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Sixth Ed. Academic Press, Elsevier, New York, San Diego, USA, pp. 529–559.
- Constable PD, Grünberg W (2013)** Hyperkalemia in diarrheic calves: Implications for diagnosis and treatment. *Vet J* 195(3):271-2
- Constable PD, Stampfli HR, Navetat H, Berchtold J, Schelcher F (2005)** Use of a quantitative strong ion approach to determine the mechanism for acid-base abnormalities in sick calves with or without diarrhea. *J Vet Intern Med* 19:581-589.
- Constable PD, Walker PG, Morin DE et al (1998)** Clinical and laboratory assessment of hydration status of neonatal calves with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc*; 212:991–6.
- Coskun A, Sen I, Guzelbektes H, Ok M, Turgut K, Canikli S (2010)** Comparison of the effects of intravenous administration of isotonic and hypertonic sodium bicarbonate solutions on venous acid-base status in dehydrated calves with strong ion acidosis. *J Am Vet Med Assoc* 236(10):1098-103.
- Donovan GA, Dohoo IR, Montgomery DM, Bennett FL (1998)** Calf and disease factors affecting growth in

female Holstein calves in Florida, USA. *Prev Vet Med* 33(1-4):1-10.

**England JJ, Williams S.** Fluid and Electrolyte Therapy in Calves. In: *Cattle Producer's Handbook Fourth Edition* (online) p.641-643.

**Feig PU** (1981) Hypernatremic and hypertonic syndromes. *Med Clin North Am*;65:271–290.

**Guzelbektes H, Coskun A, Sen I** (2007) Relationship between the degree of dehydration and the balance of acid-based changes in dehydrated calves with diarrhoea. *Bull Vet Inst Pulawy* 51:83-7.

**Hallowell G, Remnant J** (2016) Fluid therapy in calves. *In Practice* 38:439-449.

**Hardy RM** (1989) Hypernatremia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*19:231–240.

**Lee SH, Choi EW, Kim D** (2020) Relationship between the values of blood parameters and physical status in Korean native calves with diarrhea. *J Vet Sci.* 21(2):e17.

**Lewis LD, Phillips RW** (1972) Water and electrolyte losses in neonatal calves with acute diarrhea. A complete balance study. *Cornell Vet* 62:596–607.

**Sen I, Altunok V, Ok M, Coskun A, Constable PD** (2009) Efficacy of oral rehydration therapy solutions containing sodium bicarbonate or sodium acetate for treatment of calves with naturally acquired diarrhea, moderate dehydration, and strong ion acidosis. *Am Vet Med Assoc* 234:926-34.

**Sen I, Constable PD, Marshall TS** (2006) Effect of suckling isotonic or hypertonic solutions of sodium bicarbonate or glucose on abomasal emptying rate in calves. *Am J Vet Res* 67(8):1377-84.

**Sen I, Constable PD** (2013) General overview to treatment of strong ion (metabolic) acidosis in neonatal calves with diarrhea. *Eurasian J Vet Sci* 29(3):114-20.

**Smith GW, Berchtold J** (2014) Fluid therapy in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 30(2):409-427.

**Smith GW** (2009) Treatment of calf diarrhea: Oral fluid therapy. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 25(1):55-72.

**Sweeney RW** (1999) Treatment of potassium balance disorders. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 15, 609–617.

**Şen İ, Güzelbekteş H, Yıldız R** (2013) Neonatal Buzağı İshalleri: Patofizyoloji, Epidemiyoloji, Klinik, Tedavi ve Koruma. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci* 4(1):71-8.

**Trefz FM, Constable PD, Sauter-Louis C, Lorch A, Knubben-Schweizer G, Lorenz I** (2013) Hyperkalemia in neonatal diarrheic calves depends on the degree of dehydration and the cause of the metabolic acidosis but does not require the presence of acidemia. *J Dairy Sci* 96(11):7234-7244.a

**Trefz FM, Lorch A, Feist M, Sauter-Louis C, Lorenz I** (2013) The prevalence and clinical relevance of hyperkalemia in calves with neonatal diarrhoea. *Vet J* 195(3):350-6. b

**Yağcı BB, Parlatur Y** (2018) Neonatal İshalli Buzağılarda Sıvı-Elektrolit Denge Bozuklukları ve Sağaltımı. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg* 58 (Özel Sayı) 50-55





## Sıçanlarda Deneysel Oluşturulan Yara Modelinde *Morus Alba* Ekstraktının Etkinliğinin Belirlenmesi

Haki KARA\*<sup>1</sup>, Mahmut ŞAHİN<sup>1</sup>, Hüseyin GÜNGÖR<sup>1</sup>, Alper Serhat KUMRU<sup>1</sup>, Gökhan YILMAZ<sup>1</sup>, Mehmet Önder KARAYİĞİT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü Farmakoloji ve Toksikoloji ABD. Sivas-Türkiye

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, Patoloji ABD. Adana- Türkiye

Kara H 0000-0002-0295-0582 Şahin M 0000-0003-3765-748X Güngör H 0000-0002-2506-3855 Kumru AS 0000-0001-8462-4264  
Yılmaz G 0000-0001-6495-5488 Karayığit MÖ 0000-0002-7958-180X

\*Corresponding Author's E-Mail: hakikara@cumhuriyet.edu.tr

### Özet

Antik çağlardan beri bitkiler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. *Morus alba* da eskiden beri başta diyabet olmak üzere karaciğer, dalak, immun sistem ve kardiyovasküler sistem kaynaklı pek çok hastalığın tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada *Morus alba*'nın yara iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada Wistar cinsi erkek sıçanlarda oluşturulan yara modelinde dekspantenol (%2,5 ve %5) ve *Morus alba* ekstraktı (%2,5 ve %5) 15 gün uygulanmıştır. Çalışma süresince 3, 6, 9, 12 ve 15. günlerde kaliper ile ölçümler yapıp 15. günde sıçanlar ötenazi edilerek histopatolojik değerlendirmeler yapılmıştır. Elde edilen veriler *Morus alba* ekstraktının kontrol ve dekspantenol uygulananlara göre daha hızlı yara iyileşmesini sağladığını göstermiştir. Sonuç olarak *Morus alba* ekstraktının yara iyileşmesinde kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Received 7 November 2020  
Accepted 10 December 2020  
Published 30 December 2020

**Anahtar Kelimeler:**  
*Morus alba*, yara iyileşmesi, rat.

**Cite this article:** Kara H, Şahin M, Güngör H, Kumru AS, Yılmaz G, Karayığit MÖ (2020) Ratlarda Deneysel Oluşturulan Yara Modelinde *M. Alba* Ekstraktının Etkinliğinin Belirlenmesi. Turk Vet J, 2(2):67-73.

### Determination of the Efficiency of *Morus Alba* Extract in Experimental Wound Model Created in Rats

#### Abstract

Plants have been used in the treatment of various diseases since ancient times. *Morus alba* has traditionally been used in the treatment of many diseases originating from the liver, spleen, immune system and cardiovascular system, especially diabetes. In this study, the effects of *Morus alba* on wound healing were investigated. In the study, dexpanthenol (2.5% and 5%) and *Morus alba* extract (2.5% and 5%) were applied for 15 days in the wound model created in male Wistar rats. During the study, measurements were made with calipers on the 3rd, 6th, 9th, 12th and 15th days and the rats were euthanized on the 15th day and histopathological evaluations were made. In light of the data obtained, it has been shown that *Morus alba* extracts provide a faster wound healing rate than those given control and dexpanthenol. As a result, it was concluded that *Morus alba* extract can be used in wound healing.

**Key Words:** *Morus alba*, wound-healing, rat

### Giriş

*Morus alba* (*M. alba*), ülkemizde dut olarak bilinen çok yıllık bir ağaç türüdür. Meyvesinden pestil, köme, pekmez gibi yerel ürünler üretildiği gibi yeşil yaprakları da ipek böceği yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır (Hussain ve ark., 2017). *M. alba* geleneksel Çin tıbbında ve ayurveda olarak isimlendirilen Hint tıbbında sıklıkla kullanılan tıbbi bitkiler arasında yer almaktadır (Dey ve ark., 2012; Shukla ve ark., 2016). Geleneksel tedavide *M. alba*'nın kökleri, yaprakları ve meyvesi ile bu kısımlarından elde edilen ekstraktları kullanılmaktadır (Devi ve ark., 2013). *M. alba* dan elde edilen çeşitli farmakolojik etken maddelerin antienflamatuar, antioksidan, antikanser, antihiperlipidemik, antimikrobiyal, nöroprotektif,

antidiabetik, antiaterosklerotik, antiobezite, deri beyazlatıcı, hepatoprotektif ve kardio-protektif etilerine dair bilgiler literatürde yer almaktadır (Devi ve ark., 2013; Younus ve ark., 2016).

*M. alba* ekstraktlarının içeriğinde, steroidler, glikozidler, terpenoidler, saponinler, alkaloidler, flavonoidler, tanninler, antosiyaninler, bulunmaktadır (Asano ve ark., 2001). *M. alba* ekstraktlarından morasin, kuersetin, izokuersetin, rutin, rezvesıçanrol, apigenin,  $\beta$ -sitosterol gibi farmakolojik olarak aktif maddeler elde edilmiştir (Chen ve ark., 2006). Yara, deri dokusunun bütünlüğünün ve fonksiyonlarının kaybedildiği durum olarak tanımlanmaktadır.

Pek çok sebebe bağı olarak dünya genelinde insanlarda ve hayvanlarda çeşitli yaralanmalar ortaya çıkabilmektedir. Yara tedavisinde tıbbi müstahzarların yanısıra geleneksel tedavi yöntemi olarak bitkiler kullanılmaktadır (Dey ve ark., 2012). Bununla birlikte son yıllarda bitkisel kökenli farmakolojik aktif maddeler bir çok ülkede sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre halen dünyanın %80'inde bitkiler ve bitkisel kaynaklı ürünler tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Kullanımda olan ilaçların yaklaşık olarak %40'ının bitkisel kökenli olduğuda bilinmektedir (Das ve ark., 2017). Dünya genelinde bitkisel tıbbi ürün ticareti oldukça yüksek rakamlara ulaşmıştır (yaklaşık 83 milyar Amerikan doları) (Kim ve ark., 2015).

Fiziksel, kimyasal, ısı, radyasyon ve cerrahi müdahalelerin sebep olduğu veya kendiliğinden oluşabilen ve doku bütünlüğünün bozulduğu durumlar yara olarak tanımlanmaktadır (Singer ve Clark, 1999). Yaralı bölgede deri bütünlüğü yeniden sağlanıncaya kadar gözlemlenen makroskobik ve mikroskobik değişimleri içeren süreçteki değişimler ise yara iyileşmesi olarak tarif edilmektedir (Rodriguez ve ark., 2005).

Yara iyileşmesi mikroskobik boyutta, sırasıyla; koagülasyon, inflamasyon, granülasyon dokusunun formasyonu, matriks formasyonunun gelişmesi, bağ dokunun yeniden modellenmesi, kollajenizasyon ve doku mukavemetinin sağlanması gibi hücresel süreçlerle ilerlemektedir. Son derece kompleks olan bu aşamalar, inflamasyon fazı, proliferasyon fazı ve derinin yeniden şekillenmesi olmak üzere 3 temel evrede tamamlanmaktadır (George ve ark., 2006). İnflamasyon evresi yara oluşumunu takip eden ilk 3 gün içerisinde gerçekleşir ve iyileşme sürecinin diğer evreleri için temel teşkil eder (Pakyari ve ark., 2013). Proliferasyon fazında ise temizlenmiş olan yara alanında deriyi oluşturacak olan hücreler üreyip çoğalmaya başlarlar. Son evre olan derinin yeniden şekillendiği evrede ise onarılmış olan hücre matriksi yeni deri hücreleri tarafından doldurularak deri bütünlüğü sağlanmaktadır (Wild ve ark., 2010). Yara iyileşme süreci üzerinde metabolik faaliyetler ve immun sistem yeterliliği en kritik parametreler olmakla birlikte yaralı bölgenin enfekte olması, dolaşım bozuklukları, obezite ve diyabet gibi olgular yara iyileşme sürecini ve hızını azaltmaktadır (Eo ve Lim , 2016; Guo, 2010).

## Gereç ve Yöntemler

### Deney Hayvanları

Bu çalışmada ortalama 220-250 g canlı ağırlığında 24 adet Wistar albino cinsi rat kullanıldı. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel

Etik Kurulu'nun 01.04.2020 tarih ve 394 sayılı izni ile gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan sıçanlar Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında, 12/12 saat aydınlık/karanlık ortamda, 22±2 °C sıcaklıkta tutuldu, yem ve su ad libitum olarak verildi.

### *M. alba* Ekstraktının ve Pomadların Hazırlanması

Temmuz –Ağustos ayları arasında Sivas ili Gürün ilçesinden toplanan ve açık havada indirekt gün ışığında kurutulmuş *M. alba* meyveleri tartılarak kuru *M. alba* meyvesi etanol içerisinde (250 g/L), karanlık ortamda 24 saat bekletilmiştir. Etanoldeki ekstraksiyonu takiben karışım wattman filtreden geçirilmiştir. Elde edilen süzöntü 80 °C sıcaklıkta vakumlu evaropatör kullanılarak evaporasyon işlemine tabi tutulmuş ve ekstrakt etanolden ayrılmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm pomadlarda taşıt madde olarak lanolin kullanılmıştır. *M. alba* pomadları, *M. alba* ekstraktından (%2,5 ve %5'lik karışımları halinde) hazırlanmıştır. Dekspantenol pomadı ise (dekspantenol 500mg/2ml, Bepanthen®) dekspantenol (Dex) içeren enjeksiyonluk çözeltiden (%2,5 ve %5'lik karışımlar halinde) hazırlanmıştır. Pomadlarda kullanılan taşıt maddenin etkisini değerlendirmek için %100 lanolin kullanılmıştır.

### Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada her bir grupta 4 hayvan olacak şekilde 6 grup oluşturuldu ve toplamda 24 hayvan kullanıldı. Oluşturulan gruplar ve uygulamalar aşağıdaki şekildedir;

1. Grup (Kontrol grubu): Bu gruptaki sıçanlara herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamış ve tedavi girişiminde bulunulmamıştır.
2. Grup (*M. alba* %2,5): Bu grupta yer alan sıçanlara yara oluşturulmasını takiben %2,5 *M. alba* ekstraktı içeren pomad günde bir kez 15 gün boyunca yara yüzeyine haricen uygulanmıştır.
3. Grup (*M. alba* %5): Bu grupta yer alan sıçanlara yara oluşturulmasını takiben %5 *M. alba* ekstraktı içeren pomad günde bir kez 15 gün boyunca yara yüzeyine haricen uygulanmıştır.
4. Grup (Dekspantenol %2,5): Bu grupta yer alan sıçanlara yara oluşturulmasını takiben %2,5 dekspantenol pomad günde bir kez 15 gün boyunca yara yüzeyine haricen uygulanmıştır.

5. Grup (Dekspantenol %5): Bu grupta yer alan sıçanlara yara oluşturulmasını takiben %5 dekspantenol pomad günde bir kez 15 gün boyunca yara yüzeyine haricen uygulanmıştır.
6. Grup (Lanolin): Bu grupta yer alan sıçanlara yara oluşturulmasını takiben lanolin pomad günde bir kez 15 gün boyunca yara yüzeyine haricen uygulanmıştır.

### **Yara Oluşturulması ve Yara Takibi**

Yara modeli oluşturmak için eksizyonel metod kullanılmıştır. Deney hayvanları (90 mg/kg ketamine + 3 mg/kg ksilazin) genel anesteziye altında (dorsal interscapular alanın posterior bölgesi) tıraş edilerek operasyona hazır hale getirildi. Operasyon bölgesinin (povidon iyot ile) antisepsisi sağlandıktan sonra 6 mm deri biyopsi pançı (Şekil 1) kullanılarak birbirine eş iki adet tam katlı yara oluşturuldu (Şekil 2). Çalışma sonuna kadar kontrol grubu hariç tüm gruplara günlük olarak pomad uygulaması yapıldı. Operasyonu takip eden 3, 6, 9, 12 ve 15. günlerde sıçanlar sedasyona alınarak (ketamine 50 mg/kg, i.p.) wernier kaliper yardımı ile yara bölgesinin ölçülebilir en uzun çapı ve en kısa çapı kayıt altına alındı (Şekil 3).



**Şekil 1.** Deri biyopsi pançısı görüntüleri (6 mm)



**Şekil 2.** Tam katlı yara oluşturulması



**Şekil 3.** Oluşturulan yaraların wernier kaliperi ile ölçülmesi

Uygulamalar bittikten sonra genel anestezi altında kalplerinden kan örnekleri alınan sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi edildi. Daha sonra yara bölgesi ve çevresi tam katmanlı derinin panniculus tabakası dahil olacak şekilde vücuttan sıyrılarak çıkarıldı (Şekil 4). Alınan deri örnekleri histopatolojik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonunda bekletilmiştir.



**Şekil 4.** Çalışma sonunda deri örneklerinin çıkarılması

### **Histopatolojik İncelemeler**

Sıçanlardan alınan doku örneklerine rutin alkol-ksilol takip işlemleri uygulandıktan sonra parafin bloklara alındı. Bloklanmış dokulardan alınan 4 µm'lik kesitler polilizinli lamlara alınarak hematoxilen-eozin ile boyandı. Boyanmış örneklerde ışık mikroskobu altında epitelizasyon şekillenmesi, mononükleer hücre (MNH) infiltrasyonu ve granülasyon dokusu olgunluğu yönünden incelemeler yapıldı (yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3)).

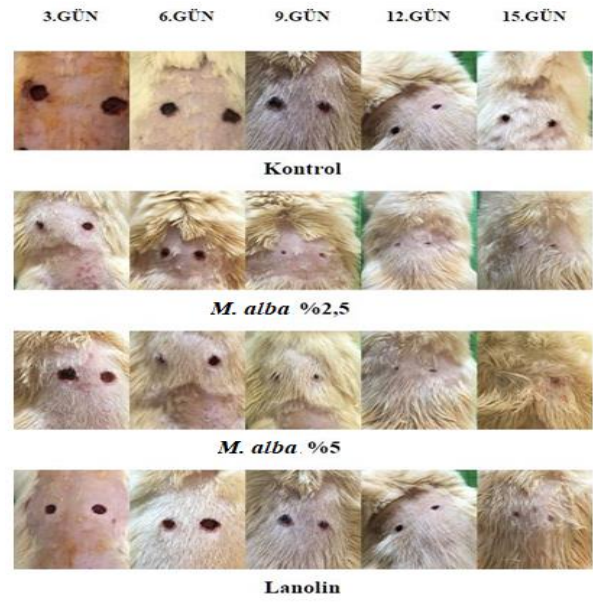
### **İstatistiksel Analiz**

Elde edilen veriler SPSS 20.00 programı ile analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılık nonparametrik testler (Kruskal Wallis) ile farklılığı oluşturan grup ise Mann Whitney U testi ile belirlendi. (p <0.05).

## Bulgular

### Yara iyileşme bulguları

Çalışmadan elde edilen iyileşme bulguları ve ölçüm sonuçları bulguları tablo 1 ve 2 de gösterilmiştir. Tablo 1 incelendiğinde; kaliper ölçümleri ile iyileşme hızları görülmektedir. *M. alba* ekstraktının hem %2,5 hem de %5'lik karışımlarının 3. günden itibaren belirgin bir şekilde iyileşmenin başladığı, 6, 9, 12 ve 15. günlerde de devam ettiği görülmektedir. Bu iyileşme sadece kontrol grubuna göre değil lanolin ve Dex verilen gruplara göre de önemli derecede farklı olduğu ( $p<0.05$ ) görülmektedir. *M. alba* ekstraktının %2,5'lük uygulaması ile 6. günden başlamak üzere tüm ölçüm günlerinde iyileşmenin daha yüksek olduğu görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar makroskobik incelemede de gözlemlenebilmektedir (Şekil 5).



Şekil 5. Gruplara ve günlere göre yara iyileşmesi

Tablo 1. Hesaplanan yara alanlarına göre iyileşme oranı (%)

	3.gün	6.gün	9.gün	12.gün	15.gün
Kontrol	7,58±1,20 <sup>a</sup>	19,51±2,00 <sup>a</sup>	55,84± 2,45 <sup>a</sup>	67,22± 3,15	85,18± 2,85
<i>M. alba</i> %2,5	11,53±1,85 <sup>a</sup>	45,64± 2,85 <sup>a</sup>	68,59± 2,95 <sup>a</sup>	95,37± 3,75	99,55± 3,00 <sup>a</sup>
<i>M. alba</i> %5	11,80±1,75 <sup>a</sup>	36,77± 2,35 <sup>a</sup>	62,48± 3,00 <sup>a</sup>	85,55± 3,15 <sup>a</sup>	99,42± 3,00 <sup>b</sup>
Lanolin	7,47± 1,40 <sup>b</sup>	33,26± 2,15	73,74± 2,75 <sup>b</sup>	84,88± 4,25	89,61± 2,45 <sup>b</sup>
Deks %2,5	7,30± 1,40 <sup>b</sup>	29,5± 1,95	74,43± 3,15	85,67± 3,85	90,53± 3,15
Deks %5	7,57± 1,50 <sup>c</sup>	31,02± 1,85 <sup>c</sup>	76,22± 3,10 <sup>c</sup>	86,11± 2,85 <sup>c</sup>	89,12± 2,85 <sup>c</sup>

a, b ve c harfleri gruplar arası farklılıkları ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ).

### Histopatolojik Bulgular

Gruplar arasında epitelizasyon şekillenmesi, MNH infiltrasyonu ve granülasyon dokusu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi (Tablo 2).

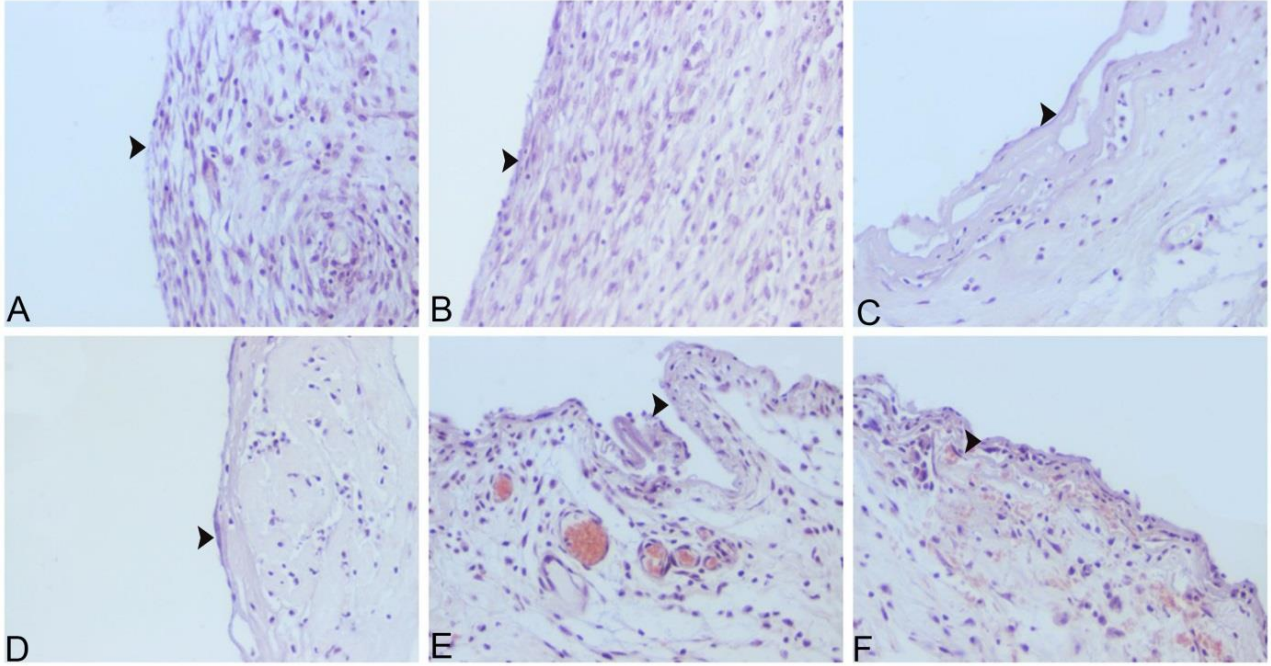
Epitelizasyon şekillenmesi açısından kontrol ve lanolin grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilemezken Dex %2,5 ve Dex %5 gruplarında hafif düzeyde epitel oluşumu görüldüğü ve keratinleşmenin meydana geldiği belirlendi. *M. alba* %2,5 ve *M. alba* %5 gruplarında epitel oluşumunun arttığı ve keratinleşmenin ileri seviyelerde olduğu tespit edildi (Şekil 6).

Mononükleer hücre infiltrasyonu açısından değerlendirildiğinde kontrol, lanolin ve Dex %2,5 gruplarında MNH infiltrasyonunun yüksek düzeyde olduğu, Dex %5 ve *M. alba* (%2,5 ve %5) gruplarında ise MNH infiltrasyonlarının azaldığı tespit edildi. Kontrol, lanolin ve Dex %2,5 gruplarında hafif düzeyde granülasyon dokusu gözlemlenirken, bu gruplara kıyasla deks %5 ve *M. alba* (%2,5 ve %5) gruplarında granülasyon dokusunda artış olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ) (Şekil 7).

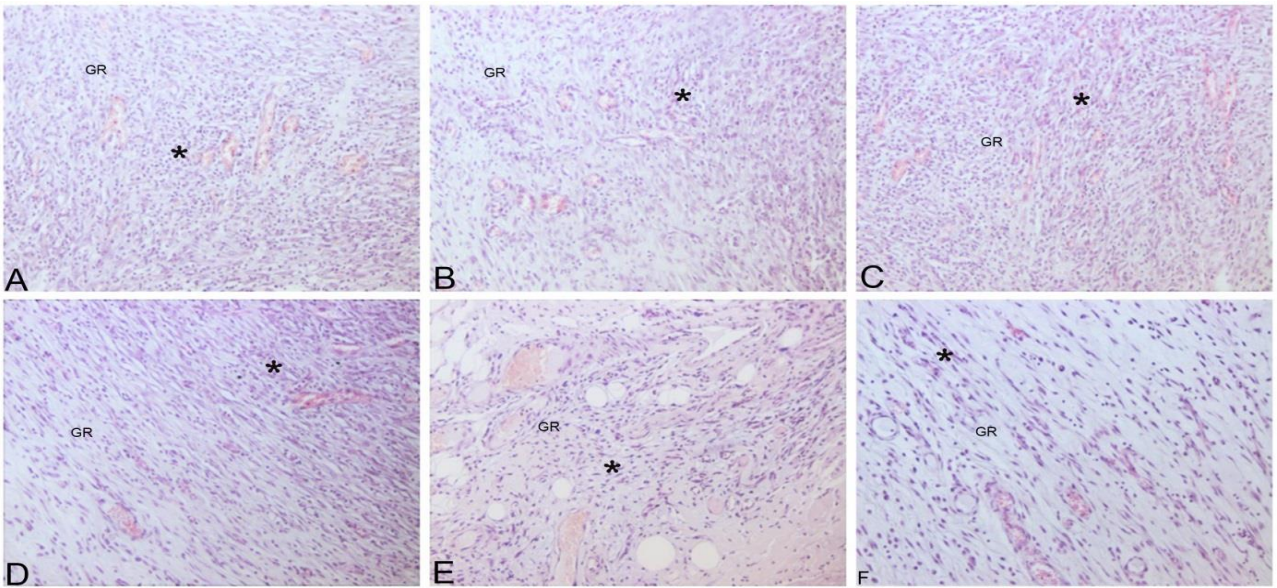
**Tablo 2.** Hücre infiltrasyonu ve granülasyon dokusu oluşumu

Gruplar	Granülasyon dokusu	MN hücre infiltrasyonu	Epitelizasyon şekillenmesi
Kontrol	0,83± 0,40 <sup>a</sup>	2,83± 0,40 <sup>a</sup>	0,16± 0,40 <sup>a</sup>
Lanolin	1,16± 0,40 <sup>a</sup>	2,66± 0,51 <sup>a</sup>	0,33± 0,51 <sup>a</sup>
Dex %2,5	1,16± 0,40 <sup>a</sup>	2,66± 0,51 <sup>a</sup>	1,16± 0,40 <sup>b</sup>
Dex %5	1,83±0,40 <sup>b</sup>	1,83±0,40 <sup>b</sup>	1,33± 0,51 <sup>b</sup>
<i>M. alba</i> %2,5	2,16± 0,40 <sup>b</sup>	1,16± 0,40 <sup>c</sup>	2,83± 0,40 <sup>c</sup>
<i>M. alba</i> %5	2,83± 0,40 <sup>c</sup>	0,83± 0,40 <sup>c</sup>	2,83± 0,40 <sup>c</sup>

a, b ve c harfleri gruplar arası farklılıkları ifade etmektedir (p <0.05).



**Şekil 6.** Kontrol (A) ve Lanolin (B) grupları. Yetersiz epitelizasyon oluşumu (ok başı). Dex %2,5 (C) ve Dex %5 (D) grupları. *M. alba* %2,5 (E) ve *M. alba* %5 (F) grupları. Şiddetli düzeyde epitelizasyon şekillenmesi ve keratinizasyon (ok başı). x20, H&E.



**Şekil 7.** Kontrol (A), Lanolin(B) ve Dex %2,5 (C) grupları. Şiddetli düzeyde Mn hücre infiltrasyonları (\*) ve hafif düzeyde granülasyon doku oluşumu (GR). Dex %5 (D) grubu. Orta düzeyde Mn hücre infiltrasyonu (\*) ve granülasyon doku oluşumu (GR), *M. alba* %2,5 (E) grubu. Hafif düzeyde Mn hücre infiltrasyonu (\*) ve orta düzeyde granülasyon doku oluşumu (GR), *M. alba* %5 (F) grubu. Hafif düzeyde Mn hücre infiltrasyonu (\*) ve ileri düzeyde granülasyon doku oluşumu (GR). x20, H&E

## Tartışma

Hipokrat döneminden beri kesik, yara, yanık gibi dermatolojik rahatsızlıkların tedavisinde geleneksel bitkisel yöntemlere sıkça başvurulmaktadır (Khan ve Jain, 2016; Rodriguez ve ark., 2005).

Yara iyileşmesi sürecinde düzenli ve hızlı bir şekilde granülasyon dokusu oluşumu önemli bir göstergedir (Schreier ve ark., 1993). Açık yara iyileşmesinde granülasyon dokusu gelişiminin (72-96 saatlerde başladığı) belirgin olduğu bildirilmektedir (Uyar ve ark., 2017). Granülasyon dokusu; kollajen, fibronektin ve hyaluronik asidin hücre dışı matriks içine gömülmesi, anjiogenezis ile fibroblast ve yangı hücrelerinin birleşiminden oluşur (Kirsner ve Eaglstein, 1993; Melissa, 1998). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda da ensizyon yaralarının oluşumundan 3-4 gün sonra yara içindeki pıhtının fibrin ipliklerinin yara yüzeyine dikey olarak yöneldiği, yaklaşık 6 gün sonra ise, ensizyonel yara arasındaki kapıllarlar, fibroblastlar ve kollajen lifleri yara yüzeyine yatay bir yapı olarak yara dudaklarını birbirine yaklaştırdığı gözlenmiştir (Swaim ve ark., 1990). Çalışmamızın 3. gününde tüm gruplarda yara kabuğunun yara kenarlarından ortaya doğru gelişmeye başladığı, uygulama gruplarında 6. günden itibaren bu açıklığın daha belirgin bir şekilde yara kabuğu ile kapandığı ve yara alanının küçülmüş olduğu olduğu tespit edilmiştir. 15. günde ise *M. alba* uygulanan tüm gruplarda yara bölgesinde epitelizasyonun tamamen gelişip yara izlerinin neredeyse kaybolduğu görülmüştür (Şekil 5, Tablo 1). *M. alba* verilen her iki grupta da Dex ve kontrol gruplarına kıyasla daha belirgin bir iyileşme gözlenmiştir. Tablo 2'de verilen histopatolojik inceleme sonuçları da dikkate alındığında *M. alba* uygulanan gruplarda gözlemlenen granülasyon dokusu oluşumu diğer gruplara göre artış göstermiştir. Ayrıca, Şekil 7'de *M. alba* uygulanan gruplarda MNH infiltrasyonunun azalarak yerine granülasyon dokusunun oluşmaya başladığı histopatolojik olarak gözlemlenmektedir. Bu sonuçlara göre *M. alba* ekstraktının yara iyileşmesinde granülasyon dokusu oluşumunu teşvik edici ve yara iyileşmesini hızlandırıcı etkili olabileceği düşünülmektedir.

Epitelizasyon, yaralanma sonrası derinin yeniden bariyer özelliğini kazanması amacıyla epitel hücrelerinin göç ederek çoğalmasını, organize ve keratinize olmasını kapsayan bir süreçtir (Melissa, 1998). Bazal membranın hasar gördüğü açık yaralarda epitelizasyon için hücreler yalnızca yara kenarlarındaki sağlam epitel hücrelerinden köken alır (Kirsner ve Eaglstein, 1993). Yaranın oluşmasından sonraki birkaç dakikada meydana gelen pıhtı, epitelizasyona geçici bir engel

oluşturmaktadır. Epitelizasyon, serbest yara kenarlarından başlayarak ilerler ve başka bir yönden gelen hücrelerle karşılaşmaya kadar bu ilerleme devam eder (Theoret 2004). Yara kenarlarının dikiş ile karşı karşıya getirildiği durumlarda epitelizasyon çok kısa sürede başlar (Spotnitz ve ark., 1997) ve 24-48 saat içinde yara iki kenarları arasında periferden merkeze doğru tek katlı epitel hücrelerden oluşan bir köprü şekillenir. Bu köprü, dış tehlikelere karşı yaranın oluşturduğu ilk koruma engelidir (Regan ve Barbul, 1994). Yara kabuğu oluşmuşsa, epitelizasyon bu kabuğun altında şekillenmeye devam eder. Epitelizasyonun tamamlanması yara iyileşmesinin göstergesidir (Pastar ve ark., 2014). Çalışmamız sonunda deney gruplarından çıkarılan tam katmanlı yara örnekleri histopatolojik olarak incelendiğinde gruplar arasında *M. alba* uygulanan gruplardan alınan deri örneklerinde diğer gruplardan daha fazla epitelizasyon şekillendiği anlaşılmaktadır (tablo 2, Şekil 6). Bu veriler dikkate alındığında kontrol, lanolin ve Dex gruplarına kıyasla *M. alba* ekstraktı uygulanan gruplarda yara bölgesinde epitel doku oluşumunun arttığı görülmüştür.

Yara iyileşmesinin değerlendirmesinde yara alanının uzun ve kısa çapının ölçülmesi de önemli bir değerlendirme etmenidir (Flanagan, 2003). Yara iyileşmesinin belirlenmesinde, yaranın yüzey alanı bazı görüntüleme teknikleri (ultrason, manyetik rezonans veya stereofotometri gibi) kullanılmasına rağmen, klinik olarak yara cetveli ile yapılan ölçümler ve yara boyutlarının asetat üzerine aktarılması tekniği sıklıkla kullanılmaktadır (Dorsett-Martin, 2004). Yara alanı ölçüm cetveli kullanılarak yapılan ölçümde yaranın kenar hatları milimetre ya da santimetre karelik şeffaf bir asetat üzerine çizilir ve çizilen alan içerisinde kalan kareler ya manuel olarak sayılır ya da dijital planimetriler kullanılarak yara alanı hesaplanır (Efteli ve Güneş, 2014). Yapılan bu çalışmada yara iyileşmesinde önemli bir gösterge olan yara yüzey alanı değerlerinin *M. alba* ve Dex gruplarında kontrol ve lanolin gruplarından anlamlı olarak daha düşük olduğu ve yara iyileşmesinin bu gruplara göre daha erken şekillendiği gözlemlenmiştir (Tablo 1). Tablo 1 incelendiğinde topikal olarak kullanılan *M. alba* pomadı uygulanan grupların diğer gruplara göre yara iyileşmesini belirgin olarak hızlandırdığı görülmüştür.

## Sonuç

Tıbbi bitkiler ve bitkisel ürünler tedavi amacı ile yıllardır insanlar tarafından kullanılmaktadır. Bu çalışmada, sıçanlarda oluşturulan deneysel yara

modelinde *M. alba* meyvesi ekstraktı ile hazırlanan pomadların yara iyileşme sürecini hızlandırdığı makroskopik ve histopatolojik bulgularla belirlenmiştir. *M. alba* ekstraktının ilaç ve kozmetik sanayiinde kullanılabileceği kanaatindeyiz. Konunun daha iyi anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## Kaynaklar

- Asano** N, Yamashita T, Yasuda K, Ikeda K, Kizu H, Kameda Y, ... & Ryu K S (2001). Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *J Agric Food Chem*, 49(9), 4208-4213.
- Chen** PN, Chu SC, Chiou HL, Kuo WH, Chiang CL, & Hsieh YS (2006) Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Lett*, 235(2), 248-259.
- Das** U, Behera SS, & Pramanik K (2017) Ethno-herbal-medico in wound repair: An incisive review. *Phytother Res*, 31(4), 579-590.
- Devi** B, Sharma N, Kumar D, & Jeet K (2013) *Morus alba* Linn: A phytopharmacological review. *Int. J Pharm Sci Rev Res*, 5(2), 14-18.
- Dey** A, Gupta B, & De J N (2012) Traditional phytotherapy against skin diseases and in wound healing of the tribes of Purulia district, West Bengal, India. *J Med Food*, 6(33), 4825-483.
- Dorsett-Martin** WA (2004) Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair Regen*, 12(6), 591-599.
- Efteli** EÜ & Güneş Ü (2014) Basınç yarası gelişiminde perfüzyon değerlerinin etkisi. *Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi*, 17(3).
- Eo** H, & Lim Y (2016) Combined mulberry leaf and fruit extract improved early stage of cutaneous wound healing in high-fat diet-induced obese mice. *J Med Food*, 19(2), 161-169.
- Flanagan** M (2003) Wound measurement: can it help us to monitor progression to healing? *J Wound Care*, 12(5), 189-194.
- George** Broughton II, Janis JE, & Attinger CE (2006) The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 117(7S), 12S-34S.
- Guo** SA, & DiPietro LA (2010) Factors affecting wound healing. *JDR*, 89(3), 219-229.
- Hussain** F, Rana Z, Shafique H, Malik A, & Hussain Z (2017) Phytopharmacological potential of different species of *Morus alba* and their bioactive phytochemicals: A review. *Asian Pac J Trop Biomed*, 7(10), 950-956.
- Khan** MS, Jain PK (2016) Anti-ulcerogenic effect of ethanolic extract of fruits in chemically induced *Morus alba* ulcer. *Advance Pharmaceutical Journal* 1(1): 13-16
- Kim** KH, Chung, WS, Kim Y, Kim KS, Lee IS, Park JY, & Jang HJ (2015) Transcriptomic analysis reveals wound healing of *Morus alba* root extract by up-regulating keratin filament and CXCL12/CXCR4 signaling. *Phytother Res*, 29(8), 1251-1258.
- Kirsner** RS, & Eaglstein WH (1993) The wound healing process. *Dermatol Clin*, 11(4), 629-640.
- Melissa** CJW (1998) Cutaneous wound repair. 10: 12-32.
- Pakyari** M, Farrokhi A, Maharlooei MK, & Ghahary A (2013) Critical role of transforming growth factor beta in different phases of wound healing. *Adv Wound Care*, 2(5), 215-224.
- Pastar** I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, ... & Tomic-Canic M (2014) Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Adv Wound Care*, 3(7), 445-464.
- Regan** M, Barbul A (1994) The cellular biology of wound healing. 1: 3-17.
- Rodriguez** LG, Wu X, & Guan JL (2005) Wound-healing assay. In *Cell Migration* (pp. 23-29). Humana Press.
- Schreier** T, Degen E, & Baschong W (1993) Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing. *Res Exp Med*, 193(1), 195-205.
- Shukla** R, Kashaw SK, Jain AP, & Lodhi S (2016) Fabrication of Apigenin loaded gellan gum-chitosan hydrogels (GGCH-HGs) for effective diabetic wound healing. *Int J Biol Macromol*, 91, 1110-1119.
- Singer** A J, & Clark R A (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 341(10), 738-746.
- Spotnitz** WD, Falstrom JK, & Rodeheaver GT (1997) The role of sutures and fibrin sealant in wound healing. *Surgical Clinics*, 77(3), 651-669.
- Swaim** SF, Henderson R A, & Pidgeon RS (1990) Small animal wound management. *Lea & Febiger*.
- Theoret** CL JCTiEP (2004) Update on wound repair. 3: 110-122.
- Uyar** A, Akyol T, Yaman T & Keleş ÖF (2017) A Histopathological and Biochemical Investigation of the Wound Healing and Oxidative Stress Effect on the Wound Model of the *Achillea millefolium* in Rats. *Van Vet J*, 28(3).
- Wild** T, Rahbarnia A, Kellner M, Sobotka L, & Eberlein T (2010) Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition*, 26(9), 862-866.
- Younus** I, Fatima A, Ali SM, Usmani S, Begum Z, Badar S, & Asghar R (2016) A review of ethnobotany, phytochemistry, antiviral and cytotoxic/anticancer potential of *morus alba* linn. *IJARR*, 1(2), 84-96.




## Ultrasonographic Examination as a Useful Tool Diagnose a Plastic Foreign Body Causing Duodenal Obstruction in a Cat

Murat VURUCU\*<sup>1</sup>, Ozan AVCI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kayseri, Türkiye

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Afyon, Türkiye

 Vurucu M 0000-0002-3791-7176

Avcı O 0000-0003-3941-6786

\*Corresponding Author's E-Mail: muratvurucu87@gmail.com

### Abstract

A 5-year-old, sterilized, mixed-breed female cat was referred to Veterinary Pet Clinic with a vomiting complaint. Treatment for gastrointestinal infection was initiated, but the cat was referred to the clinic again 24 hours later with severe vomiting, fasciculation, tremor, loss of pupillary reflex, and worsening general condition. In this case, ultrasonographic imaging was used instead of radiographic imaging, which is frequently employed as the first imaging method. The structure of a foreign body was observed during the ultrasonographic examination. When the foreign body was described, the patient's owner confirmed that her cat had a toy that was consistent with this description. Blood tests revealed hyponatremia, hypochloremia, and hypokalemia. Significant neurological findings (fasciculation and tremor) were observed. Hypochloremic metabolic alkalosis was diagnosed due to complete duodenal obstruction. After the patient's postoperative care was completed, full recovery was achieved.

Received 28 December 2019  
Accepted 1 September 2020  
Published 30 December 2020

### Key words:

Vomiting, tremor, foreign body, ultrasonographic examination

**Cite this article:** Vurucu M, Avcı O, (2020) Ultrasonographic Diagnosis of a Plastic Foreign Body Causing Duodenal Obstruction in a Cat. Turk Vet J, 2(2):74-79

### Bir Kedide Doudenal Obstruksiyona Neden Olan Plastik Yabancı Bir Cismin Faydalı Bir Tanı Metodu Olan Ultrasonografik Muayene İle Teşhisi

#### Özet

5 yaşında kısır dişi kedi (melez ırk), kusma şikayeti ile kliniğe getirildi. Gastrointestinal enfeksiyon tedavisi başlandı. 24 sonra kusma şikayetinin artarak devam ettiği ve genel durumun giderek kötüleştiği gözlemlendi. Fiziksel muayenede kas seğirmesi ve tremorlarıyla birlikte pupillar refleks kaybı tespit edildi. Bu vakada; sıklıkla ilk görüntüleme yöntemi olarak kullanılan radyografik görüntüleme yerine ultrasonografik görüntüleme kullanıldı. Ultrasonografik muayenede yabancı cismin tespiti yapıldı. Yabancı cisim tarif edildiğinde, hastanın sahibi, kedisinin bu tanıma uygun bir oyuncak olduğunu doğruladı. Kan tahlili sonuçlarında hiponatremi, hipokloremi ve hipokalemi mevcuttu. Belirgin nörolojik bulgular (kas seğirmeleri ve tremorları) gözlemlendi. Tam duodenal obstrüksiyonun neden olduğu hipokloremik metabolik alkalosis teşhisi konuldu. Hastanın postoperatif bakımları tamamlandıktan sonra tam bir iyileşme sağlandı.

**Anahtar Kelimeler:** Kusma, tremor, yabancı cisim, ultrasonografik muayene

### Introduction

Gastrointestinal foreign bodies are frequently seen in veterinary medicine, and they cause various clinical findings depending on the severity and duration of obstruction (Aranson ve ark., 2000). Mild clinical signs may be observed in partial obstructions in cats. Maldigestion and malabsorption symptoms may also be seen in these animals. Severe, dramatic clinical findings can be seen in complete obstruction (Papazoglou ve ark., 2003). Moreover, severe vomiting and diarrhea can be observed, possibly resulting in hypovolemia and septic shock in cats (Bebchuk, 2002).

Most obstructive, nonlinear foreign bodies cause edema of the intestinal wall and progressive necrosis in the intestine. This situation cause the blood supply of the intestinal segment in conjunction with luminal distention. As a result, an ileus can be formed and the number of pathological intraluminal bacteria may increase, leading to a breakdown of the mucosal barrier and endotoxemia (Ellisson, 1993a).

Possible reasons for muscle tremors and twitching in cats can be listed as toxicities, encephalomyelitis, hereditary reasons, degenerative cerebral diseases,



hypokalemia, hepatic encephalopathy, and cat hyperesthesia syndrome. In addition, hypochloremic metabolic alkalosis with neural symptoms caused by gastrointestinal obstruction has been reported in cats (Jukes ve ark., 2017).

Radiographic and ultrasonographic imaging methods are frequently used for the diagnosis of gastrointestinal foreign bodies. These more effective methods are still to be discussed between inside by clinicians. This study was evaluated as a case report due to the use of ultrasonographic examination alone in the diagnosis of gastrointestinal foreign bodies.

## Case

A 5-year-old, sterilized, mixed-breed female cat was referred to Veterinary Pet Clinic with a complaint of vomiting. The cat's general condition was good, but the owner reported that it had vomited several times in one day before. The cat's body temperature was 39°C. Dehydration was not present, and the hemogram parameters were normal (Table 1). More detailed laboratory analysis and radiographic imaging were recommended to the patient's owner. However, the owner did not agree due to cost considerations. The patient was thought to have a gastrointestinal infection. First, treatment was started to cease vomiting and protect the stomach with maropitant (Cerenia, Zoetis, USA) and ranitidine (Ulcuran, Yavuz Farma, Turkey). An antibiotic (Enrofloxacin, Baytril, Germany) was also used to protect the cat from possible infection. The patient was referred to the clinic due to increased symptoms of vomiting and dehydration, lethargy, hypovolemia, fasciculation, and tremor 24 hours later. Thoracic and cardiac auscultation findings were normal. The abdomen was taut and painful on palpation. The body temperature was normal, at 37.6°C. Lactate ringer solution was administered to the patient intravenously until the laboratory results were obtained, from which, a foreign body causing gastrointestinal obstruction was suspected. The patient's Out of surface of abdomen was shaved. There was no abnormality in the liver or kidneys in the ultrasonographic examination. Dense content compatible with crystals was seen in the urinary bladder (Figure 1a). The stomach was filled with a large amount of liquid content (Figure 1b). The thickness of the stomach wall was normal, and edema was detected. The liquid content was observed in the pylorus and duodenum. An oval structure (foreign body) with a diameter of 15 mm was detected at the end of the content transition in the duodenum. This foreign

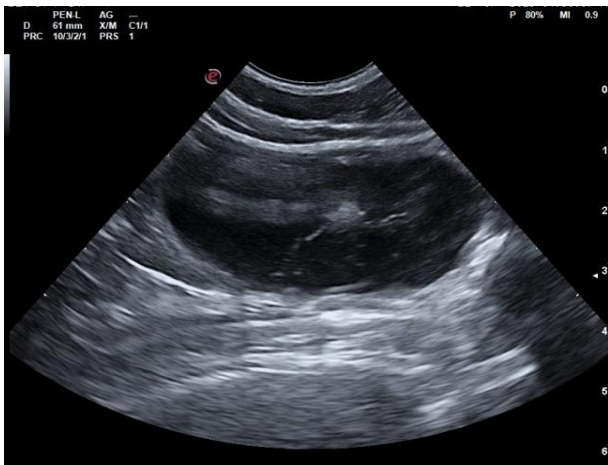
body had a hypoechoic external contour with acoustic shadowing, and the center of the foreign body was anechoic in ultrasonographic examination (Figure 2a). Multiple hyperechoic structures with small diameters resembling a serrated structure were detected in the scan sections toward the outer surface of the foreign body (Figure 2b). The object was described to the patient owner as detected in ultrasonographic examination. The patient owner said that there was a plastic ball with a serrated outer surface with which the cat frequently played.

The obtained laboratory results indicated decreased levels of the following parameters: sodium, at 141 mmol/L (normal range: 150–165 mmol/L); potassium, at 2.4 mmol/L (normal range: 3.5–5, mmol/L) and chlorine, at 104 mmol/L (normal range: 112–129 mmol/L). Meanwhile, the following parameters had increased levels: urea, at 27.77 mmol/L (normal range: 5.71–12.85 mmol/L); and glucose, at 18.21 mmol/L (normal range: 4.11–8.83 mmol/L). A 0.9% NaCl solution was given intravenously by changing the fluid treatment. The diagnosis of complete duodenal obstruction was made with the help of the present anamnesis, ultrasonographic imaging, laboratory results, and clinical findings. Before the operation, anesthesia was induced using xylazine HCl (Xylazinbio, Germany, 0.8 ml/kg IM) and ketamine HCl (Brema, Czech Republic 0.7 ml/kg IM and 0.1 ml/kg IM for maintenance in two different doses). The operation was started with a standard surgical procedure. The incision was started from the median line of the abdomen to the umbilical artery and reached the stomach and duodenum. The foreign body was detected by palpating in the proximal line of the duodenum (Figure 3a). During the operation, the duodenum was observed to hemorrhagic and edematous, and the excised serrated foreign body was photographed (Figure 3a, b).

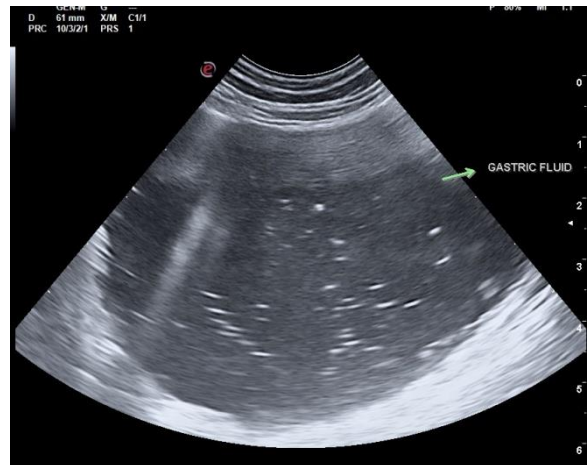
In the postoperative period, feeding was limited for two days. Amoxicillin and clavulanic acid (Synulox, Pfizer, USA, daily 0,4 ml SC for five days ) and enrofloxacin (Baytril, Bayer, Germany, daily 0,4 ml SC for five days) antibiotic combinations were used. Ulcuran (ranitidine, 1 mg/kg IV every 12 hours for five days), carprofen (Rymadyl, Zoetis, USA, daily 0,3 ml SC for five days), amino acids, vitamin B complex, electrolytes, and dextrose (Duphalayt, Zoetis) were applied via the intravenous and subcutaneous routes. Fluid intake was started in second day of the treatment. A week later, the patient was sent to the home from the veterinary clinic. A complete recovery was achieved. After postoperative treatment food intake was limited in the first two days. Amoxicillin and Clavulanic Acid

(Synulox ; Pfizer) and enrofloxacin (Baytril; Bayer) antibiotics were used in combination. Ulcuran (3.5 mg / kg twice daily), carprofen (Rymadyl; Zoetis), Amino acids, vitamin B complex, Electrolytes and dextrose (Duphalayt zoetis) were applied. Liquid

food was started at the end of the second day of the treatment. One week later, the patient was discharged from veterinary clinic. A complete recovery was achieved.



**Figure 1a.** Monitoring the dense crystal in urinary bladder



**Figure 1b.** The fundus of the stomach is quite enlarged and tense with dense fluid content



**Figure 2a.** Oval foreign body with a hypoechoic surface and anechoic center.



**Figure 2b.** A large number of hyperechoic areas resembling a jagged structure can be easily selected in ultrasound sections towards the outer surface of the foreign body. Liquid accumulation in the area behind the obstruction is remarkable.



**Figure 3a.** During the operation, the foreign body was palpated with the hemorrhagic and edematous appearance of duodenum



**Figure 3b.** Serrated foreign body

**Table 1.** The hemogram parameters of the patient.

Analyte (units)	Reference interval	Admission	Follow up 5 months later
WBC ( $\times 10^9/l$ )	5,5-19,5	13,3	9,7
PLT ( $\times 10^9/l$ )	300-700	133	293
Hemoglobin (mmol/l)	8-15	20	13,4
HCT (mmol/l)	30-45	55,5	40,9
Sodium (mmol/l)	150-165	129	158
Potassium (mmol/l)	3,5-5,8	2,1	4,2
Chloride (mmol/l)	112-129	80	117
Glucose (mmol/l)	4,11-8,83	18,78	7,55
Urea (mmol/l)	5,71-12,85	32,14	8,43
Creatinine (mmol/l)	70,72-212,16	188,24	110,50
Total Protein (g/l)	57-89	75	69
Albumin (g/l)	22-40	28	32
ALT (IU/l)	5-130	119	78
AST (IU/l)	0-48	57	33

## Discussion and Conclusion

Many studies have reported that hypochloremic metabolic alkalosis may occur in proximal gastrointestinal obstructions caused by foreign bodies (Boag ve ark., 2005). In an experimental

study of dogs, it was reported that potassium and sodium secretion were proximal to the occlusion of the ileum. As a result of the secretion, many fluids and electrolytes were retained in the gastrointestinal lumen (Shields, 1965). Gastric fluid contains abundant chloride, sodium, and potassium. Loss of these fluids and electrolytes could cause metabolic alkalosis (Boag ve ark., 2005; Jukes ve ark., 2017). Moreover, 87% of the instances of metabolic alkalosis in cats have hypochloremic properties (Ha ve ark., 2013). In one study, it was reported that hypochloremic metabolic alkalosis due to gastrointestinal obstruction in cats caused fasciculation and tremors. Another case report was the first to show fasciculation and tremors caused by hypochloremic metabolic alkalosis due to duodenal obstruction (Jukes ve ark. 2017). In the present study, duodenal obstruction caused by a foreign body was detected by ultrasonographic examination. Abundant fluid accumulation behind the obstruction was observed. Serum potassium and chloride levels had declined because of an accumulation of fluid and electrolytes in the lumen and because of vomiting. In our case, hypochloremic metabolic alkalosis was also thought to have occurred.

In this case, gastrointestinal obstruction rather than a neurological origin was suspected at first because of fasciculation, tremor, abdominal swelling, and tenderness with severe vomiting (although fasciculation and tremor may also originate neurologically). It was thought that neuromuscular symptoms had improved with a significant increase in electrolyte levels and that neurological clinical findings had been caused by electrolyte abnormalities, especially hypokalemia caused by duodenal obstruction.

Foreign bodies may be found incidentally and, depending on the location of those foreign bodies, may cause various clinical symptoms in a patient. If the foreign body is radiopaque, it can be diagnosed by radiography. But if the foreign body has radioactive properties that are masked by the content or liquid, other methods, such as using air or barium, may be required to identify the foreign body. If the exact location of a radiopaque foreign body in the gastrointestinal tract remains uncertain after radiography, further study may be needed to determine an appropriate identification (Tidwell ve Pennick, 1992). Foreign bodies in the stomach and intestines may be identified by using ultrasonography. Ultrasonography has been reported to be very useful and effective in detecting gastrointestinal foreign bodies (Bebchuk, 2002; Winter ve ark., 2017). Many foreign bodies exhibit a characteristic ultrasonographic appearance

because of their tendency to transmit or attenuate sound waves. The presence of a shiny boundary surface with a strong shadow typically indicates a foreign body (Tidwell ve Pennick, 1992; Koenhemssi ve ark., 2011). Foreign plastic bodies may exhibit different ultrasonographic properties (Figures 2a-2b). Because of the way the body absorbs sound waves during an ultrasonographic examination, the semicircular echogenic surface may exhibit many different appearances, but not limited to acoustical shading or lack of shading, homogeneity, roundness, anechoic centering, and side shading. The plastic foreign body that we detected was similar to the one detected by Tidwell ve Pennick (1992), i.e., round echogenic. The center was generally anechoic with acoustic shadowing. In contrast, an irregular oval hyperechoic area with a small number of contours was observed on the outer surface of this object. These contours resembled those of an object with a serrated outer surface. This ultrasonographic image facilitated predictions about the object during diagnosis.

According to one study, ultrasonography is insufficient for imaging foreign bodies in the stomach because of the gas content (Özgermen ve ark., 2016). But in an another study, 14 cases of foreign bodies that could not be detected by radiography were detected by ultrasonography, and seven of these foreign bodies were in the stomach (Tidwell ve Pennick, 1992). In a different study, 52% of mechanical obstructions were detected by radiography, and 96% were correctly diagnosed by ultrasonography (Sharma 2010). It has also been reported that ultrasonography was the only imaging method that could be used in the diagnosis of gastrointestinal foreign bodies (Tyrrell ve Beck, 2006). In this study, 100% of foreign bodies were found by ultrasonography.

In our case, the diagnosis was quickly made by ultrasonography without using radiographic imaging. Detailed information was obtained about the shape and structure of the foreign body. The diagnosis was confirmed by information from the patient. Detailed information about the anatomical location of the body and the current status of the surrounding intestinal tissues was also obtained. As a result, the operation could be done more quickly and reliably than it could have been without ultrasonography.

Ultrasonographic examination is a fast and reliable diagnostic method that enables noninvasive and rapid application in cases of suspected gastrointestinal obstructions by foreign bodies.

Other findings such as acute pancreatitis, peritoneal fluids, mechanical obstructions, and benign or malign gastrointestinal masses can also be examined

in detail by ultrasonography. In addition, ultrasonographic examination provides more detailed information than radiographic imaging does about the anatomical location of foreign bodies prior to surgery. Because of the advantages of ultrasonographic examination, it may be preferred as the primary diagnostic method for detecting gastrointestinal foreign bodies.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### References

- Aronson LR, Brockman DJ, Brown DC** (2000) Gastrointestinal emergencies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 30(3): 555-579
- Bebchuk TN** (2002) Feline gastrointestinal foreign bodies. *Vet Clin Small Anim* 32: 861-880. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(02\)00030-x](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(02)00030-x).
- Boag AK, Coe RJ, Martinez TA, Hughes D** (2005) Acid-base and electrolyte abnormalities in dogs with gastrointestinal foreign bodies. *J Vet Intern Med*; 19: 816-821. [https://doi.org/10.1892/08916640\(2005\)19\[816:aaeaid\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/08916640(2005)19[816:aaeaid]2.0.co;2)
- Ellison GW** (1998) Intersinal obstruction. In: Bojrab MJ (ed). *Disease Mechanisms in Small Animal Surgery.* Philadelphia USA pp 252-257.
- Ha YS, Hopper K and Epstein SE** (2013) Incidence, nature, and etiology of metabolic alkalosis in dogs and cats. *J Vet Intern Med*; 4: 847-853. <https://doi.org/10.1111/jvim.12122>
- Jukes A, Gunew M, Marshall R** (2017) Severe muscle fasciculations and tremor in a cat with hypochloremic metabolic alkalosis secondary to duodenal obstruction. *JFMS Open Reports* 1-4. <https://doi.org/10.1177/2055116916686427>
- Koenhemsi L, Iskefli O, Dokuzeylül B, et al.** Radiologic and ultrasonographic examination of a dog with acute gastric dilatation due to foreign body [abstract]. *Van Vet J*; 3: 185-187.
- Ozgermen BB, Sen Y, Unal E, et al.** (2011) Clinical, radiographic and ultrasonographic evaluation of gastric diseases in dogs [abstract]. *Turk J Vet Med Soc* 2016; 2: 44-57.
- Papazoglou LG, Patikas MN, Rallis T** (2003) Intestinal foreign bodies in dogs and cats. *Comp Cont Educ Pract*; 25: 830,843.
- Sharma A, Thompson MS, Scrivani PV et al.** (2011) Comparison of radiography and ultrasonography for diagnosing small-intestinal mechanical obstruction in vomiting dogs. *Vet Radiol Ultrasound*; 3: 248-255. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2010.01791.x>
- Shields R** (1965) The absorption and secretion of fluid and electrolytes by the obstructed bowel. *Br J Surg*; 10: 774-779. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800521019>

**Tidwell** AS, Pennick DG (1992) Ultrasonography of gastrointestinal foreign bodies. *Vet Radiol Ultrasound*; 3:160-169. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1992.tb01439.x>

**Tyrrell** D, Beck C (2006) Survey of the use of radiography vs. ultrasonography in the investigation of gastrointestinal foreign bodies in small animals. *Vet Radiol Ultrasound*; 4:404–408. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2006.00160.x>


**Winter** DM, Barry KS, Johson MD, et all. (2017) Ultrasonographic and computed tomographic characterization and localization of suspected mechanical gastrointestinal obstruction in dogs. *J Am Vet med Assoc*; 3: 315-321. <https://doi.org/10.2460/javma.251.3.315>



## Penile Prolapse and Treatment in a Sugar Glider (*Petaurus breviceps*)

Tugba KURT\*, Ziyet Dila ATESPARE, Emine Esma CERKEZ

Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, University of Istanbul- Cerrahpasa, Avcilar, Istanbul – TURKEY

 Kurt T 0000-0002-1467-2145 Atespare ZD 0000 0002 3106 7596 Cerkez EE 0000 0002 6832 2263

\*Corresponding Author's E-Mail: tubikkurt@gmail.com

### Abstract

Sugar gliders are marsupials that have recently become popular in our country. They usually live in groups and feed on fruit extracts. Unbalanced diet and unsuitable living conditions cause many diseases. One of these diseases is penile prolapse, which we detected in a sugar glider that came to our hospital. Patient diagnosed with penile prolapse, was taken to the operation immediately. Penis tissue was checked and it was found to maintain its viability. Therefore the replacement of the prolapsed tissue was performed. In this way, the patient was protected from the surgical wound, long anaesthesia duration and postoperative complications. No complication and recurrence was observed in the postoperative controls. The patient returned to normal life in a short time, began to mate in postoperative 6 months.

Received 4 May 2020  
Accepted 30 November 2020  
Published 30 December 2020

### Key words:

*Sugar glider, forked penile, penil prolapse, marsupials*

**Cite this article:** Kurt T, Atespare ZD, Cerkez EE (2020) Penile Prolapse And Treatment in a Sugar Glider (*Petaurus breviceps*) Turk Vet J, 2(2):80-83.

### Bir Uçan Kuskusta Prolapsus Penis Olgusu ve Tedavisi (*Petaurus breviceps*)

#### Özet

Uçan kuskuslar (sugar glider), ülkemizde son zamanlarda popüler hale gelen keseli hayvanlardır. Genellikle gruplar halinde yaşar ve meyve özleri ile beslenirler. Dengesiz beslenme ve uygun olmayan yaşam koşulları birçok hastalığa neden olabilir. Bu hastalıklardan biri, fakültemize gelen bir uçan kuskusta tespit ettiğimiz penis prolapsusudur. Prolapsus olguları acil sayıldığından penis prolapsus tanısı konulan hasta, acil olarak değerlendirilip operasyona alındı. Penis dokusu kontrol edilerek canlılığını koruduğu görüldü. Daha sonra, prolabe dokunun reddi gerçekleştirildi. Böylelikle hasta, cerrahi yaradan, uzun anestezi süresinden ve postoperatif komplikasyonlardan korunmuş oldu. Postoperatif kontrollerde herhangi bir komplikasyon ve nüks gözlenmedi. Hasta kısa sürede normal yaşamına döndü ve postoperatif 6. ayından itibaren çiftleştiği de sahibi tarafından bildirildi.

**Anahtar kelimeler:** Uçan kuskus, çatal penis, penis prolapsusu, keseliler

### Introduction

The sugar gliders (*Petaurus breviceps*) live in the treetops of Australia, Tasmania, Indonesia, and Papua-New Guinea (Corriveau, 2009). Sugar gliders are nocturnal, omnivorous, arboreal marsupials that feed on a variety of plant, avian pelleted diets, formulated primate diets, nectar, fruits, vegetables, eggs, insect exudates and arthropods, with natural diet dependent on habitat characteristics and season (Corriveau, 2009; Dierenfeld, 2009). In spring and summer, gliders fed mainly on insects because of increased protein need associated with reproduction. In our country, they have recently started to become a popular pet animal. Marsupial reproductive anatomy and physiology is significantly different from mammals. Sugar gliders have a cloaca where the gastrointestinal tract, urinary ducts and reproductive tract all share a common opening (Rivera, 2017). The scrotum and testes are external

and found proximal to the cloacal opening (Johnson-Delaney and Lennox, 2017).

Cloacal prolapse is a condition where the inner tissues of the cloaca protrude from the vent, exposing the intestines, oviduct for female or penis for male. In this report, a sugar glider with a penile prolapse was discussed. The penis of the male lies on the ventral aspect of the cloacal floor (Carboni and Tully, 2009).

The tip of the penis of the sugar glider is forked (to match the female's double vagina). Sometimes it can be perceived as abnormal by the owners (Capello and Lennox, 2006). Penile prolapses can be results of inflammation, infection, nutritional secondary hyperparathyroidism stress, neurologic or traumatic defects involving the retractor penis muscles or cloacal sphincter, and straining from intestinal parasites, impaction of the cloaca with gastrointestinal foreign bodies and reported that

penis prolapse was occurred forced separation after copulation (Doğu et al., 2015). Particularly it has been considered that stress may cause an increase in paracloacal gland size, resulting in prolapse of the bifid penis (Rapheal et al., 2018). In patients with penile prolapse, the availability of organs should be assessed. In cases where the penis is necrotic, removal of the necrotic tissue or distal penile amputation may be considered. Sugar gliders have a bifurcated penis and urinate from the penile base, so amputation at the forked end of the penis does not interfere with urination (Sladky and Miwa, 2016). In cases where the tissue is still considered viable, the organ should be reduced or rejected. It is useful to apply elizabethan collar against the possibility of self-mutilation of the patient.

In this report; edema and discoloration in the prolapsed penis tissue have not been observed. First of all, rejection of prolapsed tissue was tried under general anaesthesia and it was successful. In this way, the duration of anaesthesia was kept short, and the patient was protected from the complicated and bleeding cases of penile amputation, castration.

### Case History

A seven years old, captive male 130 g sugar glider was presented with penile prolapse for 3 hours (Fig 1). According to the anamnesis, the urine, stool, appetite of the patient were normal and this disorder occurred suddenly. The owner prevented the tissue from drying out with saline solution application and urgently admitted to our hospital. According to first examination, clinical status, abdominal palpation findings of the patient and the tissue color of prolapsed penis were normal. Thus, an emergency operation decision was taken for the patient. Due to the urgency of the patient, blood test could not be performed.



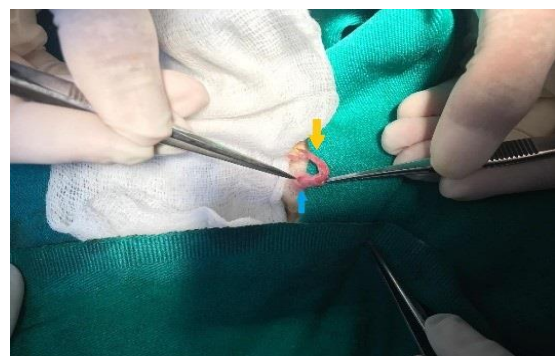
**Figure 1.** Penile prolapse in a 7 years sugarglider (black arrows: bifurcated penis)

Sugar gliders should be fasting before surgery. At least 4 hours is recommended but a longer duration may be required for surgeries of the gastrointestinal tract (Rivera, 2017).

Since vascular access is difficult and sugar gliders rapidly lose body temperature during anaesthesia, the duration of anaesthesia should be kept as short as possible (Morges et al., 2009). Endotracheal intubation is difficult and requires that the glider be deeply anesthetized. Injectable anaesthetics are more disadvantageous in controlling depth than inhalation anaesthesia (Corriveau, 2009).

In this case, inhalant isoflurane (2-3%) in 100% oxygen was administered via facemask for induction and maintenance of anaesthesia. Meloxicam 0,1 mg/kg SC (Meloxicam, BaVet, Turkey) were used preoperatively. The patient was placed dorsally on the operation table. The body temperature was 30,2 °C. While the patient was under anaesthesia, heart rate was

continuously monitored with a pediatric stethoscope. In the detailed examination performed while the patient was under anaesthesia necrosis and edema were not seen on the penis. So, it was cleaned using with antiseptic dilution including 10% povidone iodine. After the antiseptic treatment prolapsed penis was simply rejected inside the preputium (Fig 2). One simple separate suture technique was applied to the cloaca. Elizabethan collar was applied just before waking up (Fig 3). Isoflurane was switched off and the patient was awakened without any problem. Enrofloxacin, one of the fluoroquinolones, was preferred in this patient. Meloxicam suspension 0.1-0,2 mg/kg orally, once a day for 3 days and enrofloxacin suspension 2.5- 5 mg/kg orally, once a day for 5 days were prescribed (Hess, 2019). Sutures were removed on the postoperative 5th day and no recurrence was observed (Fig 4). There was no complication in the later stages of the patient and the patient resumed normal life.



**Figure 2.** After the antiseptic treatment prolapsed penis (yellow arrow) was simply rejected inside the preputium (blue arrow)



**Figure 3.** One simple separate suture technique was applied to the cloaca (red arrow). Handmade Elizabethan collar was applied just before waking up



**Figure 4.** Sutures were removed on the postoperative 5th day. (Blue arrow: cloaca. red arrow: testes)

### Discussion

It is important for clinicians to know the diseases of sugar gliders, which have recently become widespread as pet animals in Turkey. In the literature, there is not much information about the rejection of prolapse cases penis in sugar gliders because it is often unnoticed and delayed.

The advantages of this procedure include its simplicity, the speed of the operation, the shortest anaesthesia time and the rapid recovery time with minimum pain. During the treatment of prolapse penis, neutering and distal penile amputation may be required. But complications described with

orchietomy include self-mutilation and over grooming around the surgical site (Morges ve ark., 2009). In addition, there is a long anaesthesia time, pain and risk of bleeding. The postoperative process is long. Serious postoperative surgical complications were not observed with these procedures. Veterinarians should be careful when choosing antibiotics for sugar gliders. Antibiotics that are considered safe in herbivores are the fluoroquinolones, trimethoprim-sulpha combinations, sulphas, aminoglycosides, chloramphenicol, and metronidazole for anaerobes (Carboni ve Tully, 2009). Caution should be taken not to induce edema to the patagium (Patagium is a fold of skin from the body that extends between the fore leg and hind leg (wrist to ankle). This membrane acts almost like a parachute, catching the air and helping the animal glide between branches when performing subcutaneous injection. So subcutaneous injections are given over the shoulder (Hess, 2019). Their body temperature decreases very quickly under anaesthesia and body temperature should be maintained between 27-31 °C. Therefore heaters should always be used. There is no incision in this technique, so postoperative self-injury behavior is rare (Newbury et al., 2005). To prevent the tissue from prolapsing again, cloaca should be narrowed with a single stitch. The patient's diet should be programmed until the stitch is removed. In this way, diarrhoea, constipation and excessive straining are prevented. Just in case, an Elizabethan collar was applied to the patient.

As a result; sugar gliders should be maintained as a group with one male and a number of females and cared as pet animals if proper diet and cage conditions can be provided. Thus, they are kept away from predisposing factors especially stress factors for both prolapse penis and other diseases.

### References

- Carboni D, Tully TN (2009)** Marsupials, Manual of Exotic Pet Practice, 299-325.
- Capello V and Lennox AM (2006)** Gross and Surgical Anatomy of the Reproductive Tract of Selected Exotic Pet Mammals, Association of Avian Veterinarians, 20-21.
- Corriveau LA (2009)** Purdue University Veterinary Teaching Hospital, Wellness Clinician, Sugar Glider.
- Dierenfeld ES (2009)** Feeding Behavior and Nutrition of the Sugar Glider (*Petaurus breviceps*), Elsevier Vol 12, 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2009.01.014>
- Doğu Z, Aral F, Şahinöz E, Taşkavak E (2015)** Penile prolapse in Euphrates soft-shelled turtle (*Rafetus euphraticus* Daudin, 1802), *Ege J Fish Aqua Sci* 32(3): 169-172. <https://doi.org/10.12714/egejfas.2015.32.3.08>



**Hess L** (2019), Veterinary Center for Birds & Exotics, Bedford Hills, NY, Sugar Gliders, MSD Veterinary Manuel.

**Johnson-Delaney CA & Lennox AM** (2017) Reproductive Disorders of Marsupials. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 20(2), 539–553. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2016.11.011>

**Morges MA, Grant KR, MacPhail CM and Matthew S** (2009) A Novel Technique for Orchiectomy and Scrotal Ablation in the Sugar Glider, *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, Vol. 40(1): 204-206. <https://doi.org/10.1638/2007-0169.1>

**Newbury S, Hanley CS, and Paul-Murphy J** (2005) Sugar glider castration and scrotal ablation. *Exotic DVM*. 7: 27-30.

**Raphael AM, Carmen BA, Toi AC, Jannelle LA, Treyton JD, Ingeborg ML** (2018) Scrotal Stalk Ablation and Orchiectomy Using Electrosurgery in the Male Sugar Glider (*Petaurus breviceps*) and Histologic Anatomy of the Testes and Associated Scrotal Structures, *Journal of Exotic Pet Medicine*. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2018.02.037>

**Rivera S** (2017) *Exotic Animal Medicine for the Veterinary Technician*, 371.


**Sladky K, Miwa Y** (2016) *Veterinary Clinics in North America: Exotic Animal Practice: Soft Tissue Surgery*.



## Lumpy Skin Disease (LSD): Recent outbreak and threatening Smallholder Cattle farmer in Nepal

Uddab POUDEL

Paklihawa campus, Institute of Agriculture and Animal Science, Tribhuvan University, Siddharthanagar -1, Rupandehi, Nepal

 Poudel U 0000-0002-1039-2816

\*Corresponding Author's E-Mail: poudeluddab15@gmail.com

### Abstract

Lumpy skin disease (LSD) is an economically significant viral emerging and transboundary disease which mainly affects cattle of all age group and all breed with clinical signs of high fever, firm nodules on skin and enlarged peripheral lymph nodes. Though viral infection has low mortality, it has high morbidity leading to massive drop in milk production and reduces reproductive performance of cattle. Recent outbreak of LSD has threatened the Nepalese cattle farmer and rapid practice and implementation of effective prophylactic measures are due essential.

Received 16 September 2020

Accepted 5 October 2020

Published 30 December 2020

### Key words:

Cattle, Disease, Emerging, Nepal,

**Cite this article:** Poudel U (2020) Lumpy Skin Disease (LSD): Recent outbreak and threatening Smallholder Cattle farmer in Nepal Turk Vet J, 2(2):84-86.

### Yumrulu Deri Hastalığı (YDH): Son Salgın Nepal'de Küçükbaş Sığır Çiftçisini Tehdit Ediyor

Yumrulu Deri Hastalığı (YDH), esas olarak yüksek ateş, deride sert şişkinlik ve yayılmış dairesel yumru şişkinlikleri ile klinik belirtileri gösteren, her yaşta sığır ve yavrularını etkileyen, ekonomik olarak belirgin ve sınır ötesi (bulaşıcı) viral etkisi olan hastalıktır. YDH enfeksiyonu düşük mortaliteye sahip olmasına rağmen, yüksek morbidite nedeniyle ciddi süt ve fertilitite kaybına neden olur. YDH'nin son salgını Nepal'deki sığır yetiştiricilerini tehdit etmiştir ve etkili koruyucu önlemlerin hızlıca denenmesi ve uygulamaya konması gereklidir.

Lumpy skin disease (LSD) is a severe viral disease with narrow vertebrate host range that mainly affects cattle, both *Bos indicus* and *Bos taurus* among which, *Bos taurus* is more susceptible and vulnerable to clinical disease compare to *Bos indicus*, and also, domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) and responsible for devastating economic and production loss and negative impacts in trade (Farah Gumbe, 2018; Mulatu and Feyisa, 2018). As newly emerged transboundary animal disease (TAD), LSD is spread by live and dead cattle and via its products, furthermore, virus is excreted via blood, saliva, semen, nasal and lachrymal secretions, and milk of infected animals (transmissible to suckling calves) that may be sources of infection to other susceptible cattle (Allepuz et al., 2019; Mulatu and Feyisa, 2018). To date, transmission is most likely occurred by blood-sucking arthropod vectors such as stable flies (*Stomoxys calcitrans*), mosquitoes (*Aedes aegypti*), and hard ticks (*Rhipicephalus* and *Amblyomma species*) by intrastadial, transstadial and transovarial transmission however, new evidence suggests that the ubiquitous, synanthropic house fly, *Musca domestica*, also play significant role in

LSDV transmission (Sprygin et al., 2019). The disease is caused by Lumpy skin disease virus (LSDV) which is large, complex double-stranded deoxy-ribonucleic acid (ds DNA) virus whose size range from 230-260nm, with 151 kilobase-pair (kbp) genome, and belongs to Capripoxvirus genus of Poxviridae family (Tulman et al., 2001). Morbidity and mortality rate varies widely depending upon health, immune status of the hosts, animal movements, wind and rainfall patterns affecting populations of blood sucking arthropods vectors, where morbidity range from 3-85% with lower mortality rate of 1-3% may exceeds up to 40% (Al-Salihi, 2014; Sprygin et al., 2019). The disease outbreak can be widespread and difficult to control. The first case of LSD was seen in 1929 in Zambia (formerly Northern Rhodesia), and that time, LSD clinical signs were considered to be the consequence either of poisoning or a hypersensitivity to insect bites (Al-Salihi, 2014). With the same clinical signs, the disease further spread into Botswana by 1943 and then into South Africa as panzootic, where it affected over eight million cattle causing serious economic loss (OIE, 2018). In 1957, LSD entered in east Africa in Kenya and spread north into Sudan in

1970 and by 1974 disease had spread west as far as Nigeria and in 1977, disease further reported from other African countries including Mauritania, Mali, Ghana and Liberia (OIE, 2018). Between 1988 and 1989, disease was confirmed for the first time outside African continent in Egypt and Israel and again reported in 2006 (Brenner et al., 2006). Outbreak of LSD has been reported in the Middle Eastern, European and West Asian regions in past decade (OIE, 2018). Currently, disease is endemic in most of the Africa, parts of Middle East and Turkey and by 2015, disease was entered to most of the Balkan countries, the Caucasus and the Russian Federation making risk of an imminent incursion into other unaffected countries very high. By 2019, periodic outbreak of LSD have been reported by most of the member countries of South and East Asia (OIE, 2020a). First case of LSD have been reported in Nepal by July, 2020 (OIE, 2020b) whereas in India (Nepal's closest border) reported in November 2019 (OIE, 2019). Nepal's borders are however, extremely porous, disease surveillance and monitoring are very weak and quarantine facilities are poor: the risk of disease incursion from neighboring countries is correspondingly high.

Livestock farming is an important sub-sector of Nepalese agriculture and cattle holds second highest percentage of livestock population of Nepal (Poudel et al., 2020). It was estimated that national livestock population was 7.37 million cattle, 5.27 million buffalo, 0.8 million sheep, 11.64 million goat and 1.43 million swine in which cattle, buffalo, goat and swine population increased by 2.8%, 12.76%, 37.42% and 37.5% respectively whereas sheep population decreased by 0.27% within decade (MoALD, 2020; Poudel et al., 2020). Around one third of cattle, buffalo, goats, and sheep are in the Terai region whereas over half are in hilly region. In temperate, sub-alpine and alpine regions; transhumant ruminant production is practiced, however extensive ruminant production prevails at lower altitudes of the mid-hills (900 - 1000 m) utilizing the available forage in and around the villages. Semi-intensive ruminant production is found mainly in the low to mid-hills (400 - 900 m) and in peri-urban areas of Nepal (Brief, 2005). Cattle accounts for milk production only, while buffalo accounts for both meat and milk production. Buffalo holds 53.49 % of total meat productivity and 63.95 % of total milk productivity while, cattle holds 36.05 % of total milk production only (Poudel et al., 2020). Cattle farming represents socio-economic and cultural importance to multiple ethnic groups and there are religious taboos and restrictions on slaughtering and consumption of cattle in Nepal.

Rapid growth in animal numbers in the last two decades contributed a significant proportion to output growth, while productivity levels have not significantly increased and to date are below developing countries' average (Brief, 2005). Animal source foods (ASF) provide nutrients which consists of high-quality protein and different types of micronutrients, such as vitamin A, riboflavin, calcium, iron, zinc, and vitamin B-12, which cannot be obtained in adequate quantities from plant sources essential to child growth and development, pregnant and lactating women who have increased nutrition requirement for fetal development and reduced mortalities among young infants, sick and ill people for speedy recovery. Yet, ASF remains infrequently consumed in rural Nepal, and household livestock ownership is directly related to consumption of livestock products including dairy products, and meat (Broaddus-Shea et al., 2020).

Various factors including inadequately trained staff, weak surveillance, poor biosecurity, poor hygiene in quarantine and porous border favors the entrance of various transboundary diseases like FMD (Foot and Mouth Disease), RVF (Rift Valley Fever), CBPP (Contagious Bovine Pleuro Pneumonia), BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy), LSD in Nepal through live animals. Harm from LSD has threatened Nepalese smallholder cattle farmer since outbreak began and damage includes economic (loss of output, income and investment) as well as psychological (shock and panic). Presence of disease in one farm creates threat to adjacent farm and someone distant locals. Furthermore, Nepal have no previous experience in managing them. LSD poses greatest immediate threat to Nepalese cattle farmer. Viral existence in harsh environment and weak arthropods controlling mechanism are further favorable factors for intercountry transmission of LSD. Though there is no physical barrier in India-Nepal national parks and conservation areas the introduction of LSD through sylvan route is almost negligible since virus is highly host specific and under natural conditions, lesions of LSD have not been seen on wildlife (Zeynalova et al., 2016). However, liberal in trade and transboundary of goods and people enhance the threat of LSD.

The Government of Nepal has already banned import of livestock and its products from countries infected with LSD. However, there is still not published information regarding current situation, risk and gap analysis, effect of global climate change regarding abundance and distribution of mechanical vector populations which may have direct role in spread of disease. However, LSD preparedness and

control plans are being formulated in Nepal. Immediate action regarding intensive awareness campaign including biosecurity and prophylactic measure to intense cattle farmer in rural and urban areas and to general public is due essential. Illegal entry of cattle through porous border and movement of animals from lower health status to higher health status potentially spread the disease that needs immediate controlled. LSD could devastate cattle production which results reduced food supply, injure rural economics, lowered incomes, disrupt trade relations and also decrease human welfare throughout the country. There is still no uniform and well accepted approach to control LSD throughout the country although availability of live attenuated vaccine (major prophylactic tool) does not provide each individual with solid protection and still not available in Nepal increases the disease risk and loss. That's why, rapid recognition of the disease is essential for its successful control and eradication at farm level in Nepal.

### Conflict of Interest

The author declares no conflict of interest.

### Data Sharing Statement

Data sharing is not applicable to this article as no new data were created or analyzed in this study.

### Ethical Statement

No ethical approval was required as this is a review article with no original research data.

### References

- Al-Salihi** K a (2014) Lumpy Skin disease : Review of literature. *Mirror Res. Vet. Sci. Anim.* 3, 6–23.
- Allepuz** A, Casal J, Beltrán-Alcrudo D (2019) Spatial analysis of lumpy skin disease in Eurasia—Predicting areas at risk for further spread within the region. *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 813–822. <https://doi.org/10.1111/tbed.13090>
- Brenner** J, Haimovitz M, Oren E, Stram Y, Fridgut O, Bumbarov V, ... & Garazzi S (2006) Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel, June 2006. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 61(3/4), 73.
- Brief**, LS (2005) Livestock sector brief, FAO. <https://doi.org/10.1111/j.1728-4465.2005.00065.x>
- Broaddus-Shea**, ET, Manohar S, Thorne-Lyman AL, Bhandari S, Nonyane BAS, Winch PJ, West KP (2020) Small-scale livestock production in nepal is directly associated with children's increased intakes of eggs and

dairy, but not meat. *Nutrients* 12. <https://doi.org/10.3390/nu12010252>

**Farah** Gumbe AA (2018) Review on lumpy skin disease and its economic impacts in Ethiopia. *J. Dairy, Vet. Anim. Res.* 7, 39–46. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2018.07.00187>

**MoALD** (2020) Nepal Agriculture Statistics 2074/75. Web [https://www.moald.gov.np/publication/Agriculture Statistics](https://www.moald.gov.np/publication/Agriculture%20Statistics) (Accessed 9 May 2020).

**Mulatu** E, Feyisa A (2018) Review: Lumpy Skin Disease. *J. Vet. Sci. Technol.* 09. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000535>

**OIE** (2020a) Lumpy Skin Disease (LSD) - OIE - Asia. Web <https://rr-asia.oie.int/en/projects/lumpy-skin-disease-lsd/> (Accessed 8 August 2020).

**OIE** (2020b) Lumpy skin disease, Nepal. Web [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=35230&newlang=en](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=35230&newlang=en) (Accessed 8 August 2020).

**OIE** (2019) Lumpy skin disease, India. Web [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=32387](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=32387) (Accessed 10 August 2020).

**OIE** (2018) Lumpy skin disease, in: *OIE Terrestrial Manual 2018*. pp. 1158–1171.

**Poudel** U, Dahal U, Upadhyaya N, Chaudhari S, Dhakal S (2020). Livestock and Poultry Production in Nepal and Current Status of Vaccine Development. *Vaccines* 8, 322. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020322>

**Sprygin** A, Pestova Y, Wallace DB, Tuppurainen E, Kononov AV (2019) Transmission of lumpy skin disease virus: A short review. *Virus Res.* 269, 197637. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.05.015>

**Tulman** ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Kutish GF, Rock DL (2001) Genome of Lumpy Skin Disease Virus. *J. Virol.* 75, 7122–7130. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.15.7122-7130.2001>

**Zeynalova** S, Asadov K, Guliyev F, Vatani M, Aliyev V, (2016) Epizootology and molecular diagnosis of lumpy skin disease among livestock in Azerbaijan. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01022>