

Köpeklerde Karaciğer Toksikasyonunun Tanısında Sialik Asit (SA) ve Lipid-Bağlı Sialik Asit (LSA)' in Önemi

Zahid T. AĞAOĞLU¹ Ayşegül BİLDİK² Mehmet TÜTÜNCÜ¹
Ali ERTEKİN² Nusret AKPOLAT³

Özet

Bu çalışmada, köpeklerde Trikloroetilen (A grubu) ve Karbon tetraklorür (B grubu) ile oluşturulan deneysel karaciğer toksikasyonunda sialik asit (SA) ve lipid-bağlı sialik asit (LSA) düzeylerinin önemi irdelenmiştir. Karaciğer hasarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan serum ALT ve ALP düzeylerinin toksikasyon öncesi değerlere göre artışı istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$).

SA ve LSA aktiviteleri toksikasyon öncesi 28.9 ± 0.56 ve 10.70 ± 0.62 mg/dl olarak belirlenmiştir. Toksikasyon sonrası A grubunda 3., 6., 8. ve 10. günlerde sırayla 41.2 ± 3.6 , 21.5 ± 1.3 ; 59.3 ± 3.2 , 23.6 ± 2.7 ; 51.0 ± 1.5 , 22.7 ± 1.9 ve 43.22 ± 2.8 , 20.81 ± 2.1 mg/dl, B grubunda ise 48.18 ± 4.6 , 23.87 ± 2.1 ; 67.6 ± 2.65 , 26.57 ± 2.7 ; 61.85 ± 3.1 , 26.32 ± 0.27 ve 54.72 ± 2.3 , 24.81 ± 1.2 mg/dl olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, SA ve LSA düzeylerinin ALT ve ALP'ye paralel olarak arttığı, SA ve LSA'nın tanıda tek başına yeterli olmayacağı ancak karaciğer enzimleri ile birlikte yorumlandığında önemli bir göstergesi olacağı ve LSA'nın SA'ya göre daha önemli bir belirteç olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Köpek, Karaciğer toksikasyonu, Sialik asit, Lipid-bağlı sialik asit

Summary

Diagnostic Importance of Sialic Acid and Lipid-Bound Sialic Acid in Dog with Liver Toxication

In this study, the importance of sialic acid (SA) and lipid-bound sialic acid (LSA) levels in dogs with Trichloroethylene (A group) and Carbon tetrachloride (B group) induced liver toxication were investigated. Serum ALT and ALP levels which has been frequently used for determining liver damages were found statistically important with respect to before toxication values ($p<0.001$). Before the experiment, SA and LSA values were 28.9 ± 0.56 and 10.70 ± 0.62 mg/dl. Following the toxication, this values in group A, at 3, 6, 8 and 10 th day's were measured as 41.2 ± 3.6 , 21.5 ± 1.3 ; 59.3 ± 3.2 , 23.6 ± 2.7 ; 51.0 ± 1.5 , 22.7 ± 1.9 and 43.22 ± 2.8 , 20.81 ± 2.1 mg/dl, in group B, 48.18 ± 4.6 , 23.87 ± 2.1 ; 67.6 ± 2.65 , 26.57 ± 2.7 ; 61.85 ± 3.1 , 26.32 ± 0.27 and 54.72 ± 2.3 , 24.81 ± 1.2 mg/dl respectively. It was concluded that although SA and LSA levels increased in parallel to ALT and ALP, they do not appear to be enough for diagnosis alone. However, they would be important indicator in diagnosis only when considered with liver enzymes. It was also concluded that LSA would be better indicator than SA.

Key words: Dog, Liver toxication, Sialic acid, Lipid-bound sialic acid

Giriş

Köpeklerde karaciğer dejenerasyonuna neden olan pek çok etiyolojik ajan bulunmaktadır. Toksinler, ilaçlar ve bazı kimyasal maddeler hepatik hasara yol açabilir. Hepatik hasar, hafif dejenerasyon ve lipidozisten hepatik nekrozise kadar değişmektedir (1, 2, 3).

Karaciğer hasarının tesbitinde kullanılan başlıca tanısal yaklaşımlar; fizik muayene, rutin kan ve idrar tetkikleri, karaciğer fonksiyon testleri ve radyografidir (4). Köpeklerde hepatik hasarın tanısında serum Alkalen fosfataz (ALP) ve Alanin aminotransferaz (ALT) en sık kullanılan parametrelerdir (5, 6).

Sialik asit (SA), dokuz karbonlu bir türev monosakkaridi olan nöyraminik asitten türeyen bir bileşiktir. Bugüne kadar beş SA tanımlanmış olup memelilerin çoğunda N-asetil veya N-glikolil türevleri bulunmaktadır (7, 8).

Sialik asitin organizmada glikoprotein, glikolipid, oligosakkarit ve polisakkaritlerin komponentlerine bağlı olarak, az miktarda da serbest halde bulunduğu bildirilmektedir (9, 10).

¹ Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, VAN.

² Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, VAN.

³ Y.Y.Ü. Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, VAN.

Son yıllarda insan ve hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, neoplastik hastalıklar, meme kanserleri, nefrotik sendrom, romatoid artrit, myeloma, lenfatik lösemi, distemper, sığırların kronik hematurisi, kronik tüberküloz, amiloid, karaciğer tümör, nekroz ve sirozu gibi bir çok hastalıklarda serum sialik asit (SA) ve lipid-bağlı sialik asit (LSA) miktarlarının önemli düzeylerde arttığı belirlenmiştir (11-16).

Bir çok araştırıcı (13, 17, 18), bu artış nedeni ile SA ve LSA'nın hastalıkların tanı ve prognozunu belirlemede %90'lık bir sensitivite ile kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, köpeklerin deneysel karaciğer toksikasyonlarında tanı ve prognozunu belirlemede SA ve LSA'nın önemi irdelenmiştir.

Materyal ve Metod

Bu araştırmada, Van yöresinden toplanan her iki cinsten, 7-19 kg canlı ağırlıkta, 2-6 yaş arası toplam 18 adet sağlıklı melez köpek kullanıldı. Köpekler Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı bokslarında barındırıldı.

Köpekler deneme öncesi klinik muayeneden geçirildiler, türüne özgün gıdalarla beslendiler ve önlerinde sürekli içme suyu bulunduruldu.

Deneme öncesi hazırlıkları tamamlanan köpekler, dokuzar köpekten oluşan iki gruba (A ve B grubu) ayrıldı. A grubuna 6 gün süreyle 5 ml/kg dozunda Trikloretilen'in (Merck) mısır yağındaki (1:1) süspansiyonu, B grubundakilere ise 2 gün süreyle 1 mg/kg dozundaki Karbontetraklorür'ün (Merck) zeytin yağındaki (1:1) süspansiyonu ora-gastrik sondayla verilerek toksikasyon oluşturuldu.

Köpekler, toksikasyon öncesi iki gün süreyle, toksikasyon sonrası 3., 6., 8. ve 10. günlerde biyokimyasal değerleri saptamak amacıyla usulüne uygun bir şekilde kan alınarak serumları çıkarıldı.

Kan serumlarındaki enzim (ALT ve ALP) tayinleri ticari spektrofotometrik kitlerle (Randox) belirlendi. SA miktarı Sydow (19) metodu ile LSA miktarları ise Katapodis ve ark. (20) göre tayin edildi.

Deneme sonunda köpeklerden, literatürlerde tanımladığı şekilde (21, 22) alınan karaciğer biyopsilerinin histopatolojik incelemeleri yapıldı.

Bu çalışmada toksikasyon öncesi ve sonrası bulunan değerlerin istatistikî hesapları SAS paket programı (23) kullanılarak yapıldı.

Bulgular

Bu çalışmada bütün köpekler denemenin ikinci günü hastalandılar ve spesifik olmayan intoksikasyon semptomları (anorexia, apati ve abdominal duyarlılık) gösterdiler. Ayrıca, A grubu köpeklerde belirlenen semptomlara ilave olarak hafif sulu defekasyon gözlemlendi.

Toksikasyon öncesi ve sonrası 3., 6., 8. ve 10. günlerde her iki gruba ait (A ve B grubu) ortalama kan serum ALT, ALP, SA ve LSA değerleri Tablo 1' de gösterilmiştir.

Denemenin sonunda yapılan karaciğer biyopsilerinin histopatolojik incelenmesinde, sentral ven çevresinde belirgin staz, hepatositlerde balon dejenerasyon, masif makroveziküler yağlanma, belirgin nekroz ve hepatoretiküler çatının kaybı ile yer yer fibrozis tesbit edildi.

Tablo 1: A ve B grubu köpeklerin toksikasyon öncesi ve sonrası serum ALT, ALP, SA ve LSA düzeyleri.

Biyokimyasal Parametreler	Toksikasyon Öncesi		Toksikasyon Sonrası					
	n	x±Sx	n	Grubu	3. Gün	6. Gün	8. Gün	10. Gün
					x±Sx	x±Sx	x±Sx	x±Sx
ALT (U/L)	18	22.5±6.1	9	A	224±13.2*	358±15*	130±6.3*	88±4.7*
			9	B	298±68*	1635±165*	1474±133*	778±43*
ALP (U/L)	18	75.1±7.9	9	A	263±24*	464±43*	230.7±25*	167±17.4*
			9	B	296.2±41*	524±33*	346±33*	254±27*
SA (mg/dl)	18	28.9±0.56	9	A	41.2±3.6*	59.3±3.2*	51.0±1.5*	43.22±2.8*
			9	B	48.18±4.6*	67.6±2.65*	61.85±3.1*	54.72±2.3*
LSA (mg/dl)	18	10.70±0.62	9	A	21.5±1.3*	23.6±2.7*	22.7±1.9*	20.81±2.1*
			9	B	23.87±2.1*	26.57±2.4*	26.32±0.27*	24.81±1.2*

*p<0.001

A Grubu : Trikloretilen

B Grubu : Karbontetraklorür

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada her iki gruptaki (A ve B) köpeklerde denemenin ikinci gününden itibaren görülen anorexia, apati ve abdominal duyarlılık gibi intoksikasyon semptomlarının Vörös ve ark. (24)'nın araştırma bulguları ile aynı doğrultuda olduğu belirlendi.

Karaciğerde oluşan hücresel dejenerasyon ve yıkım, serum ALT düzeyinde önemli artışlara neden olmaktadır. Bu artışın, hepatositlerde meydana gelen hasarın miktarı ile doğrudan ilgili olduğu bildirilmektedir (6, 25).

Deneme sonrası 3., 6., 8. ve 10. günlerde (A ve B grubu) ALT düzeylerinde meydana gelen yükselmeler analiz edildiğinde (tablo 1), istatistiki olarak önemli bulundu (p<0.001). Her iki grupta ALT aktivitesinin denemenin 6. gününde en yüksek seviyeye çıktığı (358±15 - 1635±165) ve daha sonraki günlerde düşmeye başladığı gözlemlendi. Serum ALT düzeyinde belirlenen bu değişiklikler bir çok araştırmacının (24, 26, 27) bulgularına benzerlik göstermektedir.

Ayrıca Noonan (27), deneysel olarak karbontetraklorür ile köpeklerde oluşturduğu karaciğer toksikasyonunda, yüksek ALT aktivitesinin ancak denemenin 22. gününde normal seviyeye düştüğünü ifade ederek, bu çalışmada denemenin 10. gününde serum ALT düzeyinde belirlenen yüksek seviye bulgularını desteklemektedir. Bununla birlikte B grubunda A grubuna göre belirlenen yüksek ALT aktivitesi, karbontetraklorürün trikloretilenden daha toksik olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Alkalen fosfataz (ALP) karaciğer, böbrek, barsak, kemik ve plesantadan köken alır. Ancak böbrek, barsak ve plesanta ALP düzeylerinin yarı ömrü çok kısa olduğundan, kemik hastalığı bulunmayan veya gelişme dönemini tamamlayan kedi ve köpeklerde ALP düzeylerindeki artışın kaynağı karaciğerdir (5, 6).

Bu çalışmada toksikasyon sonrası elde edilen ALP düzeyleri, toksikasyon öncesi belirlenen değerlere göre istatistik olarak önemli bulunmuştur (p<0.001). Her iki grupta da (A, B) en yüksek ALP düzeyi (464±43 U/L ve 524±33 U/L) denemenin 6. gününde tesbit edilmiş ve takip eden günlerde düşmeye başladığı saptanmıştır. Bazı araştırmacılar (24, 26) karbontetraklorür ile köpeklerde oluşturdukları deneysel karaciğer toksikasyonunda serum ALP düzeyinde önemli artışlar olduğunu bildirmişlerdir.

Center ve ark. (28) köpeklerde yaptıkları bir çalışmada siroz, kronik hepatitis, steroid hepatopati, kolestazis ve hepatik nekrozisde serum ALP düzeylerinin 287-632 U/L olarak saptamışlardır. Bu çalışmada belirlenen ALP düzeyleri ile literatürlerde (24, 26, 28) belirlenen düzeyler arasında bir paralellik olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan analizlerde köpeklerde toksikasyon öncesi serum SA ve LSA düzeyleri ortalaması 28.9±0.56 ve 10.7±0.62 mg/dl olarak belirlenmiştir. Elde edilen SA düzeylerinin bazı araştırmacıların (11,

22. Jones, B.D., Hitt, M.E., Hurst, T. (1985) Hepatic Biopsy. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 15: 39-65.
23. SAS (1995) *Survival Analysis Using the SAS System: A Practical Guide*. SAS Inst. Inc. Cary. NC. USA.
24. Vörös, K., Szaniszló, F., Albert, M. And Binder, K. (1991) Ultrasonographic Features of Liver Damage Produced by Experimental Carbontetrachloride Intoxication in the Dog. *Proceedings of the XVI. World Congress, World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) and VI. National Congress. Vienna, Austria, October. 2. 5:582-583.*
25. Coles, E.H. (1986) *Veterinary Clinical Pathology*. Fourth Ed., W. B. Saunders Comp., London.
26. Krishnomurthy, V., Rao, R., Gaffer, A.A., Rao, D.S.T. (1994) Certain Serum Enzymes in Dogs with Induced Hepatotoxicity. *Indian Vet. J.* 71.9: 935-936.
27. Noonan, N.E. (1981) Variatoin of Plasma Enzymes in the Pony and the Dog After Carbontetrachloride Administration *Am. J. Vet. Res.* 42. 4: 674-677.
28. Center, S.A., Slater, M.R., Manwarren, T. and Prymak, K. (1992) Diagnostic Efficacy of Serum Alkaline Phosphatase and Gamma Glutamyltransferase in Dogs with Histologically Confirmed Hepatobiliary Disease: 270 Cases (1980-1990). *J.A.W.M.A.* 201.8:1258-1264.
29. Engen, R.L. (1971) Serum Sialic Acid Values in Dogs with Canine Distemper. *Am. J. Vet. Res.*, 32. 6: 803-804.
30. Plucinsky, M.C., Riley, W.M., Prorok, J.J., at all. (1986) Total and Lipid Associated Serum Sialic Acid Levels in Cancer Patients with Differet Primary Sites and Degrees of Metastatic Involvement. *Cancer.*, 58: 2680-2685.
31. Lai, E.K., McCay, P.B., Noguchi, T. and Fong, K.L. (1979) In Vivo Spintrapping of Trichloromethylradicals Formed from CCl₄. *Biochem. Pharmacol.* 28: 2231-2235.
32. Payer, J.L., Floyd, R.A., McCay, P.B., Janzen, E.G. and Davis, E.R. (1978) Spintrapping of Trichloromethyl Radical Produced During Enzymatic NADPH Oxydation in the Presence of Carbontetrachloride or Bromotrichloromethane. *Bioc. Biophys. Acta.* 539: 402-409.
33. Payer, J.L., McCay, P.B., Lai, E.K., Janzen, E.G. and Davis, E.R. (1980) Conformation of assignment of the Trichloromethyl Radical Spinadduct Detected by Spintrapping During ¹³C-Carbontetrachloride Metabolism in Vitro and in Vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94: 1154-1160.
34. Recknagel, R.O., Glende, E.A., Hruszkewycz, A.M. and Dryor, W.A. (1977) *Free Radicals in Biology*. Vol. 3, New York Academic Press, 97-132.
35. Vural, N. (1984) *Toksikoloji*. A.Ü. Ecz. Fak. Yay. No:56. Ankara, 283-286.
36. Frank, H., Link, B. (1984) Anaerobic Metabolism of Carbon Tetrachloride and Formation of Catabolically Resistant Phospholipids. *Biochem. Pharmacol.* 33: 1127-1130.
37. Mc Cay, P.B. Lai, E.K., Payer, J.L., Dubose, C.M. and Janzen, E.G. (1984) Oxygen and Carbon Centered Radical Formation During Carbon Tetrachloride Metabolism. *J. Biol. Chem.* 259: 2135-2143.
38. Pohl, L.R., Mico, B.A. (1984) Electrophilic Halogens as potentially Toxic Metabolites of Halogenated Compounds. *Trends in Pharmacological Science.* 5: 61-64.

29) tesbit ettikleri normal SA düzeylerinden daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu farklılığın metottan kaynaklanabileceği sanılmaktadır.

Toksikasyon sonrası her iki grupta (A ve B) belirlenen SA ve LSA düzeyleri toksikasyon öncesi değerlerle karşılaştırıldığında istatistiki olarak önemli bulundu ($p<0.001$).

SA ve LSA düzeylerinde meydana gelen artışların, hepatotoksik bir madde olan trikloretilen ve karbondioksitli hepatositlerde meydana getirdiği hasara bağlı olarak bütünlüğü bozulan hücrelerden kaynaklanabileceğini tahmin etmekteyiz. Bir çok araştırmacı (13, 16, 30) SA'nın hücre membranında glikoprotein ve glikolipidlere bağlı olduğunu, bütünlüğü bozulan hücrelerde sekresyon ve boşaltım mekanizmasında meydana gelen dengesizlik nedeni ile kontrolsüz olarak sialoglikoprotein ve sialoglikolipidlerin salınmasıyla SA ve LSA düzeyinde artışlar meydana geldiğini belirterek araştırma bulgularımızı desteklemektedir. Ayrıca, karbondioksitli ve trikloretilenin karaciğerde metabolize olarak primer radikal olan triklorometil, triklorasetik asit ve trikloretanol'e dönüştüğü (31, 32, 33, 34, 35), bunların da sekonder radikallerin (lipid dienil, lipid oksiradikal, lipid peroksiradikal ve triklorometil peroksil radikal) oluşumu için ilk basamağı teşkil ederek hücrede lipid peroksidasyonuna neden olduğu bildirilmektedir (36, 37, 38). Bu çalışmada lipid-bağlı sialik asit (LSA) düzeyinde meydana gelen artışın da hücrede meydana gelen lipid peroksidasyonundan kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir.

Bu çalışmada belirlenen histopatolojik bulgular (hepatositlerde diffuz sentrolobuler nekroz, masif makroveziküler yağlanma ile hepatoretiküler çatının kaybı), birçok araştırmacının (24, 26) köpeklerde oluşturdukları deneysel karaciğer intoksikasyon sonuçları ile uyum içerisinde.

Sonuç olarak, köpeklerin hepatik hasarında SA ve LSA düzeylerinin ALT ve ALP'ye paralel olarak arttığı tesbit edildi. SA ve LSA'nın bir çok hastalıkta yükselmesi nedeni ile tek başına diagnostik bir belirteç olamayacağı, ancak ALT veya ALP ile birlikte değerlendirildiğinde daha anlamlıdır. LSA, hücredeki lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olması nedeni ile SA'ya göre hücre hasarının değerlendirilmesinde ve prognozun belirlenmesinde daha önemli bir gösterge olabileceği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Dunn J (1992) Assesment of Liver Damage and Dysfunction. In Practice. July, 193-200.
2. Mac Sween RNM, Anthony PR and Scheuer PJ (1987) Pathology of the Liver. Churchill Livingston, New York.
3. Papich MG and Pavis LE (1985) Drugs and the Liver. Vet. Clin. N. Am. 15: 77-95.
4. Ettinger SJ (1992) Textbook of Veterinary Internal Medicine Diseases of the Dog and Cat. 2nd ed. W.B. Saunders. Philadelphia. 1479-1527.
5. Kraft W, Hartmann K, Dereser R (1995) Altersabhängigkeiten Von Laborwerten Bei Hund und Katze. Tierarztl. Prax. 23: 502-508.
6. Turgut, K. (1995) Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis. Özel Baskı. S.Ü. Vet.Fak. Konya. 155-167.
7. Schelenberg, F., Beange, F., Bourdin, J., Baurre, J.M. and Weill, J. (1991) Alcohol Intoxication and Sialic Acid in Erythrocyte Membrane and in Serum Transferrin. Pharmacology and Biochemistry and Behavior. Vol. 39: 443-447.
8. Whitehouse, M.V. and Zilliken, F. (1963) Isolation and Determination of Neuraminic (Sialic) Acids: In Methods of Biochemical Analysis. Ed. Glick, D., Interscience Publishers., New York., London., Sydney., Vol. XIII. 199-200.
9. Gerbaut, L., Rey, E. and Lombart, C. (1973) Improvet Automated Deretmination of Bound N-Acetil Neuraminic Acid in Serum. Clin. Chem., 19, 11: 1285-1287.
10. Tuppy, H. and Gottschalk, A. (1972) The Structure of Sialic Acids and Their Quantitation. Glycoproteins, Their Composition Sturcture and Function, Revised and Expanded. Second Ed., Elsevier., Amsterdam., London, New York.
11. Altıntaş, A., Kurtdede, A., Fidancı, U.R., Borkü, M.K. (1989) Köpek Gençlik Hastalığında (Distemper) Serum Sialik Asit ve Protein Düzeylerinin Klinik Önemi. A.Ü. Vet.Fak. Derg., 36, 1: 154-164.
12. Carter, A. and Martin, N.H. (1962) Serum Sialic Levels in Healthy and Disease. J. Clin. Path., 15: 69-72.
13. Colli, A., Buccino, G., Coccila, M., Parravicini, R., Mariani, F. and Scaltrini, G. (1989) Diagnostic Accuracy of Sialic Acid in the Diagnosis of Malignant Ascites. Cancer., 63: 912-916.
14. Shamberger, R.J. (1984) Serum Sialic Acid in Normals and in Cancer Patients. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22: 647-651.
15. Singh, B., Choudhuri, P.C., Joshi, H.C. (1980) Serum Mucoprotein and Sialic Acid Enzootic Bovine Haematuria. Zentralblatt Fur Veterinarmedizin 27 A. 8: 678-681.
16. Stefenelli, N., Klotz, H., Engel, A. and Bauer, P. (1985) Serun Sialic Acid in Malignant Tumors, Bacterial Infections and Cirrhotic Liver Disease. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 109: 55-59.
17. Dnistrian, A.M., Schewartz, M.K., Katapodis, N., Fracchia, A.A. and Stock, C. (1982) Serum Lipid-bound Sialic Acid as a Marker in Breast Cancer. Cancer., 50: 1815-1819.
18. Erbil, M.K., Jones, J.D. and Klee, G.G. (1985) Use of Serum and Total Sialic Acid as Markers for Colorectal. Cancer., 55. 2: 404-409.
19. Sydow, G. (1980) A Simplified Quick Method For Determination of Sialic Acis in Serum. Biomed. Biochem. Acta. 44, 11/12, 1721-1723.
20. Katapodis, N., Nirshaut, Y., Geller, N.L. and Stock J. J. (1982) Lipid Associated Silic Acid Test for the Detection of Human Cancer. Cancer Res. 42: 5270-5275.
21. Hiitt, M.E., Hanna, P. and Singh, A. (1992) Percutaneous Transabdominal Hepatic Needle Biopsies in Dogs. Am. J. Vet. Res. May 53. 5: 785-787.