

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARVOVİRAL ENTERİTLİ KÖPEKLERDE KLİNİK LABARATUVAR VE
NÜKLEER MANYETİK REZONANS(NMR) BAZLI METABOLOMİK
DEĞERLENDİRMELER**

RUMEYHİSA ÖZLEM BİÇİCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. ABDULLAH BAŞOĞLU

KONYA-2023

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PARVOVİRAL ENTERİTLİ KÖPEKLERDE KLİNİK LABARATUVAR VE
NÜKLEER MANYETİK REZONANS(NMR) BAZLI METABOLOMİK
DEĞERLENDİRMELER**

RUMEYHİSA ÖZLEM BİÇİCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. ABDULLAH BAŞOĞLU

KONYA-2023

ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

(Adayın Adı Soyadı) tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından
..... Anabilim Dalında Yüksek Lisans / Doktora Tezi olarak oy
birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Ünvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza
Danışman:	Ünvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza
Üye:	Ünvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza
Üye:	Ünvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza
Üye:	Ünvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Unvanı Adı SOYADI

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışmada parvo viral (canine parvoviral, CPV) enfeksiyonlu köpeklerde NMR-bazlı metabolomikler hastaların hayatta kalma öngörüsü için ilk defa değerlendirildi.

Bu çalışmanın amacı, CPV hastalığı hakkında metabolomik düzeyde bir anlayış elde etmek ve hastalıklı köpeklerde sağkalım öngörüsünü metabolomikler üzerinden değerlendirmektir. Akut CPV enfeksiyonunda sonuç öngörüsünde fizyopatolojik değişiklikleri hedefleyen bir dizi biyobelirtecini değerlendirilmesi, herhangi bir spesifik biyobelirtece göre daha faydalı olacaktır. Bu biyobelirteçler dizisi, farklı patojenlerle enfekte olmuş hastaları ayırt etmek, bu enfeksiyonlara karşı aşı kaynaklı korunmayı öngörmek ve bağışıklık hakkında fikir vermek için kullanılabilir. Küçük molekül ağırlıklı metabolitler (<1500 dalton) dizisi olan metabolomikler, NMR spektrometresi ile Avrupa Birliği destekli olarak İtalya'nın Floransa Üniversitesi NMR merkezi (CERM)'de ölçüldü.

Hastalığı doğrulamak için hızlı fekal CPV antijen ve Polymerase chain reaction (PCR) testleri uygulandı. Hastalara rutin tedaviler uygulanırken hematolojik ve biyokimyasal profillerle birlikte kardiyak troponinin seviyeleri de belirlendi. Hastalardan tedavi sonrası iyileşenler (30) ve ölenler (10) de oldu. Laboratuvar analizlerden literatür verileriyle uyumlu ve çelişen bulgular elde ederken bu çalışmayla ilk defa analiz edilen NMR bazlı metabolomiklerin CPV enfeksiyonu için yaşayabilirlik öngörüsünde faydalı olabileceği gösterilmiştir.

Sunulan bu çalışma Avrupa Birliği Horizon 20 (Propasal ID: 18103) kapsamında desteklenmiştir.

Araştırmanın planlamasından yazım sürecine kadar görüş ve katkılarını esirgemeyen, meslek hayatım süresince kullanacağım çok değerli bilgi ve tecrübelerini bana aktaran danışman hocam Prof. Dr. Abdullah BAŞOĞLU'na başta olmak üzere, yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda kapılarını çalabildiğim yardımını ve bilgisini esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Mahmut OK'a, Prof. Dr. Mutlu SEVİNÇ'e, Prof. Dr. Mehmet MADEN'e, Prof. Dr. Hasan GÜZELBEKTEŞ'e, Doç. Dr. Amir NASERİ'ye ve Doç. Dr. Merve İDER'e, klinikte mesai arkadaşım olan ve tez çalışmamda bana yardımcı olan Vet. Hek. Dr. Murat Kaan DURGUT'a, Arş. Gör. Süleyman Serhat

İYİĞÜN ve değerli doktora ve yüksek lisans öğrencilerine ve Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI ve doktora öğrencisi Ayşegül BULUT'a ve bu süreçte her türlü desteği ile yanımda olan kardeşim Vet. Hek. Esra BİÇİCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.



İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ÖZET.....	ix
SUMMARY	x
1.GİRİŞ.....	1
2. KANIN PARVOVİRUS (CPV).....	3
2.1. Patofizyoloji	3
2.2. Klinik bulgular.....	4
2.3. Tam Kan Sayımı.....	5
2.4. Diagnostik Testler.....	5
2.5. Tanısal Görüntüleme.....	7
2.6. Endokrin ve Diğer Biyomarkırlar.....	7
2.7. Tedavi.....	8
2.7.1. Vasküler Ulaşım ve Sıvı Tedavisi	8
2.7.2. Antiemetikler.....	9
2.7.3. Antimikrobiyal Kullanım.....	10
2.7.4. Enteral Besleme.....	10
2.7.5. Gözlem.....	11
2.7.6. Antiviral stratejiler.....	11
2.7.7. Onkotik destek.....	11
2.7.8. İmmun Plasma	12
2.8. Prognoz	13
3. METABOLOMİKLER.....	14
3.1. Metabolomik ve Viral Enfeksiyonlar.....	15
3.2. Viral Enfeksiyonlar – Biyobelirteçler	16
4. GEREÇ VE YÖNTEM	17
4.1. Hasta Seçimi ve Gruplar	17
4.2. CPV Enfeksiyonunun Tanısı	18
4.2.1. Hızlı CPV Antijen Test Kiti	18
4.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	18
4.3. Kan Örneği Toplama, Hematolojik ve Biyokimyasal Analizler	18
4.4. Kardiyak Troponin I (cTnI) Değerleri	19
4.5. Statistikselsel Analizler	19

4.6. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) Bazlı Metabolomiklerin Ölçümü ve Değerlendirilmesi	19
4.6.1. H-NMR Spektroskopi İçin Ekstrakt Hazırlanması:	19
4.6.2. Serum Ekstraktlarında Kalitatif ve Kantitatif H-NMR Spektroskopisi:	20
4.6.3. NMR spektra proses.....	21
4.6.4. İstatistiksel analiz	22
5. BULGULAR.....	23
5.1. Klinik Bulgular	23
5.2. Klinik Skor	23
5.3. Hematolojik Bulgular.....	24
5.4. Biyokimyasal Bulgular	26
5.4.1. İstatistiksel Analiz:	29
5.5. ELISA cTnI bulguları	29
5.5.1. İstatistiksel Analizler	29
5.6. PCR Bulguları	30
5.7. NMR Bulguları.....	31
5.7.1 Su Bazlı Ekstraktlar	31
5.7.2. Lipid Bazlı Ekstraktlar	32
5.8. Patolojik Bulgular	40
6. TARTIŞMA.....	44
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
8. KAYNAKLAR	57
9. EKLER	49
9.1.Ek A Etik Kurul Kararı	57
9.2 Ek-B Turnitin Raporu	58
10. ÖZGEÇMİŞ.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür
≤	Küçük eşittir
≥	Büyük eşittir
°C	Santigrat derece
μL	Mikrolitre
12(13)DiHOME	12,13 dihydroxy-9Z-octadecenoic acid
1H NOESY	Nükleer Overhauser Etkisi Spektroskopisi
1H-NMR	1Hidrojen-Nükleer Manyetik Rezonans
9-HpODE	9-hydroxyoctadecadienoic acid
A	Adenin
ABCA1	ATP bağlama kaseti alt ailesi A üyesi 1
ALP	Alkalen Fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
ANOVA	Varyans Analizi
Apo A1	Apolipoprotein A
AST	Aspartat Aminotransferaz
ATM	Otomatik ayarlama ve eşleştirme ünitesi
AUC	Eğri altında kalan alan
BE	Baz açıklığı
BNP	B-tipi natriüretik peptid
Bp	Bölgenin boyu
BUN	Blood urea nitrogen
C	Sitozin
Ca	Kalsiyum
CERM	The Centro Risonanze Magnetiche
CK-MB	Kreatin kinaz miyokard bandı
Cl	Klor
COVID-19	Corona virüs disease-19
CPV	Canin Parvoviral
CPV-2	Canin Parvoviral 2. Suşu
CPV-2a	Canin Parvoviral 2a alt suşu
CPV-2b	Canin Parvoviral 2b alt suşu
CPV-2c	Canin Parvoviral 2c alt suşu
cTnl	Kardiyak troponinler
D2O	Ağır su
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FP	Hatalı pozitif
g/dL	Gram/desilitre
G	Guanin
G-CSF	Granülosit koloni stimüle edici faktör
GGT	Gama glutamil transferaz
Gr	Gram
H2O	Su
Hb	Hemoglobin

HCO ₃	Bikarbonat
HIV-1	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü-1 suşu
HIV-2	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü-2 suşu
HMGCR	Hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktaz
Hz	Hertz
IFABP-2	yağ asidi bağlayıcı protein-2
IU/kg/gün	İnternasyonel unite/kilogram/gün
IV	İntravenöz tedavi
K	Potasyum
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum monohidrojen fosfat
K ₃ -Edta	K ₃ -Etilendiamintetraasetik asit
Kcal/gün	Kilokalori/gün
LDH	Laktat dehidrogenaz
M	Molarite
MCHC	Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu
MCV	Ortalama hücresel hacim
MHz	Megahertz
mL/dL	Mililitre/desilitre
mL/kg	Mililitre/kilogram
mL	Mililitre
Mm	Milimetre
mM	Milimolarite
MPV	Ortalama trombosit hacmi
Na	Sodyum
NAN ₃	Sodyum nitrat
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
O ₂	Oksijen
PBS	Phosphate-buffered saline
PCO ₂	Parsiyel carbondioksit basıncı
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PCT	Prokalsitonin değeri
PCV	Sıkıştırılmış eritrosit hacmi
PDW	Trombosit Dağılım Genişliği
pH	Hidrojen potansiyeli
PLT	Trombosit
PO ₂	Parsiyel oksijen basıncı
PPV	Pozitif prediktif değer
RBC	Kırmızı kan hücreleri
RDW	Kırmızı hücre dağıtım genişliği
REE	İstirahat enerji harcaması
ROC	Alıcı çalışma karakteristik eğrisi
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
SARS CoV-2	Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirus-2
SC	Supkutan enjeksiyon
SMS2	Sfingomyelin sentaz2
spp	Species pulural
SPSS	Sosyal Bilimler İçin İstatistik Paketi
SR-B1	Çöpçü reseptörü B sınıfı üye 1
T	Timin
TCA	Trikarboksilik asit döngüsü

TP
WBC

Gerçek pozitif
Beyaz kan hücreleri



ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Parvoviral Enteritli Köpeklerde Klinik Laboratuvar ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Bazlı Metabolomik Değerlendirmeler

Rumeyhisa Özlem BİÇİCİ

Veterinerlik İç Hastalıkları Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2023

Bu çalışmada bütün dünyada yaygın olan parvoviral enteritli köpeklerin yaşayabilirlik öngörüsünde ilk defa NMR bazlı metabolomik ölçümler değerlendirilmiştir. Bunun için 10 sağlıklı, 30 hasta, 10 ölen köpek kullanıldı. Hastalığın tanısında fekal hızlı antijen testi ile doğrulanmasında da PCR testi yapıldı. Hasta skorlaması ile birlikte hematolojik (kan gazları ve tam kan) ve kardiyak troponini de kapsayan biyokimyasal analizler yapıldı. Hastaların sağtımında Ölen hastalar patolojik olarak da incelenmiştir. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) bazlı metabolomik ölçümler Avrupa Birliği destekli Araştırma Alt Yapıları kapsamında İtalya'nın Floransa Üniversitesi NMR merkezinde ölçülmüş ve istatistik analizleri yapılmıştır.

Hastalarda klinik tablo, hematolojik ve biyokimyasal analizler ile ELISA bazlı kardiyak troponin bulguları literatür verileriyle büyük oranda benzerlikler ve küçük farklılıklar göstermiştir. Bu da çalışmada kullanılan köpeklerin ırk, yaş ve cinsiyet bakımından bir örneklik olmayışına atfedilebilir. İV sıvı ile birlikte bağırsak etkili geniş spektrumlu antibiyotik, antiemetik, antasit, antianflamatuvar, antioksidan ilaçlardan oluşan destekleyici tedaviyi takiben 30 hasta iyileşti ve 10 hasta 24-48 saat içinde öldü. Patolojik bakılarda hakim tablo, çoklu organ yetmezliği idi.

NMR bazlı suda eriyen metabolitlerden sağlıklı gruba göre diğer gruplarda düşük olanlar (fruktoz, glikoz, sitrat, gliserat, karnitin, gliserin, format, laktat, kreatinin) ve yüksek olanlar (tirozin, fenilalanin, izolösin, izovalerat, glikolat, kolat) vardı. Yağda eriyen metabolitlerden de aynı şekilde yüksek olanlar (total kolesterol çeşitleri, yağ asidi çeşitleri, serbest kolesterol ve sfingomiyelin) ve düşük olanlar (fosfogliserid ve doymuş kolesterol) vardı. Bütün bunlardan enerji açığı, yağ mobilizasyonu, glikoneogenesis ve TCA siklusu eksikliği, karaciğer başta olmak üzere çoklu organ yetmezliği geliştiği anlaşılmaktadır. Hastalıkta yaşayabilirlik öngörüsünde bu suda ve yağda eriyen metabolitler faydalı olabilecektir.

Köpek parvoviral enteritisi gibi kritik hastalıklarda patojenik mekanizmaların daha iyi anlaşılmasında ve prognostik değerlendirmede NMR bazlı metabolomiklerin ölçülmesi, klasik hematolojik ve biyokimyasal analizlere göre çok daha faydalı bir metot olarak karşımıza çıkmaktadır.

Anahtar sözcükler: Köpek; metabolomik; parvoviral enteritis

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY.

SELÇUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Clinical Laboratory and Nükleer Magnetic Rezonance (NMR) Based Metabolomic Evaluation in Dogs with Parvoviral Enteritis

Rumeyhisa Özlem BİÇİCİ

Department of Veterinary Internal Medicine

MASTER THESIS / KONYA- 2023

In this study, NMR-based metabolomic measurements were evaluated for the first time in predicting the viability of dogs with parvoviral enteritis, which is common all over the world. For this, 10 healthy, 30 sick and 10 dead dogs were used. PCR test was also performed to confirm the diagnosis with fecal rapid antigen test. Along with patient scoring, hematological (blood gases and whole blood) and biochemical analyzes including cardiac troponin were performed. The patients who died during the recovery of the patients were also examined pathologically. NMR (Nuclear Magnetic Resonance) based metabolomics were measured and statistical analyzes were made at the NMR center of Florence University, Italy, within the scope of European Union supported Research Infrastructures.

The clinical picture, hematological and biochemical analyzes and ELISA-based cardiac troponin findings in the patients showed great similarities and minor differences with the literature data. This can be attributed to the lack of uniformity in terms of breed, age and gender of the dogs used in the study. 30 patients recovered and 10 patients died within 24-48 hours following supportive treatment consisting of intestinal-acting broad-spectrum antibiotics, antiemetics, antacids, anti-inflammatory and antioxidant drugs together with IV fluid. The predominant picture in pathological examinations was multiple organ failure.

Among the NMR-based water-soluble metabolites, the other groups had lower (fructose, glucose, citrate, glycerate, carnitine, glycerine, formate, lactate, creatinine) and higher (tyrosine, phenylalanine, isoleucine, isovalerate, glycolate, cholate) compared to the healthy group. Fat-soluble metabolites were likewise high (total cholesterol variants, fatty acid variants, free cholesterol, and sphingomyelin) and lower (phosphoglycerides and saturated cholesterol). From all these, it is understood that energy deficit, fat mobilization, gluconeogenesis and TCA cycle deficiency, and multiple organ failure, especially the liver, develop. These water- and fat-soluble metabolites may be useful in predicting viability in the disease.

Measuring NMR-based metabolomics is a much more useful method than classical hematological and biochemical analyzes in better understanding of pathogenic mechanisms and prognostic evaluation in critical diseases such as canine parvoviral enteritis.

Key Words: Dog; Parvo viral enteritis; Metabolomic

1.GİRİŞ

Köpeklerde parvoviral enteritis, bütün dünyada köpeklerin en virulent ve yaygın bağırsak hastalıklarından biri olmaya devam ederken agresif tedaviye rağmen yavru köpeklerde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Köpek parvovirüsü (CPV)-2 suşlarına karşı aşılamanın geliştirilmesine ve uygulanmasına rağmen, hastalık hala veteriner hekimlik ve ekonomik açıdan önemini korumaktadır. CPV-2 çok yüksek morbidite oranı (%100) ve mortalite oranı (yavrularda %91, yetişkinlerde %10) ile köpeklerin başlıca patojenik enterik viruslarından biridir. CPV akut, bulaşıcı viral bir hastalık olup çoğunlukla 6-20 aylık köpekleri etkilemektedir. Altı aydan küçük aşısız köpek yavrularının enfekte olma ve hastalanma riskleri yüksektir. Genç köpeklerde morbidite ve hemorajik enterit, lökopeni, sepsis ve kardiyovasküler bozulmaya neden olmaktadır. CPV bakteriyel translokasyonu ve şiddetli immunosupresyonu artırdığı için yüksek prevalans ve mortalite oranı ile seyreden şiddetli bir durum olan sepsisi predispoze eder. Köpek sahiplerinin bilinçlenme ve rutin aşılama uygulamalarındaki artışa rağmen CPV'un çoklu variantları yüzünden CPV'ye bağlı morbidite ve mortalite hala kalıcıdır.

CPV'nin olası teşhisini için tek başına fiziksel muayene ve klinik belirtilerin tanısallığı doğruluğu sadece %58'dir. Hastalığın kesin tanısı ELISA, PCR, elektron mikroskobu, hemaglutinasyon ve virüs izolasyonunu içeren çeşitli tespit yöntemleri kullanılarak dışkıda veya orofaringeal swaplardan virüs partiküllerinin belirlenmesine bağlıdır (Mazzaferro, 2020).

CPV'un prognozu değişken olup birkaç faktöre bağlıdır. Yaş, ırk, aşılama geçmişi, eşzamanlı hastalık, medikal müdahalede zamanlama, sağlanan medikal bakım seviyesi prognoz üzerine etkili olabilir. Hospitalizasyonun ilk 24 saati sırasında çeşitli lökosit parametrelerindeki tepkiler hayatta kalma ile ilgili olmaktadır. CPV ile enfekte köpek yavrularında tedavinin başlamasından 72 saat sonra kanda total lökosit sayısı ve nötrofil sayısı ile serumda CK-MB, bağırsak yağ asidi bağlayıcı protein-2, seruloplazmin, albumin ve kortizol konsantrasyonları hastalık sonucunu öngörülebilir prognostik olarak kullanılabilir (Eregowda ve ark 2021).

Günümüzde hastalığın tedavisi, hidrasyonu yenilemek için sıvı verilmesini, erken beslenme desteğini, antiemetikleri, geniş spektrumlu antibiyotikleri ve ampirik antiparaziterleri kapsamaktadır. Hospitalizasyon tedavisi, altın standart olarak kalsa da

evde tedavi protokollerinin hayatta kalma başarı oranının %80'den fazla olduğu belirtilmiştir. Tedavi edilmeyen CPV vakalarının mortalite oranı %90'a yaklaşırken agresif destekleyici bakımla birlikte hospitalizasyonda bu oran %10'a düşmektedir. CPV enfeksiyonunu takiben hastanın hayatta kalabilmesi, yeterli antikor üretimi ve bunu takiben lenfoid ve intestinal kript hücrelerinin iyileşmesine bağlıdır.

Virüsler, konakçı hücreye aşırı bağımlılıkları ile mikroorganizmalar arasında farklıdır. Açıkçası, son birkaç yılda büyük ilerleme kaydedildiyse de viral enfeksiyonlar en zor ve zahmetli problemler arasındadır. Tıbbi virolojinin birçok yönü artık anlaşılacakla birlikte diğerleri yavaş yavaş açıklığa kavuşturulmakta olup daha pek çoğu hala belirsizdir. Virüslerin özellikleri hakkında bilgi ve konakçıları ile kurdukları etkileşimler, patolojik süreçlerin klinik yönetimi için hala kritiktir. Şimdiye kadar metabolomik tekniğin, viral hastalıkları araştırmak için uygun bir seçenek olduğu kabul edilir (Noto ve ark 2014). Son yıllarda Covid 19 için de metabolomik birçok çalışma yapılmıştır.

Bu çalışma, parvoviral enteritisli köpeklerin hayatta kalma öngörüsünün NMRbazlı metabolomiklerle değerlendirildiği ilk çalışmadır. Çalışma, Avrupa Birliği Instruct-ERIC pan European Research Infrastructure kapsamında kabul edilmiştir. Çalışmada yer alan metabolomikler, Floransa Üniversitesi CERM (The Centro Risonanze Magnetiche, NMR merkezi)'de (İtalya) ölçüldü.

2. KANİN PARVOVİRUS (CPV)

Kanin parvoviral enteritis duyarlı köpeklerde yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden enteropatojenik bir hastalıktır. Hastalığa Kanin parvovirus'un üç farklı alt suşu (CPV-2a, 2b ve 2c) neden olmaktadır. Enfeksiyon daha çok enfekte hayvanlarındışkılarıyla kontamine olan gıdaların sağlıklı ve duyarlı hayvanlar tarafından ağız yoluyla alınması sonucu şekillenmektedir. Hastalık 6 aylıktan küçük olan yavru köpeklerde yüksek morbidite ve mortalite ile seyredebilmektedir. Ayrıca immun sistemi çeşitli nedenlerde baskılanmış olan erişkin köpeklerde enfeksiyon ortaya çıkabilmektedir. Hastalığın tedavisinde sıvı sağaltımı, antibiyotik uygulamaları gibi semptomatik tedavilerin yanı sıra immun sistemin güçlendirilmesi için çeşitli ilaçlar veya bağışıklığı tetikleyen preparatlar kullanılmaktadır. Tedavinin yanında korunma açısından hijyen kurallarına uyulması, sağlıklı hayvanların hasta hayvanlardan izole edilmesi, aşılama prosedürlerine uyulması hastalığın önlenmesinde ve yayılımının azaltmasında son derece önemlidir (Aydın ve Kırbaş, 2021).

Enterovirüslerde (canine parvovirus, canine coronavirus, canine astrovirus ve canine calicivirus) gözlenen sık mutasyonların neden olduğu aşı başarısızlığını önlemek adı geçen enterik virüslerin moleküler analizleri esastır. Canine coronavirus ve canine astrovirus gibi diğer enterik virüslerin, aynı hayvanda koenfektan olarak bulunabildikleri, hastalığın şiddetini artırabildikleri ve bazı durumlarda insanlar için zoonotik bir risk oluşturabildikleri göz ardı edilmemelidir (Zobba ve ark 2021). Dahavirüsent CPV suşu (tip-2), 40 yıldır genetik değişiklikler geçirmiş ve sonraki gelişmelerle birlikte antijenik olarak farklı alt tipleri (CPV-2a, CPV-2b ve CPV-2c) ortaya çıkmıştır (Polat ve ark 2019).

2.1. Patofizyoloji

CPV-2 suşları, enfeksiyona yönelik stratejilerinde son derece güçlüdür; evcil köpekler (rakun, kedi, çakal, kurtlar) dışındaki memeli konakçıları da enfekte edebilir, çevrede her yerde bulunurlar ve uygun şartlarda 1 yıldan fazla yaşayabilirler (Sykes, 2014; Mylonakis ve ark 2016). Oronazal maruziyet ve enfeksiyon, hassas veya zayıf aşılanmış köpeklerde, enfekte hayvanların kusmuşu veya dışkılarıyla dökülen CPV-2'nin yutulması yoluyla meydana gelir. Sonra virüs ilk olarak orofaringeal ve mezenterik

lenf düğümlerinde ve timusta çoğalır, enfekte hayvanlar maruz kaldıktan sonra 1 ila 5 gün içinde viremik hale gelir (Goddard ve Leisewitz, 2010). Daha sonra, CPV-2, bağırsak epitel kriptlerinin hızla bölünen hücrelerini, kemik iliğini, dil epitelini, ağız boşluğunu ve kardiyak miyositlere ek olarak akciğer, dalak, karaciğer ve böbrekleri hedefler (Ford ve ark 2017). Köpeklerin yaygın olarak aşılmasından önce CPV-2, miyokardit, enfekte hayvanlarda yaygın bir ölüm nedeniydi ve hala bugün nadiren meydana gelmektedir (Sime ve ark. 2015; Strom ve ark 2015 Ford ve ark 2017). Maruziyetin ve değişebilen bir kuluçka dönemin (4 ila 14 gün arasında) ardından virüs saçılması, genellikle klinik kusma belirtilerinin başlamasından birkaç gün içinde hemorajik diyareden önce oluşur (Smith-Carr ve ark 1997; Decaro ve ark 2005; McCaw ve Hoskins, 2006). Bağırsak mukozası enterosit döngüsü bozulduğu için soyulur, bu da bağırsak villuslarının körelmesine neden olur, ek olarak kusma ve hemorajik ishalin klinik belirtilerine neden olan besin malabsorpsiyonu ve enterik bakteriyel translokasyon gelişir. Timusta viral enfeksiyon timik korteksin yıkımına ve çökmesine neden olur. Kemik iliğinde lökosit prokürsörlerinin yıkımı ile birlikte, enfekte hayvanlarda önemli lökopeni ile sonuçlanır (Decaro ve Buonavoglia, 2012). Bağırsak bakterilerinin translokasyondan kaynaklanan bakteriyemi ile birlikte bağışıklık eksikliği, etkilenen hayvanları yüksek septik şok geliştirme, sistemik enflamatuvar yanıt sendromu, çoklu organ yetmezliği ve tedavi edilmezse ölüm riski altına sokar. Nadir bulgular olarak yavru köpeklerde çok şekilli eritema (Woldemskel vd. 2011), lökoensefalopati (Schaudien, 2010) ve periventriküler ensefalitle birlikte poreensefali (Marenzoni ve ark 2019), ayrıca CPV-2 ile enfekte kedilerde (Decaro ve ark 2011; Miranda ve ark 2014) klinik hastalık ve intrakraniyal apseler belirtilmiştir.

2.2. Klinik bulgular

Dışkı testine ek olarak, fiziksel muayene bulguları, hasta eşkali, klinisyenin şüphe indeksi ve diğer teşhis testleri destekleyici olabilir, ancak CPV enfeksiyonu için patognomonik değildir. Parvoviral enteritisin en yaygın klinik belirtileri letarji, iştahsızlık, kusma ve ishaldir. İshalin görünümü yumuşaktan mukoide, sulu ve hemorajiğe kadar değişebilir. Bağırsak mukozal yüzeyin sıyrıntısı dışkıya kırmızı jelatinimsi bir görünüm verebilir. Gastrointestinal sıvı kayıpları ile birlikte, hızlı bir şekilde hipovolemik şoka ilerleyen interstisyel dehidrasyon meydana gelebilir. Enterosit besin absorpsiyonu eksikliği, sistemik bakteriyemi ve hepatik ve kas glikojen depoları eksikliği ile birlikte önemli hipoglisemi ile sonuçlanabilir ve nöroglükopeni

ve nöbetler de meydana gelebilir. Ayrıca sistemik inflamasyon ve bakteriyemi, hipotansiyon ve organ yetmezliği ile septik şoka neden olabilir. Klinik belirtilerin şiddeti yaşa, koruyucu antikor titresine ve süresine göre değişebilir. Klinik belirtiler ve fiziksel muayenenin tanısal doğruluğu, parvovirüs şüpheli tanısı koymak için tek başına sadece %58'dir. Şüphe indeksi her bir hastanın yaşına ve aşılanma durumuna göre artabilir. Fiziksel muayene ile mukozal solukluk, gecikmiş kapiller dolum zamanı, ateş veya hiotermi ve abdominal rahatsızlık belirlenebilir. İnce bağırsak invaginasyonu meydana gelebilir ve bu da ağrılı, sert, tübüler bir yumuşak doku kitlesi oluşturabilir ve karın palpasyonunda tespit edilebilir (Rallis vd. 2000; Faz vd. 2019). Klinik belirtilerin varlığı ve şiddeti ile hastanede gerekli olan sürenin uzunluğu öngörülebilir (Kalli ve ark 2010).

2.3. Tam Kan Sayımı

Virüs saldırıları kemik iliği, timus ve diğer lenfoid dokuların aktif olarak çoğalan hücrelerini replike ederek CPV'li hastalarda total lökosit sayısı ve lökonötropeni varlığı bir özellik olarak kabul edilir. Lenfopeni, etkilenen yavruların yanı sıra CPV'li köpeklerle birlikte koronavirüs ile enfekte yavrularda ortaya çıkabilir (Castro ve ark 2013). Bu nedenle, etkilenen hastalarda CPV teşhisini daha fazla desteklemek için diğer testlerle birlikte kullanılır. Hastalık sırasında sitopeni varlığı, CPV'de sonucunu öngöründe yararlı olabilir. Bir çalışmada CVP'li ölen ve sağ kalanlar arasında nötropeni farkı olmadığı belirlendi. Aynı çalışmada, hasta kabulü ve 48 saatlik hastanede yatışta total lökosit sayısının 4500/mL'den yüksek oluşu ve başvuru sırasında ve sonrasında lenfosit sayısının 1000/mL'den büyük oluşu ile sağkalımın güçlü bir şekilde ilişkili olduğu öngörülmüştür (Goddard ve ark 2008).

2.4. Diagnostik Testler

CPV-2 ile enfeksiyondan sonraki 3 gün içinde, hayvanlar virüsü dışkılarıyla yayabilir (Johnson ve Smith, 1983), enfeksiyondan 4 ila 7 gün sonra ise en yüksek saçılma meydana gelir (Pollack ve Carmichael, 1982). Viral bulaşmanın ve enfeksiyonun doğru tespiti, hastaneler, barınaklar ve üreme kulübelerinde bulaşıcı hayvanları izole ederek hastalığın yayılmasını azaltmaya yardımcı olmak için çok önemlidir, çünkü fekal enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) metodu ile pozitif ve negatif hayvanlarda klinik bulgular benzerdir (Decaro ve Buonavoglia 2012; Proksch ve ark 2015). CPV-2 enfeksiyonunu tespit etme metodolojisi bu nedenle

yaygın olarak erişilebilir ve doğru olmalıdır. Antemortem, CPV-2 dışkıda, orofaringeal sürüntüde veya tüm kanda saptanabilir (Meunier vd. 1985; Smith-Carr ve ark 1997; Decaro ve ark 2005). Kesin tanı, dışkıda veya orofaringeal sürüntülerde ELISA dahil çeşitli tespit yöntemleri (polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), elektron mikroskobu, hemagglütinasyon ve virüs izolasyonu gibi) virüs partiküllerinin belirlenmesine bağlıdır (Maarkovich ve ark 2012; Decaro ve ark 2013). Bu sıralar, virüs tespiti için DNA tabanlı PCR, en hassas ve spesifik olan ancak klinik ortamda hemen mevcut olmayan yöntemler olarak düşünülmektedir (Decaro ve ark 2013). Elektron mikroskobu, hemagglütinasyon ve virüs izolasyonu gibi diğer yöntemler yalnızca sınırlı olarak özel laboratuvarlarda mevcuttur ve daha kolay bulunabilen ELISA veya PCR yöntemleri kadar hassas değildir (Decaro ve ark 2013).

PCR-pozitif CPV-2a, CPV-2b ve CPV-2c'yi karşılaştıran bir çalışmada yaygın olarak kullanılan ELISA'nın virüsü CPV 2a, CPV-2b ve CPV-2c için sırasıyla %80,4, %78,0, %77,0 oranında saptadığı gösterildi (Decaro, vd. 2010). ELISA'nın duyarlılığı ve özgüllüğü PCR ile karşılaştırdı bir duyarlılık %81,8 bulundu (Maarkovich ve ark 2012). Hem CPV-2b hem de CPV-2c'nin saptanma hassasiyeti istatistiksel olarak farklı değildi, bu da PCR'ye ek olarak ELISA'nın CPV-2c'yi tespit edebildiğini gösterir. Hemagglütinasyon ve PCR ile karşılaştırıldığında ELISA'nın duyarlılığı ve özgüllüğü, tüm CPV-2 suşları için PCR (%100 duyarlılık) ile karşılaştırıldığında ELISA için %86,3 ve hemagglütinasyon için %65,3 duyarlılık belirlenmiştir (Decaro ve ark 2013). Klinik enfeksiyon belirtileri olan ELISA-pozitif bütün hayvanlar, gerçekpozitif olarak kabul edilmelidir. Modifiye canlı virüs ile yapılan yeni aşılama, 10 gün içinde hatalı pozitif sonuçlara neden olabilir; ancak yakın zamanda aşılanmış kusma ve ishal belirtileri olan yavru köpeklerde, çoğu vaka saha CPV suşu ile gerçek enfeksiyona maruzdur veya aşımın kendisinden ziyade başka bir gastrointestinal enfeksiyona yakalanmıştır (Decaro ve ark 2007). Fekal ELISA testinin hatalı negatif olabilmesinin birçok nedeni vardır. Fekal CPV viral yükleme, serum antikor titreleri ve test için klinik belirtilerin zamanı karşılaştırıldı ve karakteristik olarak hatalı negatif dışkı ELISA'sı olan köpeklerde fekal ELISA'sı CPV pozitif köpeklerle karşılaştırıldığında daha düşük fekal virüs yükü, düşük dışkılama sıklığı ve daha yüksek serum antikor titreleri vardı (Proksch ve ark 2015).

2.5. Tanısal Görüntüleme

Tanısal görüntüleme, CPV'den etkilenen hayvanlar için büyük ölçüde spesifik değildir. Erken saatlerde karın grafileri normal görünebilir, sonra ince bağırsağın gaz veya sıvı ile dolgunluğu ile birlikte ileus belirtileri radyografide yansıtılabilir (Farro 1982). Bulguları doğrulanmış CPV enfeksiyonlu 40 yavruda abdominal ultrasonografi nonspesifikti, midenin tüm bölgelerinde gaz ve sıvı dolgunluğu, ince ve kalın bağırsaklarda etkisiz peristaltizm, anekoik peritoneal efüzyon, duodenumda hiperekoik beneklenme görülebilir (Stander ve ark 2010). Bununla birlikte, ultrasonografi gastrointestinal yabancı cisim, obstrüksiyon veya invaginasyon gibi diğer kusma ve ishal nedenlerini ve antiemetik ilaçların uygulanmasına rağmen inatçı rahatsızlık veya şiddetli kusmayı ekarte etmede yararlıdır. Ultrasonografik anormalliklerin derecesi, CVP'li köpeklerde hastalığın şiddeti ile pozitif ilişkilidir (Stander ve ark 2010).

2.6. Endokrin ve Diğer Biyomarkırlar

CPV ile enfekte köpeklerde çeşitli klinikopatolojik biyobelirteçler araştırılmıştır. Diğer kritik hastalıklarda gözlemlendiği gibi, CPV ile enfekte olan hayvanlarda stres tepkisi ve kortizol konsantrasyonları artar ve hastanede yatıştan 24 ve 48 saat sonra ölümlerin habercisi olabilen ötiroid hasta sendromu gelişir (Schoeman ve ark 2007; Schoeman ve Herrtage 2008). Doğal olarak oluşan enfeksiyonda, hayvanın nötropenik olduğu süre boyunca endojen köpek granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) düzeylerinin arttığı bulunmuştur (Cohn ve ark 1999). Köpeklerde diğer kritik hastalıklarda olduğu gibi, serum magnezyum seviyeleri sıklıkla azalır; ancak bu bulgu hastalık sonucu ile ilişkili değildir. C-reaktif protein, (Kocaturk ve ark 2010; McClure ve ark 2013) total kolesterol, yüksek yoğunluklu lipoprotein, serum trigliserid (Yılmaz ve Senturk, 2007), lipid peroksidaz, çinko (Panda vd. 2009), pankreatik lipaz ve plazma sitrülün seviyelerinin de (Otto ve ark 1997; Dossin ve ark 2011; Kalli ve ark 2017) CPV enfeksiyonuna yanıt olarak değiştiği belgelenmiştir. Bu testler, morbidite veya mortaliteyi öngöründe tek başına yararlı değildir; ancak, bunlarla enfeksiyonun şiddeti öngörülebilir (Schoeman ve ark 2007; Kocaturk ve ark 2010; McClure ve ark 2013). Ek olarak, vasküler endotel hasarı, sistemik inflamasyon, pıhtılaşma aktivasyonu ve hipovoleminin yanı sıra yangısal biyobelirteçlerin varlığı sıklıkla hastaları hiper pıhtılaşabilir bir duruma yatkın hale getirir (Otto ve ark 2000). Bu olasılık, intravenöz kateterlerin bakımında ve tromboflebit gelişiminde bir faktör

olabileceği gibi şiddetli vakalarda organ hasarı sonucuna katkıda bulunabilir. CK-MB ve BNP düzeylerindeki artış durumunda, histopatolojik bulgulara bakarak uzun süreli akut miyokardit ve hemorajik parvoviral enteritin birlikte olabileceği dikkate alınmalıdır (Er ve Ok 2015; Gulersoy ve ark 2020).

2.7. Tedavi

Parvoviral enterit tedavisi, büyük ölçüde klinik kusma ve diyare iyileşene kadar destekleyicidir. Genel olarak, klinik belirtilerdeki iyileşme sıklıkla lökosit sayısında geri dönüşüm ile birlikte, ancak, aspirasyon pnömonisi, devam eden hipoglisemi, hipoalbuminemi ile birlikte ödem veya invaginasyon gibi olumsuz durumların gelişiminde daha yüksek morbidite ve daha uzun hastanede yatış süresi ile sonuçlanabilir. Parvovirüs tedavisinde hayvan sahipleri için önemli zorluklar ve sınırlayıcı faktörler hastaneye yatış ve tedavi maliyetidir. Parvovirüs vaka kümeleri, sosyoekonomik olarak ayrıcalıklı olmayan bölgelerde belgelenmiş (Brady ve ark 2012, Kelman ve ark 2019), belki de aşılama için eğitim ve maddi yetersizlikle bu yavrularda hastalığa yakalanma riski daha yüksektir. Etkilenmiş bir hayvanın hastaneye kabul edilip edilmeyeceği kararı, ayakta tedavi veya ötenazi yerine altın standart olup büyük ölçüde hayvan sahibinin bakım masraflarını ödeme kabiliyetine ve istekliliğine bağlıdır.

2.7.1. Vasküler Ulaşım ve Sıvı Tedavisi

CPV tedavisi için altın bakım standardı, intravasküler sıvı volümünü eski haline getirmek için IV sıvıların uygulanmasını içeren en agresif tedavi olup interstisyel sıvı kayıplarını tekrar doldurur ve hidrasyonu korur. Sıvıyı en aza indiren yardımcı tedaviler antiemetikler ve gastroprotektan ajanlar olup, analjezi ve beslenme sağlarlar. Sekonder bakteriyel enfeksiyonun antibiyotiklerle önlenmesi de önemlidir. Sıvı tedavisinin temel dayanağı öncelikle damar yolu açılmasıdır. En hipovolemik veya interstisyel dehidre hastalarda, bu bazen zor olabilir ve intraosseöz yerleştirilmesini gerektirebilir. Kusmuk ve dışkı ile bir kateterin yüksek kontaminasyon riski nedeniyle juguler kateter yerleştirilmesi tercih edilir. Juguler kateter yerleştirme sadece IV sıvıların verilmesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda perkütan venipunktur ihtiyacı olmadan glikoz, asit-baz ve elektrolit izleme için kan örneği toplama için fayda sağlar. En hipovolemik hastalarda, juguler kateter ile aynı başarı derecesi ile intraosseöz erişim daha hızlı olabilir (Allukian ve ark 2017) ve

volümün ikamesi için başlama zamanı açısından dikkate alınmalıdır. Gerektiğinde intravenöz olarak verilebilecek herhangi bir sıvı intraosseöz kateter yoluyla da uygulanabilir (Hughes ve Beal 2000, Macintire 2008). Vasküler erişim sağlandıktan sonra dengeli bir izotonik kristaloid sıvı verilmelidir. İlk sıvı uygulama hacmi ve hızı büyük ölçüde şunlara bağlıdır: interstisyel dehidratasyonun derecesi ve hipovoleminin olup olmadığı. Eğer bir hasta klinik hipovolemi belirtileri gösteriyorsa (taşikardi veya bradikardi, hipotermi, gecikmiş kapiller dolum süresi, hipotansiyon) IV sıvı, artımlı boluslar (20 mL/kg) olarak uygulanmalıdır.

Daha doğru ve önerilen bir yaklaşım hastanın interstisyel hidrasyon eksikliğini ve bunu bir sonraki 12 ila 24 saatte devam eden kayıpları hesaplamak, bakım (idame) sıvısı gereksinimlerini de göz önünde bulundurmadır. Sıvı kaybını izlemenin basit bir yöntemi hastayı tartmaktır, çünkü 1 gr vücut ağırlığı 1 mL sıvı kaybına eşittir. Bir kez intravasküler ve interstisyel hacim geri yüklendiğinde, devam eden sıvı kazancı veya kaybı şuna eşittir: sıvının üçüncü aralığının oluşmaması koşuluyla hastanın vücut ağırlığı. CPV enteritli hastalarda gözlenen sıvı-elektrolit ve asit-baz düzensizlikleri için kristaloid sıvılar kullanılabilir. Hastaların çoğunda normal asit-baz durumu olmakla birlikte, kusmukla hidroklorik asit kaybının derecesi hipokloremik metabolik alkaloz gelişimine neden olabilir (Decaro ve ark 2007). Bireysel hastanın serum potasyum konsantrasyonuna göre desteklenebilir (Heald vd. 1986, Ford ve ark 2017). Hipoglisemi yaygındır, serum glukoz konsantrasyonu sık sık izlenmelidir ve gerektiğinde takviye edilir. Serum glukoz düzeyi 60 mg/dL'nin altına düşerse IV (veya intraosseöz) dekstroz bolusu (1–2 mL/kg %25 dekstroz) uygulanmalıdır, ardından kristaloid sıvılara %2.5 ila %5 dekstroz ilave edilir.

2.7.2. Antiemetikler

CPV'li hastalarda kusmayı azaltmak sıvı tedavisi ve enteral beslenmeye ek olarak antiemetik kullanımı da önemlidir. Prospektif bir çalışmada, CPV enteritli yavru köpeklerde antiemetik kullanımının, hastanede kalma süresinin arttığı belirlenmiştir (Mantione ve Otto 2005). Randomize, prospektif metoklopramid (8 saatte bir 0,5 mg/kg IV), ondansetron (8 saatte bir 0,5 mg/kg IV) ve maropitan (1 mg/kg subkutan her 8 saatte, 24 saat), karşılaştırıldığı CPV'li köpeklerde kusma olaylarında başarılı bir şekilde kullanılabilir. Bu ilaçlar kusmanın şiddetini ve sıklığını azaltmada aynı derecede etkili bulunmuştur (Yalcin ve Keser 2017). Başka bir çalışmada, ondansetron (her biri 0.5 mg/kg IV) veya maropitant (1 mg/kg IV her 24

saat) ile tedavi edilen CPV'li yavru köpeklerde hastanede kalış süresi, antiemetik ihtiyacı, kusma süresi veya gönüllü gıdaya geçiş günleri arasında fark olmamıştır (Sullivan ve ark 2018).

2.7.3. Antimikrobiyal Kullanım

CPV enteritli hastalar, villöz kollaps ve koruyucu immun fonksiyon eksikliği nedeniyle bağırsaktan bakteriyel translokasyon açısından yüksek risk altındadır. Çeşitli bakteriler (*Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Salmonella* spp) CPV enteritli septik hastalarda belirlenmiştir (Sykes, 2010, Duijvestijn ve ark 2016, Silva ve ark 2017). CPV'den etkilenen hastaların tüm durumlarında geniş spektrumlu antibiyotikler önerilir. Kusma ve ishal nedeniyle devam eden sıvı kayıpları, hipotansiyon ve sepsis potansiyeli ile birleştiğinde, CPV enteritli köpeklerde akut böbrek hasarı gelişme riski yüksektir. Bir çalışmada kan üre nitrojeni, kreatinin, idrar özgül ağırlığı ve protein/kreatinin oranı değerlendirilmiş ve BUN'da değişiklik gözlenmezken kreatinin, protein/kreatinin oranı ve idrar özgül ağırlığı daha yüksek bulunmuştur. CPV'li köpeklerde glomerüler hasar ve renal tübüler hasarın diğerbiyobelirteçleri önemli ölçüde artmıştır, bu da gizli akut böbrek hasarı geliştiğine işaret eder (Van den Berg ve ark 2018). Çünkü çok sayıda geniş spektrumlu antimikrobiyalkombinasyonlar bulunduğu için, CPV enteritli hastalarda nefrotoksisite riski taşıyan antibiyotikler (aminoglikozit gibi) önerilmez. CPV enteritli yavru köpeklerde genellikle gastrointestinal parazitizm dahil olmak üzere komorbiditeler bulunur. Bunu göz önünde bulundurarak, köpek yavrusu oral tedavileri tolere edebilir olduğunda antiparazit tedavisine başlanmalıdır (Brunner ve Swango 1985).

2.7.4. Enteral Besleme

Enteral beslenme, enterosit atrofisini önlemeye yardımcı olmak ve besin sağlamak için gereklidir. CPV enteritli yavru köpeklerde enteral beslenmenin erken sağlanmasının hasta morbiditesini ve hastanede kalış süresini azalttığı gözlenmiştir (Mohr ve ark 2003). Bireysel bir hastanın enerji ihtiyacının hesaplanması için basit, doğrusal bir formül şudur: REE (istirahat enerji harcaması)=Kcal/gün (30 X vücut ağırlığı) + 70. Bireysel hastaların REE'leri hastanede yatış sırasında günden güne değişebildiği için (O'Toole ve ark 2004) keyfi hastalık, hasar ve enfeksiyon faktörlerinin toplanması doğru değildir ve genellikle tavsiye edilmez. CPV'li hastalarda nazogastrik tüp yerleştirilmesi enteral beslenme sağlamanın yanı sıra karın

rahatsızlığını ve kusmayı veya regürjitasyonu önlemek için gastrik aspirasyona izin verme aracı olabilir. Bir çalışmada (Chih ve ark 2018) tedavi protokolleri olan hastalarda gastrik aspirasyon dahil asit-baz durumunda çok az değişiklik olduğu veya hiç değişiklik olmadığını bildirilmiştir. Sıvı enteral diyetler hastanın REE'sinin %25'i ile başlanabilir, bu da klinisyenin tercihin ve hastane kaynaklarına bağlı olarak aralıklı boluslar veya sürekli enfüzyonlar şeklinde uygulanır. CPV ile enfekte hastalara kalori ve besin sağlamak için agresif erken girişimsel beslenme faydalı ve tercih edilen bir yöntem olduğu için parenteral beslenme stratejilere artık ihtiyaç yoktur (Mylonakis ve ark 2016).

2.7.5. Gözlem

CPV'li hastaların izlenmesi, interstisyel ve intravasküler hacim durumlarının, kan basınçlarının, kan glukoz düzeylerinin, asit-baz ve elektrolit durumlarının, rahatlık düzeylerinin ve bulantı derecelerinin dikkatli ve sık bir şekilde değerlendirilmesini içerir. Kirby'nin 20 İzleme kuralını kullanarak (Purvis ve Kirby 1994) klinisyenler, bakımın önemli yönlerini gözden kaçırmadan hastanın durumunu izlemek için bir kontrol listesi olarak kullanabilirler.

2.7.6. Antiviral stratejiler

Öncelikle insan gripinin tedavisinde kullanılan antiviral bir ilaç olan oseltamivir, bir nörominidaz inhibitörü olarak CPV enteritli yavru köpeklerde çalışılmıştır (Savigny ve Macintire 2010, Papaioannou ve ark 2013). Çalışma vücut ağırlığının arttığını ve lökosit sayısının korunmasını belgelemesine rağmen oseltamivir ile tedavi edilen hayvanlarda hücre sayımları, morbidite, hastanede kalış süresi ve mortalitede değişiklik olmamıştır (Savigny ve Macintire 2010, Papaioannou ve ark 2013). İnterferonların rolü CPV enteritli köpekler için olası antiviral tedavi için araştırılmıştır. Rekombinant kedi omega-interferonunun (3 gün boyunca $1-5 \times 10^6$ IU/kg/gün IV) ateş, kusma, ishal ve ölüm insidansını azalttığı ve iştahı iyileştirdiği gözlenmiştir (Ishiwata ve ark 1998, De Mari ve ark 2003).

2.7.7. Onkotik destek

Besinlerin enteral alımının olmaması ve albumin sentezi yerine akut faz proteinlerinin üretimi ile birlikte ishaller dışkıda sıvı kaybının tümü, CPV enteritli hastalarda önemli derecede hipoproteinemiye neden olabilir. Doğal veya sentetik

kolloidler şeklinde onkotik destek sağlama kararı genellikle klinisyen tercihine, ürün mevcudiyetine ve hasta boyutuna ve ihtiyacına bağlıdır. Serum albümin konsantrasyonu 2,0 g/dL'nin altına düştüğünde hasta morbidite ve mortalitesi artabilir (Mazzaferro ve ark 2020). Albümin aynı zamanda serbest radikallerin temizlenmesine ve ilaç taşınmasına da katkıda bulunarak CPV'li yavru köpeklerde albümin replasmanını zorunlu hale getirir. Albümin, taze veya taze donmuş plazma veya konsantre albümin ürünleri uygulanarak geri yüklenebilir. Serum albümin konsantrasyonunu 0,5 g/dL artırmak için yaklaşık 20 mL/kg plazma verilmelidir. Anekdot raporları, taze donmuş plazma uygulamasının (6,6–11 mL/kg IV veya intraperitoneal, 12 saat arayla 3 doz), maruz kalan köpeklerde şiddetli enfeksiyonu önlemede profilaktik olabileceğini düşündürmektedir (Dodd 2012). Köpeklerle özgü albümin konsantresi de uygulama için mevcuttur ve konsantre insan albümin ürünlerinin uygulanmasıyla gözlenen önemli bir bağışıklık uyarımı riski olmadan serum albüminini eski haline getirmek için uygun maliyetli bir yöntemdir (Cohn ve ark 2007, Martin ve ark 2008, Mazzaferro ve ark 2020). Daha fazla onkotik destek gerekirse, klinisyenin tercihine bağlı olarak hidroksietil nişasta (20–30 mL/kg/gün) uygulanabilir.

2.7.8. İmmün Plazma

Annenin pasif bağışıklığından türetilen dolaşımdaki antikorlardaki düşüş, CPV enfeksiyonuna yakalanma riskine katkıda bulunan önemli bir faktördür. Dolaşımdaki parvovirüse bağlanan antikorlar ile parvovirüsün bağlanma yeteneği teorik olarak nötralize edilebilir ve hücrelere hücumu, enfeksiyonu ve çoğalma yeteneği etkili bir şekilde azaltılır (Bragg ve ark 2012). Dolaşımdaki antiparvovirüs antikorlarını arttırmastratijeleri, potansiyel tedavi olarak araştırılmıştır (Meunier ve ark 1985, Macintire ve ark 1999, Bragg ve ark 2012). Köpek CPV-hiperimmün plazmasının deneysel enfekte köpeklerle CPV inokülasyonundan hemen sonra uygulanması, kusma ve diyare insidansını azaltmış ve sağkalımda iyileşme sağlamıştır (Meunier ve ark 1985). Randomize bir prospektif çalışmada, CPV ile doğal enfeksiyonlu hayatta kalan köpeklerden elde edilen tek doz 12 mL immün plazma, lökosit sayısını ve vücut ağırlığını iyileştirmede veya viremi ve hastanede kalış süresini azaltmada başarılı olmamıştır (Bragg ve ark 2012). Feline antiparvovirus antikorları ile gastrointestinal belirtiler, fekal viral yük, etken saçılması, hastanede kalış süresi, morbidite veya mortalitenin azaltılmasında başarısız olmuştur (Gerlach ve ark 2017). Doğal oluşan CPV enteritinde liyofilize immunoglobulin G, klinik belirtileri ve hastanede kalma süresini azaltmıştır (Macintire ve ark 1999). İmmün plazmanın parenteral tedavisinin kesin olmayan sonuçlarına rağmen CPV antikorlarının

erken enteral uygulaması, deneysel CPV'li yavru köpeklerde klinik belirtileri azaltmada etkili olmuştur (Van Nguyen ve ark 2006).

2.8. Prognoz

Hayatta kalma prognozu, genellikle tedavinin başladığı zamanda klinik belirtilerin şiddetine bağlıdır. Hipovolemi ve zayıf perfüzyonu gösteren klinik belirtiler, ateş, düşük protein C seviyesi, artmış kortizol seviyesi, düşük tiroksin ile birlikte 1000/mL'den az lenfosit sayısı ve hipoalbuminemi yüksek mortalite ile ilişkilendirilmiştir (Kalli ve ark 2010). Hastanın geldiği zaman lenfopeni ve hipoalbuminemi varsa yatış süresinin ve hastanede kalış süresinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Kalli ve ark 2010). Genel olarak, hayatta kalma prognozu, tedavi türü ve tedaviye bireysel hasta yanıtına göre %60 ila %90 arasında değişir (Prittie 2004, Kalli ve ark 2010, Miranda ve ark 2015). Komorbiditeler (köpek koronavirüsü ve gastrointestinal parazitizm gibi) hasta morbidite ve mortalitesini artırmıştır. Tedavi olmadan prognoz kötüdür ve %90'dan fazlasında ölüm meydana gelir (Prittie 2004).

3. METABOLOMİKLER

Yüksek verimli, kantitatif ölçümlerdeki son teknolojik gelişmeler, moleküler düzeyde sistemler yaklaşımlarının uygulanmasını sağlamıştır. Birkaç omik yaklaşımı (genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik) bir sistemdeki moleküllerin artan kapsamlılık, doğruluk ve hassasiyetle tanımlanmasına ve ölçülmesini sağlamaktadır. Omik yaklaşımların geliştirilmesi, uygulanması ve yorumlanması ile elde edilen veri setlerinin hesaplamalı entegrasyonu ve modellemesi, her biri, onu mümkün kılan teknoloji ile gelişen ve büyüyen kendi uzmanlık alanını oluşturmaktadır. Bu yaklaşımların kapsamı, boyutu ve devam eden evrimi göz önüne alındığında, etkili ve sürekli iletişim ve veri toplama, düzenleme ve yayma için net bir plan gerektiren sistem biyolojisinin doğasında ekip bilimi ve disiplinler arası iş birliği yer almaktadır. Sistem biyolojisi yaklaşımları, karmaşık biyolojik olayların anlaşılmasına ve hipoteze dayalı sorgulanmasına yardımcı olmak için sistemlerin kapsamlı, tarafsız modellenmesini sağlar (Eckhardt ve ark 2020).

Enfeksiyöz hastalıklar bütün dünyada en önemli ölüm nedenlerindendir. Enfeksiyöz hastalıklara yanıt olarak bir insan/hayvan ve mikrobiyal metabolik ağın tanımı, metabolomik araştırmanın amacıdır. Metabolik ağlar, metabolitler üretimi ile temsil edilen genomik ve proteomiklerin fonksiyonel ifadesi olup kesinlik hekimlik modellerinde faydalı ve sağlam bir araç oluşturur. Bu açıdan, durumu iyileştirecek prosese yardımcı olmak için enfeksiyöz hastalıklarda erken bir teşhis, zamanında tedavi ve yakından takip gerekir, bu yüzden metabolomikler hastaların metabolomlarına dayalı tedaviye yardım edecek üstün bir araç olarak ortaya çıkmaktadır (Bueno 2021, Azad ve ark 2023). Parvoviral enteritisli köpeklerde yapılan proteomik bir çalışmada tükürük proteinlerinin fizyopatolojik değişiklikleri yansıttığı ve bu hastalık için potansiyel bir biyobelirteçler kaynağı olabileceği belirtilmektedir (Franco-Martínez ve ark 2018). Metabolitlerin tanımlanmasına yönelik yaklaşımlar, erken biyokimyasal yollardan modern yüksek boyutlu metabolomiklere giden yolun değerlendirilmesi, tanımlamak için güçlü bir araç, sağlık ve hastalığın biyobelirteçlerini karakterize eder (Diray-Arce ve ark 2020). Biyolojik matrislerde birçok NMR spektroskopisinin uygulaması, nicel olarak tanımlanan metabolomik alanındadır, bu da fizyopatolojik durum veya genetik değişime canlı sistemlerin dinamik multiparametrik metabolik cevabının kantitatif ölçümü demektir (Eckhardt ve ark 2020). Bu teknik, global metabolik değişikliklerin değerlendirilmesinde umut verici bir araç olarak kabul edilmektedir ve diğerlerinin yanı sıra hastalıkları ayırt etmek, hastalık şiddetini belirlemek ve terapötik yanıtı değerlendirmek için klinik tanı sürecinde çok yararlı olabilir.

Metabolomikler, insanlardaki Covid-19 dahil çeşitli viral hastalıklarda (dengue serotype 4, chronic viral hepatitis C) çalışılmıştır (Santos ve ark 2017, Hasan ve ark 2021). Kritik çocuk hastalarda post operatif non-enfeksiyöz yangı enfeksiyonlulardan (bakteriyel ve viral), ayrıca sepsis ve enfeksiyon da birbirinden NMR bazlı metabolomiklerle iyi ayırt edilmektedir (Grauslys ve ark 2019).

Metabolomikler çeşitli enfeksiyöz hastalıkları araştırmak için kullanılmaktadır. Metabolomiklerin en yaygın uygulaması prognostik ve diyagnostik amaçlar için, özellikle hastalığa özgü biyobelirteçlerin taranması içindir (Tounta ve ark 2021). Metabolomikler, hastalığın sonucunu kısa sürede daha kesin bir şekilde tahmin etmede önemli rol oynayabilirler. Bir işlevsellik modeli olarak metabolomiklerle, mikroorganizmalar ve konakçı arasındaki etkileşimlerin klinik seyri öngörülebilir, bu da enfeksiyöz prosesin tedavisi sırasında karar verme analizinin temeli olarak bir metabolik akışlar ağı veya fluksozom oluşturmayı sağlayabilir(Bueno 2021).

3.1. Metabolomik ve Viral Enfeksiyonlar

Birkaç viral enfeksiyona konakçının doğuştan gelen bağışıklık tepkisi iyi çalışılmıştır. Herpesviridae virüsler ailesine karşı immünometabolik yanıt en çok çalışılanıdır; Ancak Epstein-Barr virüsü, influenza virüsü, rinovirüsler, Flaviviridae, hepatit B ve C virüsler, insan immün yetmezlik virüsü ve daha yeni olarak SARS- CoV-2 gibi diğer birçok virüse yanıt da araştırılmıştır. Viral enfeksiyonlar sırasında, konakçı metabolik yanıtı artan viriona replikasyon hızına uyum sağlamak için virüs tarafından manipüle edilir. Bunu, aerobik glikoliz dahil enerji üreten metabolizmadan konakçı hücrelerini anaerobik glikolizden daha etkili enerji üretim araçlarına değiştirerek yapar (Mayer ve ark 2019). Bununla birlikte, daha yakın zamanlarda, viralenfeksiyon hastalıklar üzerine inflamasyonun ve inflamatuvar metabolitlerin ve lipidlerin rolünü anlamada ilerleme sağlanmıştır. Önemli bir çalışma dengue virüsü enfeksiyonunda metabolom ve lipidom araştırılmıştır. Çalışma, yağ asidi biyosentezi, yağ asidi beta-oksidasyon, çoklu doymamış fosfolipid hidrolizi, lipoliz, ve glikoliz gibi yolları tanımlamıştır. Viral enfeksiyonlar, konakçı hücre metabolizmasında hücresel yeniden programlama ile sonuçlanan değişikliklere neden olur. COVID-19'da konakçı metabolitlerinin düzensizliği, teşhis ve bakım dahil çeşitli yönlerden araştırılmıştır (Gowda ve ark 2023). Metabolomik/proteomik çapraz tanımlama, hastalık yollarını tanımlar. COVID-19 hastalığının şiddeti, kandaki çeşitli belirteçlerle ilişkilidir. COVID-19 hastalığının şiddeti, küçük bir metabolit seti ile doğru bir şekilde öngörülebilir. COVID-19 hastaları çeşitli yollarda serum değişiklikleri gösterir. Covid-19'un moleküler

seviyede fizyopatolojisini daha iyi anlaşılması ile kısa ve uzunsürelili hedefli terapiler ortaya konabilir (Buykozan ve ark 2022).

3.2. Viral Enfeksiyonlar – Biyobelirteçler

Biyobelirteçler, bolluğu olarak kullanılabilen metabolitler olduğundan belirli hastalık durumlarının veya aşamalarının göstergeleri olmuştur. Bunlar viral hastalıkları teşhis etmek ve ilerlemesini değerlendirmek için kullanılmıştır. Bunları hastalıkla ilgili değişiklikleri, genellikle konakçının immün yanıtının ve enfeksiyona yanıt olarak ana biyokimyasal yolların düzensizliğinin sonucudur (Tounta ve ark 2021).

Bu çalışmanın amacı, CPV hastalığı hakkında metabolomik düzeyde bir anlayış elde etmek ve hastalıklı köpeklerde sağkalım öngörüsünü metabolomikler üzerinden değerlendirmektir. Akut CPV enfeksiyonunda sonuç öngörüsünde fizyopatolojik değişiklikleri hedefleyen bir dizi biyobelirtecin değerlendirilmesi, herhangi bir spesifik biyobelirtece göre daha faydalı olacaktır. Bu biyobelirteçler dizisi, farklı patojenlerle enfekte olmuş hastaları ayırt etmek, bu enfeksiyonlara karşı aşı kaynaklı korunmayı öngörmek ve bağışıklık hakkında fikir vermek için kullanılabilmektedir. Küçük moleköl ağırlıklı metabolitler (<1500 dalton) dizisi olan metabolomikler, NMR spektrometresi ve Kütle spektrometresi (Mass Spectrometry) ile ölçülebilmektedir. Metabolomik alan erişilebilirlik, kullanılabirlik ve karmaşıklık açısından geliştikçe, sağlık ve hastalık biyolojisine ilişkin derin kavrayışlar elde etmek için metabolomik veriler klinik ve diğer sistemler biyolojisi verileriyle giderek daha fazla entegreedilecektir.

Hipotezimiz şudur: (1) NMR bazlı metabolomikler CPV enfeksiyonu için yaşayabilirlik öngörüsünde faydalı olabilir, (2) Pozitif prediktif değeri ve cut-off değeri, NMR bazlı biyobelirteçlerin spesifitesi ve sensivitesi ile birlikte tedaviye cevapta yaşayanlar ve ölenler arasında farklılık oluşturabilecektir

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Hasta Seçimi ve Gruplar

Zayıflık, iştah azalması, ishal/hemorajik ishal, kusma, ateşi olan veya olmayan dehidratasyon anemnezli toplam kırk (40) CPV'li köpek (yaşları 1.5 ile 4 ay arasında) bu çalışmaya dahil edildi. Hastalarda klinik belirtiler: temperatür (≤ 37.3 , 37.4–39.4, 39.5–39.9, 40.0–40.4, ≥ 40.6), dışkıda mukus, sulu dışkı, kanlı dışkı, anoreksi, depresyon, letarji, kusma, öksürük) daha önce açıklanan yöntemle göre (Van Nguyen vd. 2006) skorlandı. Çalışmaya dahil edilecek köpekler CPV enfeksiyonuna karşı aşılanmamıştı. Tedavide İV sıvılar (gereklikçe kristaloid + kolloid sıvı + K ilavesi) ile birlikte geniş spektrumlu antibiyotikler (sefiksim 30 mg/kg, İV+ metronidazol 5-7 mg/kg İV), antiemetik (maropitant 0.1 mg/kg), antianflamatuvar (meloksikam 0.06 mg/kg SC) ve antioksidan (asetilsistein 20 mg/kg İV) uygulandı. Tedavi edilenlerdentamamen iyileşenlerle tedaviye cevap vermeyip ölenler not edildi. CPV'li hastalardan iyileşen grup 30, ölümle sonuçlanan grup 10 ve kontrol grubu da sağlıklı (aynı yaş grubu) 10 köpekten oluştu.

Tablo 1. CVP'li köpeklerde klinik skor ölçümü.

Klinik belirti	Skor
Temperatür	
≤ 37.3	1
37.4–39.4	0
39.5–39.9	1
40.0–40.4	2
≥ 40.6	3
Dışkıda mukus	1
Sulu dışkı	2
Dışkıda kan	3
Anoreksi	1
Letarji	1
Depression	1
Vomiting	1
Coughing	1

4.2. CPV Enfeksiyonunun Tanısı

4.2.1. Hızlı CPV Antijen Test Kiti

Fekal örneklerde CPV enfeksiyonunun tanısı, hızlı CPV antijen test kit kullanıldı.

4.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Steril bir swapta toplanan dışkı örnekleri hemen fosfat tamponlu salin ($1 \times$ PBS; pH 7.3 ± 0.1) içeren bir tüpe daldırılacak ve sonraki analize kadar -20°C 'de saklandı. Fekal örnekler 8000 rpm'de 4°C 'de 5 dakika santrifüjlendi ve 200 μL süpernatant alınarak deoksiribonükleik asit (DNA) ekstraksiyonu için işlendi. Total genomik DNA, üretici firmanın talimatlarına göre QIAamp DNA Mini Kit kullanılarak toplanan tüm dışkı örneklerinden ekstrakte edildi. CPV-2 enfeksiyonunun teşhisi, daha önce açıklanan yönteme göre (Buonavoglia vd. 2001) 583 bp'lik VP2 gen fragmanını hedefleyen PCR primerleri [Forward 5'CAGGAAGATATCCAGAAGGA3' ve Reverse 5' G G T G C T A G T T G A T A T G T A A T A A C A 3 ') kullanılarak dışkı örneğindeki viral genomun doğrudan tespiti ile gerçekleştirildi (Buonavoglia vd.2001)

4.3. Kan Örneği Toplama, Hematolojik ve Biyokimyasal Analizler

Kan numuneleri, vena brachialis'ten hasta kabulünün 0 ve 72. saatlerde antikoagülan içeren ve içermeyen tüplere farklı analizler için toplandı. Hematolojik analizler tam kan sayımı: WBC, lenfositler, monositler, neutrofiller, bazofiler, eozinofiller, RBC, MCV, MCHC, PCV, Hb, RDW, PLT, MPV, PDW, PCT K₃-ETDA'lı kan örneklerinde; kan gazları analizi: pH, PO₂, PCO₂, HCO₃, BE and O₂ saturasyonu heparinli kan örneklerinde hemen ölçüldü. Serum örnekleri, antikoagülanlı kan örneklerinin pıhtılaşmasından sonra 5000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenerek elde edildi ve oto-analizör ile biyokimyasal profil (BUN, kreatinin, AST, ALT, ALP, GGT, LDH, amilaz, glikoz, total bilirubin, direkt bilirubin, kolesterol, trigliserit, total protein, albumin, fosfor, kalsiyum ve magnezyum) için analiz edildi.

4.4. Kardiyak Troponin I (cTnI) Değerleri

Serum cTnI değerleri Diagnostic Products Corporation Immulite ELISA ile belirlendi. Bu tahlil, tatminkar kesinlik değerleri gösterilerek daha önce doğrulandı (Apple vd. 2008).

4.5. İstatistiksel Analizler

Sağlıklı, hayatta kalan ve ölen gruplar arasında klinik skor ve hemato- biyokimyasal parametrelerindeki farklılıklar için one-way varyans analizi yapıldı. Yaşayanlar ve ölenler arasında en iyi farklılık için prognostik bir cut-off değer receiver operating characteristic curve (ROC) analizi ile belirlendi. Eğri altında kalan saha, sensitivite ve spesifisite her değer için hesaplandı. İyileşen grup için pozitif prediktif değer (PPV), her bir belirteç için tedavinin başlamasından 72 saat sonra, $PPV = TP / (TP + FP) * 100$ formülü kullanılarak hesaplandı; burada TP gerçek pozitifler ve FP hatalı pozitiflerdir. Veri analizi SPSS sürüm 20 istatistiksel paket kullanılarak yapıldı. Grafikler GraphPad Prism 6.0'da çizildi. Tüm karşılaştırmalar için $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi (Eregowda vd. 2021).

4.6. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) Bazlı Metabolomiklerin Ölçümü ve Değerlendirilmesi

Bu kısımda yer alan metabolomik ölçümler, Avrupa Birliği (Horizon 2020) Araştırma alt yapıları programından destekli olarak İtalya'da Floransa Üniversitesi CERM (Nükleer Manyetik Rezonans Merkezi)'de yapıldı.

4.6.1. H-NMR Spektroskopisi İçin Ekstrakt Hazırlanması:

Serum örnekleri (0 ve 72. saatler), buz üzerinde çözdürüldü ve ikili metanol-kloroform ekstraksiyonu (hidrofilik ve lipofilik fraksiyonların protein presipitasyonu ve seperasyonu için) önceki modifiye metotla elde edildi. Bu, makromolekülleri (ör. proteinler) elimine ederek suda ve yağda çözülebilen metabolitleri için birleşik bir metabolik profil oluşturdu. Kısaca, 0.5 ml'lik donmuş serum örnekleri, 1 ml kloroform / metanol (1/1 oranında) ile karıştırıldı ve santrifüj edildi. Süpernatant (organik faz) toplanacak ve pelet 0.5 ml kloroform:metanol ile tekrar suspanse edilip santrifüje edildi. Süpernatantlar birleştirildi ve kalan suda çözülebilir metabolitleri organik fazdan temizlemek için 0.5 ml donmuş su eklendi. -20°C derecede 15 dakika

tutulduktan sonra, üstte kalan kısım alındı ve kalan kısma 1 ml su eklendi (peletten kalan suda çözülebilir metabolitleri peletten yıkamak için) ve örnek santrifüj edildikten sonra 24 saatte liyofilize edildi.

Su bazlı ekstraktlar 0.5 ml D₂O'da çözdürüldü, santrifüj edilecek ve 5 mm'lik NMR tüplerine transfer edildi. Lipid bakımından zengin metanol/kloroform fraksiyonu (düşük sıcaklığa maruz kaldıktan sonraki dip faz) oda ısısında buharlaştırıldı; lipid bazlı ekstraktlar, 0.6 ml döteryumlu kloroform / metanol (1/2 oranında) ile çözdürüldü, santrifüje edildi ve 5 mm'lik NMR tüplerine transfer edildi.

4.6.2. Serum Ekstraktlarında Kalitatif ve Kantitatif H-NMR Spektroskopisi:

Su bazlı serum numunelerini hazırlamak için, kurutulmuş numuneler 700 µL 2H₂O (%99.9 atom D, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) içinde çözüldü ve 1 dakika santrifüje edilerek homojenleştirildi. Her numune, 70 µL potasyum fosfat tamponu (pH 7.4; 1.5 M K₂HP0₄, %100 (v/v) 2H₂O, 2 mM NaN₃, 5.8 mM döteryumlu TMSP) ile karıştırılmıştır. NMR analizi için, her karışımdan 600 µL, 5 mm NMR tüplerine (Bruker BioSpin s.r.l.) aktarıldı.

Lipid serumla kurutulmuş ekstraktlar ise 700 µL CDCl₃ (%99.8 atom % D, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) içinde çözüldü ve homojenliği sağlamak için 1 dakika vortekslendi. Analiz için, her numuneden 600 µL'lik kısımlar 5 mm NMR tüplerine (Bruker BioSpin s.r.l.) yerleştirildi.

600.13 MHz proton Larmor frekansında çalışan 600 MHz'lik bir spektrometre (Bruker BioSpin s.r.l.; Rheinstetten, Almanya), her numune için tek boyutlu (1D) ¹H-NMR spektrumları elde etmek için kullanıldı. Ekipman, bir z eksenli gradyan bobini ve 5 mm PATXI ¹H-¹³C-¹⁵N içeren bir prob ile kuruldu. Ayrıca numuneleri buzdolabında tutan otomatik bir numune değiştiriciye ve otomatik ayarlama ve eşleştirme ünitesine (ATM) sahipti. Minimum sıcaklık dalgalanmalarını sağlamak için (numunede ±0.1K dahilinde), bir BTO 2000 termokupl kullanıldı. Ölçümleri gerçekleştirmeden önce, NMR tüpleri, sıcaklığın dengelenmesi için minimum 5 dakikasüreyle 310K'de NMR prob kafasının içinde tutuldu.

Nuclear Overhauser Etkisi Spektroskopisi puls dizisi (NOESY 1Dpresat; noesygppr1d.com; Bruker BioSpin) (Mckay 2011) hem suda hem de lipidde çözünür numuneler için tek boyutlu ¹H-NMR spektrumları elde etmek için kullanıldı. Edinme parametreleri 98304 veri noktası, 18028 Hz spektral genişlik, 2,73 s edinme süresi, 4

s gevşeme gecikmesi, 0,01 s karıştırma süresi ve 64 tarama içeriyordu. 600 MHz spektrometrenin yapılandırması ve ayarları hakkında daha fazla ayrıntı için, önceki yayımlara (Basoglu vd. 2016, 2017, 2018 ve 2020) başvurulabilir.

4.6.3. NMR sürecindeki spektrumlar:

Fourier dönüşümünü gerçekleştirmeden önce, serbest indüksiyon bozunmaları, 0.3 Hz'lik bir çizgi genişletme faktörüne karşılık gelen üstel bir fonksiyonla çarpıldı. Ortaya çıkan spektrumlar, faz ve temel bozulmalar için otomatik olarak düzeltildi ve TopSpin 3.2 yazılımı (Bruker BioSpin) kullanılarak kalibre edildi. 5.24 ppm'deki anomerik glikoz ikilisi sinyali, serum su bazlı ekstraktlarının düzeltilmesi için bir referans olarak kullanılırken, 7.20 ppm'deki kloroform tekli, organik fraksiyonlar için bir referans görevi gördü.

Her suda çözünür 1D ¹H-NMR spektrumu, 0.02-10.0 ppm aralığında 0.02 ppm kimyasal kaydırma kaplarına bölündü. Karşılık gelen spektral alanları, AMIX yazılımı (sürüm 3.9.15, Bruker BioSpin) kullanılarak entegre edildi. Kalıntı H₂O sinyalini içeren 4,62 ve 4,75 ppm arasındaki bölgeler, çok değişkenli analizi doğru bir şekilde gerçekleştirmek için hariç tutuldu. Sistemin boyutu 483 göze düşürüldü.

Her bir yağda çözünür 1D ¹H-NMR spektrumu, toplam 315 göz için multivariate analizi doğru şekilde gerçekleştirmek üzere 0,02-6,5 ppm aralığında 0,02 ppm kimyasal kaydırma kaplarına bölündü. Özellik tanımadan önce, spektrumlara total integral normalleştirme uygulandı.

Metabolitler ve lipidlerin belirlenmesi ve kantifikasyonu Serum suda çözünür ekstraktların ¹H NOESY spektrumundaki metabolitleri belirlemek ve ölçmek için saf organik bileşiklerin ¹H NMR spektrumlarından oluşan bir kitaplık (BBIOREFCODE, Bruker BioSpin) ve mevcut literatür kullanıldı. Tüm spektrumlarda toplam 28 metabolit net bir şekilde tanımlandı ve kantifiye edildi (isteğe bağlı birimlerde göreceli yoğunluklar). Serum yağda çözünen ekstraktların ¹H NOESY spektrumundaki NMR sinyalleri için belirlemeler literatüre dayalıdır. Edinilen tüm spektrumlarda toplam 17 lipid özelliği belirlendi ve kantifiye edildi (keyfi birimlerde göreceli yoğunluklar).

Metabolitlerin ve lipid özelliklerinin nispi konsantrasyonlarını (isteğe bağlı birimlerde ifade edilir) belirlemek için, standart çizgi-şekil analiz yöntemlerini kullanarak NMR piklerini entegre eden şirket içinde geliştirilmiş bir R betiği kullanıldı.

4.6.4. İstatistiksel analiz

Multivariate analiz

Random Forest (RF) algoritması (Ali vd. 2012, Chen vd. 2013, Amaratunga ve ark. 2008) dört grubun (sağlıklı kontrol (S), hasta 0 zamanında (H 0h), hasta 72. saatte (H 72h) ve ölü (non-survivor) (Ö)) tüm metabolik ve lipidik profillerinin ikili sınıflandırması için kullanıldı. Aşağıdaki karşılaştırmalar yapıldı: S – H 0 saat, S – H 72 saat, S - Ö, H 0 saat - Ö, H 72 saat - Ö ve H 0 saat – H 72 saat grupları.

Univariate analiz

Dört grup arasındaki farkları değerlendirmek için, non-parametrik Wilcoxon Rank-Sum test (Wilcoxon 1945, Neuhäuser 2011) kullanıldı. Ek olarak, H0h ve H 72h grupları arasındaki ikili farklılıkları incelemek için non-parametrik Wilcoxon signed- rank test kullanıldı. Bu pilot çalışmada, olası biyobelirteçlerin tanımlanmasını sağlamak için yüksek tip I hata riski pahasına çoklu testler için ayarlamaları analizimize dahil etmemeyi seçtik.

Yazılım

Tüm hesaplamalar R'de (sürüm 4.0.3) yapılmıştır (Ali ve ark 2012, Tippmann 2015). RF sınıflandırma modelleri oluşturmak için, R paketi Random Forest (Breiman2001, Ali ve ark. 2012)'de uygulanan “randomForest” fonksiyonu, varsayılan parametreler kullanılarak 1000 ağaçtan oluşan bir karar ormanı oluşturmak için kullanıldı.

5. BULGULAR

5.1. Klinik Bulgular

CPV enfeksiyonundan şüphelenilen yavru köpeklerdeki baskın klinik belirtiler; halsizlik, anoreksi, kanlı veya kansız ishal, kusma, taşikardi, ateşle birlikte veya ateş olmadan belirgin dehidrasyondur. 40 köpeğin tümü, başlangıçta hızlı CPV antijen tespit kiti ve ardından VP2 genini hedefleyen PCR ile doğrulandığı CPV enfeksiyonu açısından pozitif bulunmuştur (Şekil 1). Çalışmaya katılan ve CPV gastroenterit tedavisi gören bu 40 CPV pozitif yavru köpekten 30'u hayatta kaldı, 10'u ise 24-48 saat içinde öldü.



Şekil 1. Hızlı CPV antijen tespit kiti sonuçlarına iki örnek: negatif (üstte tek çizgili) ve pozitif (altta çift çizgili).

5.2. Klinik Skor

Hayatta kalanların ve ölenlerin ortalama klinik skoru, 0. ve 48. saatlerde sağlıklı kontrol grubundan önemli ölçüde ($P < 0.05$) daha yüksekti (Tablo 2 ve 3). Hayatta kalanların ortalama klinik skoru, başvurudan 72 saat sonra önemli ölçüde azaldı ($P < 0.05$), ancak değerler, ölenlerde 0 saat ile 48 saat arasında önemli ölçüde farklılık göstermedi. 48. saatte, ölenlerin ortalama klinik skoru hayatta kalanlarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde ($P < 0.05$) daha yüksekti (Tablo 2 ve 3).

Tablo 2. Klinik muayene bulguları karşılaştırılması.

Parametreler	Sağlıklı (n:10)	Hasta 0.saat (n:30)	Hasta 72. saat (n:30)	Ölen (n:10)	P Değeri
Temperatür skoru 2'inde sıcaklık <37.3 29'unda 37.4-39.4 3'ünde 39.4-39.9 6'sında 40.0-40.4	0 (0-0)b	0 (0-2)b	0 (0-0)b	0 (0-1)a	0.000
Dışkı skoru 11'inde sulu dışkı4'unde mukuslu dışkı 25'inde kanlı dışkı	0 (0-0)c	3 (2-3)a	0 (0-3)b	3 (3-3)a	0.000
Anoreksi skoru 38 inde anoreksi	0 (0-0)	1 (1-1)	0 (0-0)	1 (1-1)	-
Depresyon skoru 40'inde depresyon	0 (0-0)	1 (1-1)	0 (0-0)	1 (1-1)	-
Letarji skoru 40'ında letarji	0 (0-0)	1 (1-1)	0 (0-0)	1 (1-1)	-
Kusma skoru 40'ında kusma	0 (0-0)	1 (1-1)	0 (0-0)	1 (1-1)	-
Öksürük skoru 0	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1.000

a,b,c: Gruplararası istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Tablo 3. Klinik skor karşılaştırması.

	Sağlıklı 0. saat (n:10)	Sağlıklı 72. saat (n:30)	Hasta 0. saat (n:30)	Hasta 72. saat (n:30)	Ölen 0. saat (n:10)	Ölen 24-48. saat (n:13)
Sağlık skoru	0.730 ± 0.275a	0.650 ± 0.163a	11.225 ± 0.119b	4.975 ± 0.472c	12.121 ± 0.325c	11.1970 ± 0.462c

a,b,c: Gruplararası istatistiksel farklılığı göstermektedir.

5.3. Hematolojik Bulgular

Hematolojik parametrelerden WBC seviyesi, sağlıklı ve hasta grubun 0. ve 72. saatlerinde normal referans sınırlar içinde yer alırken ölen grupta en düşük ve referans değerinde altında bulunmuştur. Nötrofil (granülosit) seviyesi de ölen grupta önemli oranda düşük idi. Başka bir ifade ile ölen grupta lökopeni ve nötropeni gözlemlendi. MCHC seviyeleri, bütün gruplarda referans değerlerin altında bulundu. Kan pH seviyesi, istatistiksel olarak en düşük olarak bulunsada referans değerler için de kalmıştır (Tablo 4 ve 5). WBC ve nötrofil cut-off değerler kullanılarak yaşayabilirlik pozitif prediktif değerler sırayla ($<6.03 \times 10^9/L$) ve ($<1.41 \times 10^9/L$) olmuştur. Bunlar, prognostik açıdan önemli indikatörler olabilir.

Tablo 4. Kan gazları analiz sonuçları.

Parametreler	Sağlıklı (n:10)	Hasta grup 0. saat (n:30)	Hasta grup 72. saat (n:30)	Ölen grup (n:10)	P değeri
pH	7.39 (7.32-7.44)a,b	7.38 (7.29-7.47)a,b	7.40 (7.21-7.54)a	7.35 (7.23-7.46)b	0.023
pO ₂ (mmHg)	34.85 (23.1-47.2)	31.8 (20-93)	31 (21.3-59.7)	33.4 (24.8-52.1)	0.944
pCO ₂ (mmHg)	41.85 (33.3-47)	39.25 (29.8-54.9)	38.5 (30.5-48.9)	40 (29.4-64.6)	0.695
HCO ₃ (mEq/L)	22.9 (18.5-29)	22.4 (17.2-27.7)	23.4 (14.5-31.1)	21.8 (15.8-27.3)	0.089
BE (mEq/L)	-0.8 (-6.8-5.6)	-0.85 (-7.5-4)	-0.4 (-11.8-8.4)	-3.5 (-9.6-4.7)	0.125
sO ₂ (%)	57.15 (20-82.7)	49.2 (24.3-96.94)	51.25 (26.5-89.1)	55 (20-86.4)	0.753

a,b,c: Gruplararası istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Tablo 5. Hemogram analizi sonuçları.

Parametreler	Sağlıklı (n:10)	Hasta grup 0. saat (n:30)	Hasta grup 72. saat (n:30)	Ölen grup (n:10)	P değeri
WBC (×10 ⁹ /L)	13.55 (7.27-17.37)a	9.98 (1.68-41.99)a,b	10.10 (1.38-35.87)a,b	4.77 (1.09-18.33)b	0.048
Lym (×10 ⁹ /L)	4.81 (2-59.2)	4.88 (0.84-13.83)	4.71 (0.6-15.61)	2.78 (0.67-7.72)	0.112
Mon (×10 ⁹ /L)	1.79 (0.51-7.9)	1.21 (0.06-70.1)	1.07 (0.03-4.68)	0.11 (0.02-3.55)	0.545
Gra (×10 ⁹ /L)	6.01 (3.01-32.9)a	3.71 (0.27-34.31)a,b	2.96 (0.14-17.83)a,b	0.66 (0.14-7.64)b	0.053
RBC (mm ³)	5.77 (5.08-8.57)	5.98 (2.85-9.93)	5.63 (4.37-12.23)	6.93 (4.94-9.44)	0.059
MCV (µm ³)	67.55 (61.9-74.3)	66.8 (43.4-90.2)	67 (43.6-78.4)	68.8 (62.2-78.2)	0.954
MCHC (g/dl)	27.8 (15.3-43.3)a	24.45 (17.8-41.6)a,b	22.35 (10.8-29.6)b	26.4 (20.6-37.6)a	0.001
PCV (%)	37.55 (31.4-63.6)	42.15 (22.9-72.7)	38 (24-81.6)	47 (35.8-72.4)	0.074
Hb (g/dl)	11.4 (7-17.6)a,b	10.25 (6.8-16.9)b,c	8.75 (3.5-17.6)c	12.9 (9.7-18.6)a	0.000
RDW (fl)	11.4 (9.5-17.1)	11.7 (8.6-37.5)	11.55 (8.7-25.4)	11.2 (8.5-16.5)	0.683
PLT (µl)	198.5 (44-475)	172.5 (23-470)	160.5 (30-365)	203 (20-322)	0.767
MPV (fl)	10.6	11.3	10.75	10.6	0.179

	(9.1-11.9)	(7.3-12.4)	(9.4-13)	(8-11.2)	
PDW	8.15 (0-11.1)	9.9 (0-11)	9.1 (0-11.3)	8.9 (0-11.5)	0.754
PCT (%)	0.2 (0.05-0.54)	0.2 (0.02-0.53)	0.18 (0.03-0.41)	0.21 (0.02-0.33)	0.694

a,b,c: Gruplararası istatistiksel farklılığı göstermektedir.

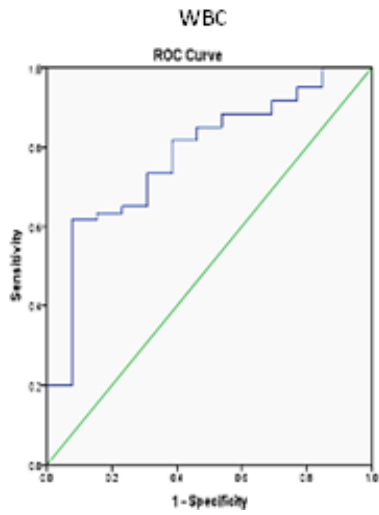
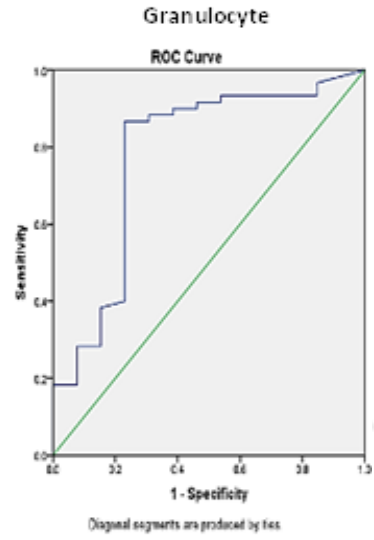
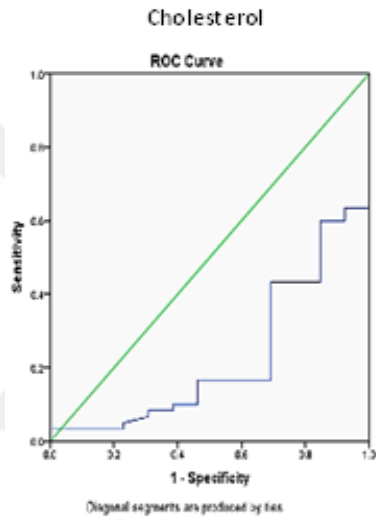
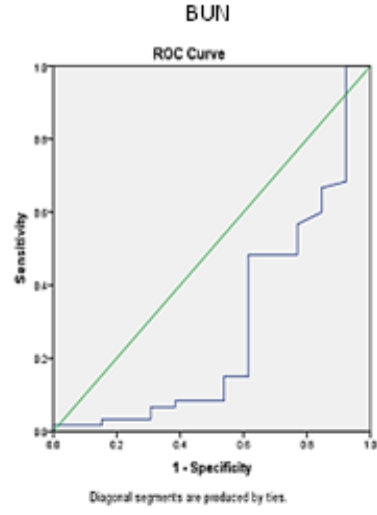
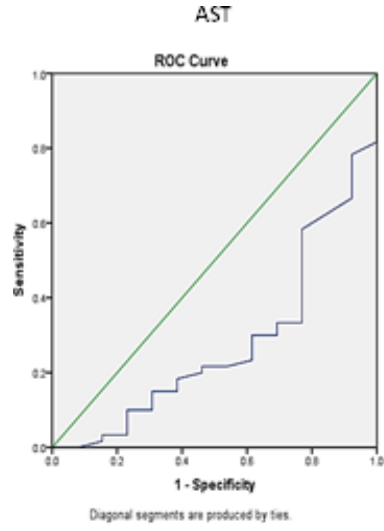
5.4. Biyokimyasal Bulgular

Biyokimyasal parametrelerden AST, BUN ve kolesterol seviyeleri, gruplar arası farklılıklarla birlikte ölen grupta en yüksek bulunmuştur. Bu parametreler de prognostik açıdan önemli olabileceği ifade edilebilir. Total protein konsantrasyonu bütün gruplarda referans değerlerin altında kalmıştır. Bu parametre, ölen grupta en yüksek olsa da bu artış relatif olabilir. Albumin, Ca, Na, ve Cl seviyelerinde gruplar arası istatistiksel farklar olsa da bunlar referans değerler arasında kalmıştır (Tablo 6). AST, BUN ve kolesterol cut-off değerler (>33 U/L, >13.35 mg/dL ve >250 (mg/dL) kullanılarak yaşayabilirlik pozitif prediktif değerler sırayla 68.9 %, 85.2% ve 74.2%, olmuştur. Bunlar da prognostik açıdan önemli indikatörler olabilir. Biyokimyasal parametrelerin ROC analizi Şekil 2.'de görülmektedir.

Tablo 6. Biyokimyasal analiz sonuçları.

Parametreler	Sağlıklı (n:10)	Hasta grup 0.saat (n:30)	Hasta grup 72. saat (n:30)	Ölen grup (n:13)	P değeri
BUN (mg/dl)	13.45 (11-86.8)a,b	13.7 (7.4-72.3)a,b	12.2 (5.1-46)b	29.4 (5-70.4)a	0.023
Kreatinin (mg/dl)	0.6 (0.4-1.3)	0.5 (0.3-1.4)	0.5 (0.3-3.7)	0.5 (0.3-2.3)	0.174
AST (U/L)	30.5 (13-43)b	30 (12-109)a,b	22 (9-73)b	44 (18-129)a	0.002
ALT (U/L)	23 (10-45)	24.5 (8-125)	17 (8-68)	28 (8-101)	0.090
ALP (U/L)	299.5 (32-790)	315.5 (129-1305)	284.5 (129-876)	326 (159-625)	0.619
GGT (U/L)	5 (4-8)	4.5 (2-10)	4.5 (2-12)	4 (2-7)	0.238
LDH (U/L)	95 (37-446)	190.5 (51-821)	152.5 (47-513)	181 (76-643)	0.139
Amilaz (U/L)	405 (275-1518)	485 (134-1852)	507 (101-3208)	522 (127- 2410)	0.511
Glukoz (mg/dl)	142 (114-193)	142.5 (22-188)	129 (22-185)	123 (66-190)	0.393
Total bil (mg/dl)	0.5 (0.3-1.2)	0.7 (0.2-2.8)	0.7 (0.2-2.8)	0.7 (0.2-1.7)	0.376
Direkt bil (mg/dl)	0.15 (0.1-0.5)	0.3 (0.1-1.5)	0.3 (0.1-1.5)	0.2 (0-1.2)	0.148
Kolesterol (mg/dl)	253.5 (187-365)a,b	248.5 (30.3-519)a,b	222 (100-385)b	337 (197-477)a	0.002
Trigliserit (mg/dl)	34 (11-121)b	59 (15-152)b	58 (20-133)b	92 (64-195)a	0.000
Total pro (g/dl)	4.55 (3.9-6.1)a	4.75 (0-6.4)a,b	3.95 (2.8-5.2)b	5.3 (3.4-6.1)a	0.002
Albumin (g/dl)	2.7 (2.2-3.3)a	2.45 (1.7-3.2)a,b	2.15 (1.4-2.9)b	2.5 (1.5-3.2)a,b	0.000
Fosfor (mg/dl)	7.75 (3.2-10.2)b	7.9 (4.3-14.2)b	7.85 (5.6-9.8)b	10.5 (4.9-13.6)a	0.004
Kalsiyum (mg/dl)	11.8 (9.7-16.5)a	10.1 (6.6-14.3)b	9.8 (7.3-14)b	10.1 (7.1-12.1)b	0.004
Magnezyum (mg/dl)	2.2 (1.5-2.4)	1.7 (1.1-2.5)	1.8 (0.9-2.5)	2 (1.6-3.1)	0.078
Potasyum (mEq/L)	3.75 (3.3-4.7)	3.8 (2.2-5.1)	3.95 (2.1-5.5)	3.3 (2-4.2)	0.121
Sodyum (mmol/l)	151.5 (148-157)a	146.5 (122-152)b	146 (140-155)b	144 (127-154)b	0.007
Klor (g/l)	111.5 (105-117)a	110.5 (83-119)a,b	110 (100-119)a	105 (84-113)b	0.011

a,b: Gruplararası istatistiksel farklılığı göstermektedir.



Şekil 2. Yaşayan ve ölen köpeklerin ayrımı için nötrofil sayısı, WBC, AST, BUN ve kolesterol ROC analizi.

5.4.1. İstatistiksel Analiz:

Tüm veriler SPSS 21.00 (Windows için SPSS) istatistik yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Tüm verilerin parametrik olup olmadığını belirlemek için bir örneklem Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Parametrik olmayan veriler, Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis testi ile medyan (min, maks) olarak sunuldu. Bir varyans kullanarak, medyanlardaki farklılıkları test ederek gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için tek yönlü ANOVA testi kullanıldı.

5.5. ELISA cTnI bulguları

Serum cTnI değerleri Diagnostic Products Corporation Immulite ELISA ile belirlendi. Kardiyak troponin (cTnI) seviyesi, gruplar arası farklı olmasa da ROC analizinde sensitivite sağlıklı grupta ölen grup arasında önemli (%85), hasta grupta ölen grup arasında orta seviyede önemli (%68.3) ve saplıkları grupta hasta grup arasında da düşük seviyede önemli (%60) bulunmuştur. Buna rağmen gruplar arası spesifisite ise düşük bulunmuştur (Tablo 7). Buna göre kardiyak troponinin sensitivitesi sağlıklıdan hastalara ve onlardan da ölüme doğru yükselmektedir. Başka çalışmalarda (Ince vd. 2019; Ince vd. 2021) da sağlıklı, hasta ve ölenler gruplar arasında cTnI seviyeleri bakımından bir fark bulunmamıştır.

Tablo 7. Kardiyak troponin düzeyinin gruplararası karşılaştırması.

Parametre	Sağlıklı Grup n:10 median (min, max)	Hasta Grup 0. saat n:30 median (min, max)	Hasta Grup 72. saat n:30 median (min, max)	Ölen Grup 0. saat n:13 median (min, max)	P değeri
Kardiyak troponin (ng/mL)	11.1 (4.53, 15.67)	11.22 (6.96, 22.98)	11.03 (0.02, 18.71)	10.35 (4.67, 26.56)	0.366

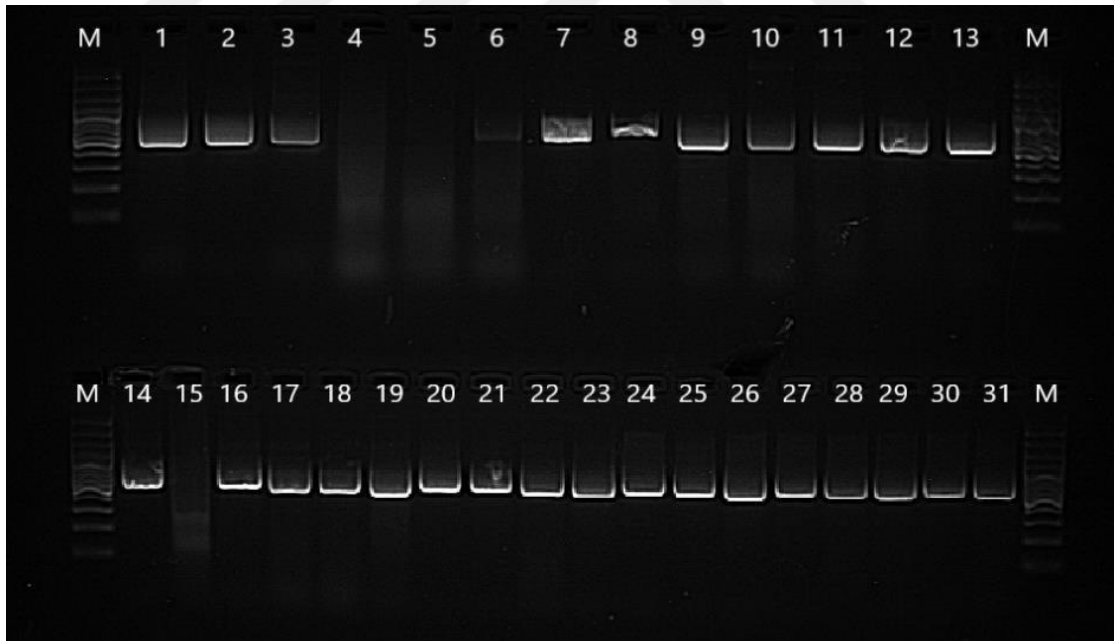
5.5.1. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 25.00 (Windows için SPSS) istatistik yazılımı kullanılarak yapıldı. Tüm verilerin parametrik veya non-parametrik olup olmadığını belirlemek için tek örneklem Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Parametrik veriler Student t-testi, varyans analizi için One-way ANOVA, Tukey ve Mann Whitney U, Kruskal-Wallis testi kullanılarak ortanca (min-max) olarak sunuldu. Hayvanların hem hastalığını teşhis etmek hem de hastaların akıbetini belirlemek için diagnostic cut-off değerlerini belirlemek için

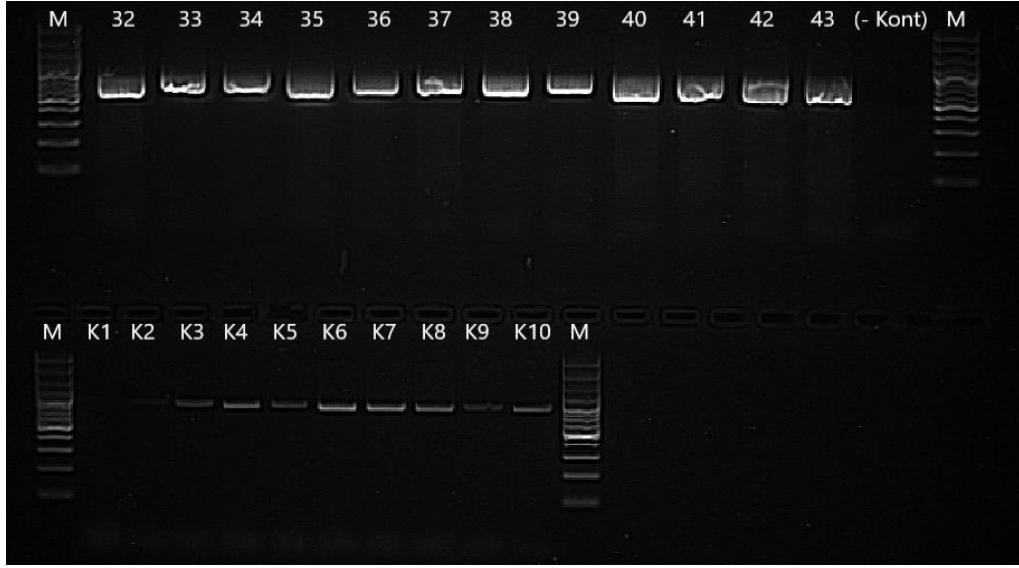
Receiver operating characteristic curve (ROC) analizi kullanıldı. ROC analizi kapsamında eğri altında kalan alan (AUC), standart hata (std.error), cut-off, sensitivite ve spesifite dikkate alınmıştır. 0,5'lik AUC değeri, ayırım olmadığını gösterir (teste dayalı olarak hastalığı veya durumu olan ve olmayan hastaları teşhis etme yeteneği gibi), 0,7 ila 0,8 kabul edilebilir olarak kabul edilir, 0,8 ila 0,9 mükemmel olarak kabul edilir ve 0,9'dan fazlası olağanüstü olarak kabul edilir (Hosmer ve Lemeshow 2000) bağırsak hasarının varlığını ve/veya hasarın ciddiyetini belirtmek için. Tüm veriler için istatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

5.6. PCR Bulguları

CPV-2 için kullanılan PCR primer çiftleri CPV-2a, 2b, 2c varyantlarını tespit edebilmektedir. Yapılan tek basamaklı Konvansiyonel PCR testinde 681bp'lık bölgede band gösteren numunelerin CPV-2 yönünden varlığı doğrulandı. Sonuç olarak, 53 örneğin (43+10) ekstraksiyon ve PCR testleri yapıldı. Toplamda 39 dışkı örneği CPV-2 yönünden (+) bulundu. 6 numaralı numune şüpheli (+)' dir (Şekil 3 ve Şekil 4).



Şekil 3. 4, 5, 15 numaralı numuneler CPV-2 yönünden (-), No 6 şüpheli, diğer örnekler (+). M: 100bp Marker.



Şekil 4. Numune no 32-43 arası (+). (-Kont): Negatif Kontrol. K1-K10 şeklinde isimlendirilmiş olan dışkı örneklerinde non-Spesifik bağlanmalar görüldü, ancak 681 bp lık bölgede band şekillenmedi. K1-K10 CPV-2 yönünden varlığı tespit edilemedi.

5.7. NMR Bulguları

5.7.1 Su Bazlı Ekstraktlar

Farklı dört grubun Sağlıklı, Hasta 0.saat, Hasta 72. saat, Ölen (S, H 0h, H 72h, Ö) tüm metabolik profillerden ayırt edilip edilemeyeceğini araştırmak için RF sınıflandırma algoritması uygulandı. Her ikili karşılaştırma için RF sınıflandırmasının sonuçları sırasıyla Şekil 5'de verilmiştir. Genel olarak, farklı gruplar arasında ayırım yapmak için son derece sağlam sınıflandırma modelleri elde ettik: S – H 0h (Doğruluk = %85), S - H 72h (Doğruluk = %80), S - Ö (Doğruluk = %91,3), H 0h - Ö (Doğruluk = %62,8), H 72h - Ö (Doğruluk = %76,7) ve H 0h – H 72 h (Doğruluk = %76,7).

Su bazlı ekstraktların tüm ¹H NOESY spektrumlarında toplam 28 metabolit kantifiye edildi (Tablo 8). Dört grup (Sağlıklı, Hasta 0 saat, Hasta 72.saat, Ölen) arasındaki metabolitlerin varyasyonlarını değerlendirmek için univariate analiz yapıldı. Tirozin, fenilalanin ve kolat sağlıklılara göre hastalarda (H 0 saat ve H 72 saat) dahayüksekti. Sitrat sağlıklılara göre diğer 3 grupta, ayrıca hastalara (H 72 saat) göre ölenlerde daha düşüktü. İzolösin de sağlıklılara göre hastalarda yüksekti (H 0 saat ve H 72 saat), fakathastalara (H 0 saat) göre ölenlerde daha düşüktü. Glikoz, fruktoz ve gliserat sağlıklılara göre diğer gruplarda daha düşüktü. Format, karnitin ve glisin, sağlıklılara göre hem hastalarda (H 0 saat) hem ölenlerde düşüktü. Glutamat, glikolat ve izovalerat hem sağlıklılarla ölenler arasında hem hastalarla (H 72 saat) ölenler arasında farklı idi. Kreatinsadece hastalara göre (H 0 saat) ölenlerde daha yüksekti (Tablo 9).

5.7.2. Lipid Bazlı Ekstraktlar

Farklı dört grubun (S, H 0 saat, H 72 saat, Ö) tüm metabolik profillerden ayırt edilip edilemeyeceğini araştırmak için RF sınıflandırma algoritması uygulandı. Her ikili karşılaştırma için RF sınıflandırmasının sonuçları sırasıyla Şekil 6'de verilmiştir. Genel olarak, farklı gruplar arasında ayırım yapmak için son derece sağlam sınıflandırma modelleri elde ettik: S – H 0 saat (Doğruluk = %87,5), S - H 72 saat (Doğruluk = %100), S - Ö (Doğruluk = %100), H 0 saat - Ö (Doğruluk) = %88,4), H 72 saat – Ö (Doğruluk = %86,1) ve H 0 saat – H 72 saat (Doğruluk = %90).

Lipid bazlı ekstraktların tüm 1H NOESY spektrumlarında toplam 17 lipid kantifiye edildi (Tablo 8). Dört grup (Sağlıklı, Hasta 0.saat, Hasta 72.saat, Ölen) arasında metabolitlerdeki varyasyonları değerlendirmek için univariate analiz yapıldı. Serbest kolesterol sağlıklılara göre diğer 3 grupta daha yüksekti. Doymuş kolesterol sağlıklılara göre hastalarda (H 72 saat) daha düşüktü. Faty acyl chain CH₂CO, sfingomyelin ve gliserol backbone C-1, H₂ C-3 H₃ sağlıklılara göre hastalarda (H 72 saat) ve ölenlerde, ayrıca hastalara (H 0 saat) göre ölenlerde daha yüksekti (Tablo 11).

Tablo 8. ^1H NMR spectroscopy ile kantifiye edilen serum metabolitleri ve lipid parametreleri. Her parametre için the mean $\pm$ standard deviation (SD) rapor edildi.

	Sağlıklı grup (n:10)	Hasta grup 0. saat (n:30)	Hasta grup 72.saat (n:30)	Ölen grup (n:13)
Metabolitler (relative intensities in arbitrary units)				
Glikoz	7.06 $\pm$ 1.21	5.36 $\pm$ 1.98	5.85 $\pm$ 2.14	5.33 $\pm$ 2.52
Mannoz	0.52 $\pm$ 0.09	0.49 $\pm$ 0.12	0.49 $\pm$ 0.15	0.56 $\pm$ 0.19
Tirozin	3.54 $\pm$ 0.43	4.35 $\pm$ 0.71	3.95 $\pm$ 0.71	3.99 $\pm$ 0.9
Fenilalanin	0.37 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.1	0.46 $\pm$ 0.17	0.47 $\pm$ 0.13
Cholate	0.03 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.09	0.1 $\pm$ 0.11	0.05 $\pm$ 0.08
2-hidrosibutirat	0.11 $\pm$ 0.15	0.14 $\pm$ 0.18	0.23 $\pm$ 0.49	0.09 $\pm$ 0.09
İzovalerasyon	0.22 $\pm$ 0.12	0.31 $\pm$ 0.16	0.32 $\pm$ 0.17	0.43 $\pm$ 0.16
Lösin	0.36 $\pm$ 0.23	0.41 $\pm$ 0.4	0.58 $\pm$ 0.73	0.53 $\pm$ 0.56
İzolösin	0.33 $\pm$ 0.38	0.87 $\pm$ 0.41	0.85 $\pm$ 0.55	0.58 $\pm$ 0.49
Valin	0.1 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.15	0.14 $\pm$ 0.16	0.17 $\pm$ 0.25
3-hidrosibutirat	0.23 $\pm$ 0.2	0.29 $\pm$ 0.4	0.32 $\pm$ 0.38	0.26 $\pm$ 0.54
Asetat	3.9 $\pm$ 0.9	3.34 $\pm$ 0.6	4.71 $\pm$ 8.28	3.66 $\pm$ 0.68
Glutamat	0.48 $\pm$ 0.37	0.28 $\pm$ 0.26	0.4 $\pm$ 0.32	0.2 $\pm$ 0.24
Piroglutamat	0.07 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.03
Sitrat	1.85 $\pm$ 1.69	0.66 $\pm$ 0.31	0.94 $\pm$ 0.38	0.66 $\pm$ 0.36
Kreatin	1.15 $\pm$ 0.66	1.53 $\pm$ 0.84	1.18 $\pm$ 0.85	2.36 $\pm$ 1.57
Kreatinin	0.97 $\pm$ 0.5	0.64 $\pm$ 0.28	0.76 $\pm$ 0.57	0.94 $\pm$ 0.67
Dimetilsülfon	0.32 $\pm$ 0.29	0.59 $\pm$ 0.47	0.49 $\pm$ 0.42	0.57 $\pm$ 0.56

Kolin	1.17±0.29	1.17±0.54	1.25±0.58	1.42±0.57
Karnitin	0.38±0.11	0.25±0.16	0.3±0.17	0.26±0.13
Betain + TMAO	22.78±15.73	21.43±13.52	18.69±9.02	19.08±10.94
Glisin	1.5±0.37	1.06±0.27	1.07±0.44	1.07±0.49
Gliserat	3±0.56	2.11±0.93	2.32±0.94	2.05±1.17
Glikolat	0.77±0.58	1.23±0.89	1±0.75	2.13±1.79
Fruktoz	3.53±0.5	3.05±0.52	3.03±0.64	2.80±0.81
Laktat	17.83±3.7	14.55±2.98	12.68±2.99	14.86±3.86
Formate	0.9±0.18	0.7±0.13	0.83±0.21	0.69±0.24
Alanin	0.3±0.14	0.34±0.14	0.33±0.24	0.52±0.52
Lipid parametreleri (relative intensities in arbitrary units)				
Total kolesterol C-18 H3	14.16±1.05	12.51 ±2.52	12.64±2.64	14.71±2.45
Yağlı asil zincir (CH ₂) _n	286.35 ±12.25	276.14±25.8	268.48±31.42	274.07±25.47
Total_kolestrol	14.15±1.03	11.83±3.39	13.01±4.13	10.77±4.52
Yağlı asil zincir -CH ₂ CH	20.79±1.67	19.19±3.86	19.35±2.93	20.69±2.79
Yağlı asil zincir -CH ₂ CO	18.59±6.45	20.31±7.5	23.78±6.34	28.07±5.41
Yağlı asil zincir CHCH ₂ CH	23.19±2.31	25.69±3.13	24.12±3.28	24.75±3.31
Fosfolipitler n(CH ₃) ₃	40.37±3.05	38.96±4.97	36.7±3.79	36.4±3.77
Serbest_kolestrol_X	2.09±0.6	2.49±0.49	2.92±0.46	2.78±0.36
Gliserol omurgası C-1 H2 C-3 H2	0.38±0.17	0.53±0.24	0.64±0.2	0.77±0.25
Esterlenmiş kolesterol C-3 H	3.43±0.25	2.68±0.85	2.87±0.63	3.14±0.53
Fosfogliseritler	5.29±0.41	5.28±0.47	5.02±0.53	4.89±0.5
Yağlı asil zincir -HC=CH-	42.65±2.42	44.04±4.77	42.59±5.1	44.23±5.27
Sfingomiyelin_CH=CH	0.68±0.11	0.77±0.23	0.92±0.15	0.89±0.14
Serbest kolesterol C-3 H	0.24±0.13	0.34±0.23	0.43±0.34	0.37±0.21
Total kolesterol C-26 H3 C-27 H3	10.72±0.9	9.48±2.03	9.78±2.21	11.16±1.84
Yağlı asil zincir CH ₃ (CH ₂) _n	2.26±0.32	2.28±0.42	2.32±0.38	2.22±0.21
Esterlenmiş kolesterol C-19 H3	1.35±0.09	1.11±0.23	1.13±0.26	1.22±0.22

Tablo 9. Univariate analizi, dört grup arasında lipid varyasyonları incelemek için yapıldı. İstatistiksel önemli P-değerleri (< 0.05) koyu gösterildi.

	S vs H0.saatt)	S vs H72.saatt	S vs Ö	H0.saatt vs Ö	H72.saatt vs Ö
Glikoz	0.01	0.02	0.02	0.76	0.30
Mannoz	0.56	0.47	0.74	0.36	0.31
Tirozin	0.001	0.01	0.09	0.47	0.59
Fenilalanin	0.006	0.04	0.07	0.70	0.59
Cholate	0.20	0.04	0.75	0.37	0.08
2-hidrosibutirat	0.84	0.74	0.90	0.62	0.58
Izovalerasyon	0.14	0.05	0.004	0.05	0.03
Lösin	0.93	0.58	0.90	0.96	0.62
İzolösin	0.002	0.006	0.15	0.04	0.17
Valin	0.10	0.65	0.27	0.42	0.70
3-hidrosibutirat	0.61	0.87	0.28	0.36	0.06
Asetat	0.13	0.07	0.60	0.16	0.15
Glutamat	0.11	0.62	0.04	0.20	0.03
Piroglutamat	0.67	0.61	0.31	0.26	0.42
Sitrat	0.0006	0.01	0.002	0.78	0.03
Kreatin	0.07	0.79	0.06	0.14	0.01
Kreatinin	0.04	0.16	0.65	0.21	0.38
Dimetilsülfon	0.09	0.31	0.25	0.56	0.79
Kolin	0.91	0.82	0.31	0.12	0.39
Karnitin	0.009	0.09	0.01	0.88	0.36
Betain + TMAO	0.96	0.72	0.56	0.28	0.82
Glisin	0.002	0.012	0.01	0.70	0.74
Gliserat	0.002	0.005	0.008	0.74	0.32
Glikolat	0.06	0.41	0.04	0.16	0.04
Fruktoz	0.02	0.03	0.003	0.12	0.18
Laktat	0.03	3.29E-05	0.10	0.88	0.11
Formate	0.003	0.29	0.04	0.30	0.05
Alanin	0.61	0.64	0.29	0.44	0.10

S: Sağlıklı, H: Hasta, Ö: Ölen

Tablo 10. Pairwise univariate analizi, hasta grubun 0 ve 72. saatleri arasında metabolitlerin varyasyonlarını incelemek için yapıldı. İstatistiksel önemli P-değerleri (< 0.05) koyu gösterildi.

	H (0 Saat) vs H (72 Saat)
Glikoz	0.26
Mannoz	0.78
Tirozin	0.03
Fenilalanin	0.42
Cholate	0.09
2-hidrosibutirat	0.27
Izovalerasyon	0.92
Lösin	0.38
İzolösin	0.93
Valin	0.35
3-hidrosibutirat	0.28
Asetat	0.76
Glutamat	0.13
Piroglutamat	0.96
Sitrat	0.004
Kreatin	0.06
Kreatinin	0.28
Dimetilsülfon	0.41
Kolin	0.54
Karnitin	0.19
Betain + TMAO	0.98
Glisin	0.52
Gliserat	0.34
Glikolat	0.15
Fruktoz	0.72
Laktat	0.02
Formate	0.01
Alanin	0.23

H:hasta

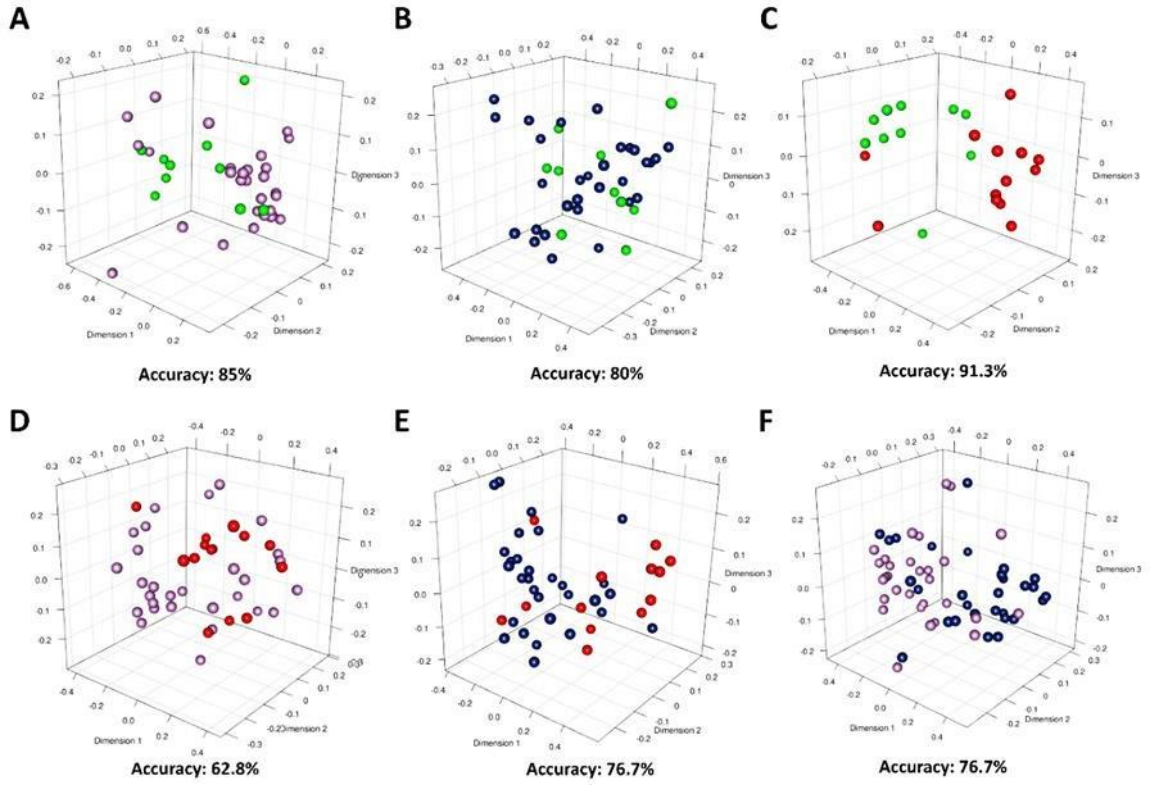
Tablo 11. Univariante analizi, dört grup arasında lipid varyasyonları incelemek için yapıldı. İstatistiksel önemli P-değerleri (< 0.05) koyu gösterildi.

	SvsH (0.saat)	S vs H (72.saat)	S vs Ö	H(0.saat) vs Ö	H (72.saat) vs Ö
Total kolesterol C-18 H3	0.07	0.15	0.21	0.007	0.02
Yağlı asil zincir (CH ₂) _n	0.35	0.05	0.23	0.50	0.76
Total_kolestrol	0.06	0.38	0.07	0.32	0.12
Yağlı asil zincir -CH ₂ CH	0.19	0.21	0.83	0.12	0.09
Yağlı asil zincir -CH ₂ CO	0.35	0.03	0.001	0.0007	0.03
Yağlı asil zincir CHCH ₂ CH	0.04	0.21	0.31	0.57	0.66
Fosfolipitler n(CH ₃) ₃	0.38	0.002	0.006	0.05	0.74
Serbest_kolestrol_X	0.04	0.0001	0.003	0.12	0.42
Gliserol omurgası C-1 H2 C-3 H2	0.10	0.0002	0.0003	0.02	0.12
Esterlenmiş kolesterol C-3 H	0.0009	0.02	0.19	0.14	0.23
Fosfogliseritler	0.84	0.18	0.13	0.005	0.47
Yağlı asil zincir -HC=CH-	0.29	0.75	0.21	0.80	0.24
Sfingomiyelin_CH=CH	0.33	0.0002	0.001	0.01	0.40
Serbest kolesterol C-3 H	0.21	0.15	0.23	0.67	0.96
Total kolestrol C-26 H3 C-27 H3	0.13	0.27	0.31	0.02	0.06
Yağlı asil zincir CH ₃ (CH ₂) _n	0.99	0.23	0.83	0.82	0.26
Esterlenmiş kolesterol C-19 H3	0.001	0.03	0.21	0.28	0.46

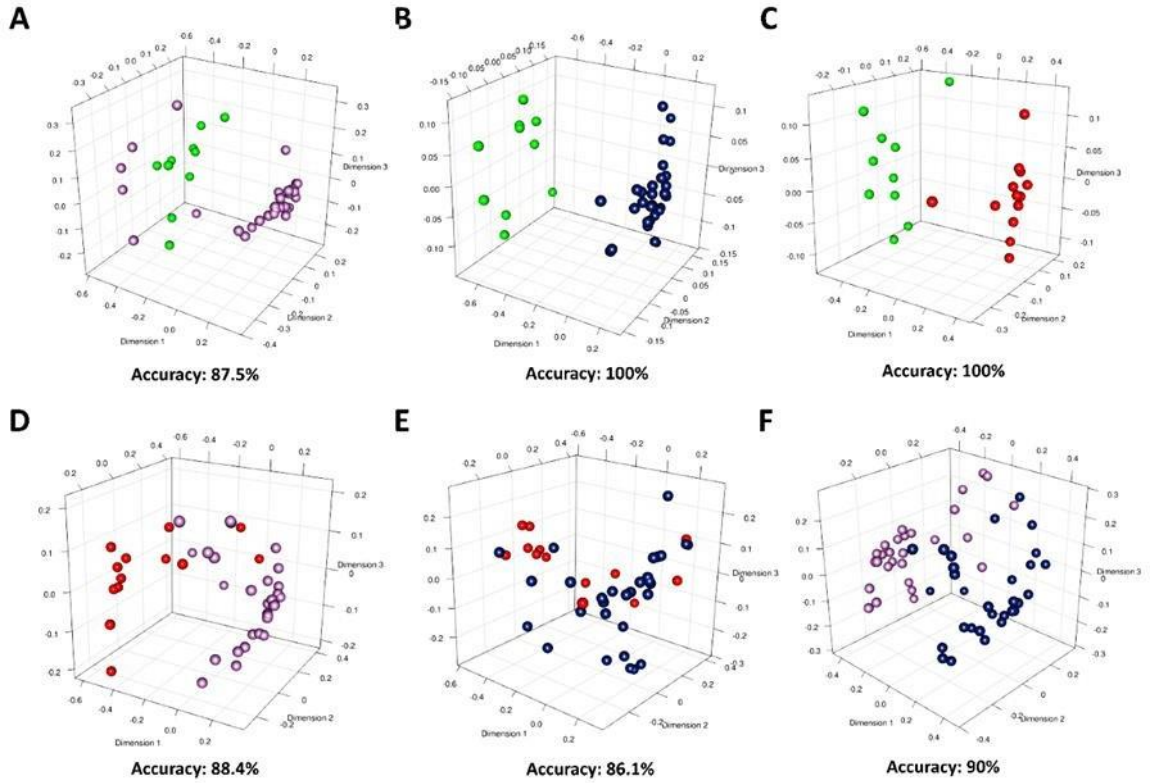
S: sağlıklı, H: hasta, Ö:ölen

Tablo 12. Pairwise univariate analizi, hasta grubun 0 ve 72. saatleri arasındaki lipid varyasyonlarını incelemek için yapıldı. İstatistiksel önemli P-değerleri (< 0.05) koyu gösterildi.

	H 0 saat vs H 72 saat
Total kolesterol C-18 H3	0.84
Yağlı asil zincir (CH ₂) _n	0.15
Total_kolestrol	0.33
Yağlı asil zincir -CH ₂ CH	0.83
Yağlı asil zincir -CH ₂ CO	0.09
Yağlı asil zincir CHCH ₂ CH	0.15
Fosfolipitler n(CH ₃) ₃	0.02
Serbest_kolestrol_X	0.002
Gliserol omurgasıC-1 H2 C-3 H2	0.12
Esterlenmiş kolesterol C-3 H	0.64
Fosfogliseritler	0.009
Yağlı asil zincir -HC=CH-	0.31
Sfingomiyelin_CH=CH	0.0001
Serbest kolesterol C-3 H	0.49
Total kolesterol C-26 H3 C-27 H3	0.58
Yağlı asil zincir CH ₃ (CH ₂) _n	0.43
Esterlenmiş kolesterol C-19 H3	0.69



Şekil 5. Random Forest (RF) modeli puan grafikleri. Her nokta, farklı gruplar tarafından renklendirilen tek bir su bazlı serum metabolik profilini temsil eder: A) S (yeşil noktalar) - H 0h (mor noktalar) grupları; B) S (yeşil noktalar) ve H 72h (mavi noktalar) grupları; C) S (yeşil noktalar) - Ö (kırmızı noktalar) grupları; D) H 0h (mor noktalar) - Ö (kırmızı noktalar) grupları; E) H 72h (mavi noktalar) ve Ö (kırmızı noktalar) grupları; F) H 0h (mor noktalar) ve H 72h (mavi noktalar) grupları. Gerçekleştirilen her RF modeli için ayırım doğruluğu da rapor edildi.

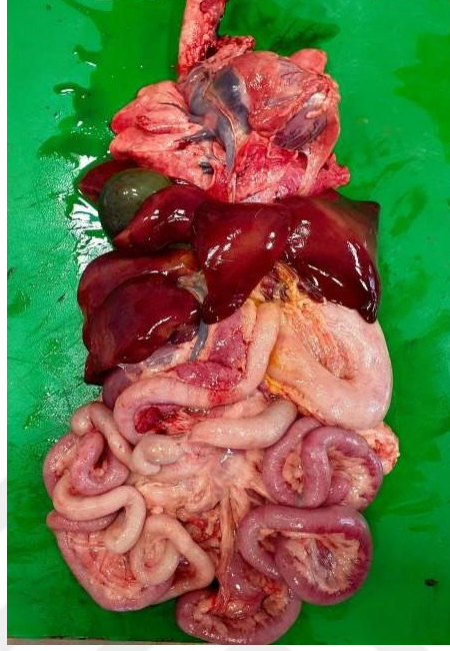


Şekil 6. Random Forest (RF) modeli puan grafikleri. Her nokta, farklı gruplar tarafından renklendirilen tek bir lipid çözünür serum lipid profilini temsil eder: A) S (yeşil noktalar) - H 0h (mor noktalar) grupları; B) S (yeşil noktalar) ve H 72h (mavi noktalar) grupları; C) S (yeşil noktalar) - Ö (kırmızı noktalar) grupları; D) H 0h (mor noktalar) - Ö (kırmızı noktalar) grupları; E) H 72h (mavi noktalar) ve Ö (kırmızı noktalar) grupları; F) H 0h (mor noktalar) ve H 72h (mavi noktalar) grupları. Gerçekleştirilen her RF modeli için ayırım doğruluğu da rapor edildi.

5.8. Patolojik Bulgular

Farklı saat dilimlerinde ölümü gerçekleşen hastaların nekropsileri yapıldı. Makroskopik incelemede nekropsi bulguları bu hayvanlarda çoklu organ yetmezliğini işaret ediyordu (Şekil 7). Trakeada köpüklü bir sıvı gözlemlendi. Akciğerlerin konjesyone olduğu ve kesit yüzünden köpüklü bir sıvı sızdığı görüldü. Kalpte ventriküllerde pıhtılaşmış kan belirlendi ve epikartta değişen derecelerde solgun alanlara rastlandı (Şekil 8 ve Şekil 19). Karaciğerler konjesyone, kenarlar küt ve hacimce büyümüş olarak gözlenirken yüzeyinde yer yer solgun alanlar belirlendi (Şekil 10). Mide kıvrımlarının kalınlaştığı ve mukozasının hiperemik olduğu saptandı ve bazı vakalarda hafif şiddette gastrit tablosu gözlemlendi. Bağırsaklarda, duodenum ve jejunumda fibrinli, ileum ve sekumda ise hemorajik enterit tablosu gözlemlendi (Şekil

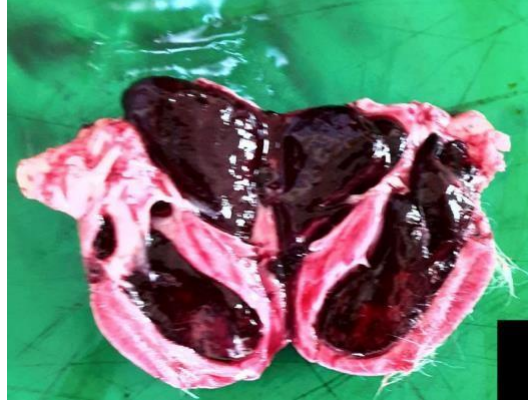
11). İleum ve sekumdaki Peyer plaklarının belirginleştığı saptandı. Böbreklersolgun, hacimce büyümüş idi (Şekil 12).



Şekil 7. İç organlar.



Şekil 8. Kalp dıştan görüntü.



Şekil 9. Kalp içten görüntü.



Şekil 10. Karaciğer.



Şekil 11. Bağırsaklar.



Şekil 12. Böbrekler.

6. TARTIŞMA

Köpek parvovirüsü yavru köpeklerde hemorajik enterit, lökopeni, sepsis ve kalp hastalığına neden olan bulaşıcı bir hastalıktır. CPV enteritinin öyküsü, sunumu ve klinik faktörlerin yanı sıra bazı hematolojik, biyokimyasal ve endokrin parametreler de tanısal ve tanısal biyobelirteçler olarak kullanılabilir (Schoeman ve ark 2013). Fizik muayene, hasta öyküsü, doktorun şüphe değerlendirmesi ve diğer tanısal testler destekleyici olabilir ancak CPV enfeksiyonunun tanısını koymayabilir. Parvovirüs enteritinin en yaygın klinik belirtileri uyuşukluk, anoreksi, kusma ve ishaldir. Fizik muayenede mukozal solukluk, kılcıl damar dolumunda gecikme, ateş veya hipotermi, karın ağrısı saptanabilir (Rallis ve ark 2000; Faz ve ark 2019). Ayrıca belirtilerin varlığı, şiddeti ve hastaneye yatış süresi de tahmin edilmektedir (Kalli ve ark 2010). Bu çalışmadaki klinik bulgular yukarıda belirtilenlerle tutarlıdır.

Hipoalbuminemi ve hipokolesterolemi gibi biyokimyasal parametreler, CPV enteritinin tanısal ve prognostik biyobelirteçleri olarak kullanılabilir (Mylonakis ve ark 2016, Schoeman ve ark 2013). Daha da önemlisi, CPV sonuçlarının doğruluk tahmini, antitrombin, serum AST ve serum lipaz gibi otomatik değişkenlerin seçimine dayanıyordu ve Franzo ve ark. (2020) tarafından da bildirildiği gibi sonuçlar çok iyiydi. İncelenen çeşitli biyokimyasal parametreler arasında, ölenlerde, incelenen diğer gruplarla karşılaştırıldığında dikkate değer derecede yüksek AST, BUN ve kolesterol seviyeleri sergilendi. Bu parametrelerin sonuçların tahmin edilmesinde önemli bir rol oynadığı varsayılmaktadır. Sonuçlar, 33 U/L'nin üzerindeki AST seviyelerinin, 13,35 mg/dL'yi aşan BUN seviyelerinin ve 250 mg/dL'nin üzerindeki kolesterol seviyelerinin CPV sonuçlarını tahmin etmede makul göstergeler olabileceğini göstermektedir. ROC eğrisi analizinden duyarlılık (%), özgüllük (%) ve pozitif öngörü değeri (%) kullanılarak yapılan ileri analiz, kandaki BUN konsantrasyonunun bu açıdan en etkili biyobelirteç olduğu sonucuna varılmıştır.

Kardiyak troponin (cTnI) ölçümü klinik çalışmalarda faydalıdır (Oikonomidis ve ark 2023). Diğer çalışmalarda (İnce ve ark 2019, İnce ve ark 2021) sağlıklı, hasta ve ölü köpekler arasında cTnI düzeyleri açısından bir fark bulunmamıştır. Bu çalışmada cTnI düzeyleri, gruplar arasında farklılık göstermedi.

Fonksiyonel bir model olarak metabolomik, mikrop-konakçı etkileşimlerinin klinik yönlerini tahmin edebilir (Bueno 2022). Enflamasyonun, enflamatuvar metabolitlerin ve lipitlerin bulaşıcı hastalıklardaki rolünün anlaşılmasında ilerleme

kaydedilmiştir (Tounta ve ark 2021). Metabolomik, idiyopatik hayvan hastalıklarının araştırılmasında biyobelirteç keşfini kolaylaştırmak ve hastalık patogenezi ile ilişkin anlayışımızı geliştirmek için büyük bir potansiyele sahiptir (Tran ve ark 2020). Sepsis, morbidite ve mortalite ile ilişkili karmaşık bir tanı ve tedavi alanıdır. Parvovirüs enteriti, bağırsak enfeksiyonunu ve şiddetli bağışıklık tepkilerini teşvik ettiğinden sepsis için önemlidir (Alves ve ark 2020). CPV ile enfekte köpeklerin metabolik ve lipidomik profilleri, metabolik değişiklikleri tanımlayabilir ve konakçının enfeksiyona tepkisi hakkında önemli bilgiler sağlayabilir (Montague 2022). Bu çalışmada, enfekte olmuş hasta ve ölen köpeklerde, sağlıklı grupla karşılaştırıldığında daha düşük glikoz, früktoz, sitrat, glutamik asit, ve gliserik asit seviyeleri vardı. TCA döngüsü enfeksiyon ve replikasyonun yanı sıra enfeksiyon ve bağışıklığın da merkezinde yer alır. Viral replikasyon glukoz, glutamin TCA döngülerine bağlıdır (Mayer ve ark 2019). Enfeksiyon konakçıda hastalığa neden olabilir ve TCA döngüsünün metabolik ara maddeleri, özellikle sitrat ve süksinat bu sürece dahil olur (Sánchez-García ve ark 2021). Sitrat ayrıca karbonhidrat ve yağ asidi metabolizması ile de ilgilidir (Williams ve O'Neill 2018). Yağ asidi sentezi, virüsün girişini, gen ekspresyonunu ve replikasyonunu, toplanmasını ve enfekte olmuş hücrelerden salınmasını kolaylaştırdığından virüsün yaşam döngüsü için önemlidir (Chukkapalli ve ark 2012). Bu çalışmada sitrat suda çözünür serum ekstraktında tespit edilen en dikkat çekici metabolit olmuştur. Hastalarda ve ölenlerde sağlıklı gruba kıyasla ve ayrıca ölenlerde 72. saatte hastalara göre daha düşük bir konsantrasyon seviyesine sahiptir.

Hayvanlarda izolösin, nötrofillerin ve lenfositlerin büyüme regülasyonu, konağın doğal ve adaptif bağışıklığını düzenleyebilen konak savunma peptitlerinin ekspresyonu ve antikorların salınması dahil olmak üzere bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynar (Rivas ve ark 2011, Gong ve ark 2016, Gu ve ark 2019). Diyetteki L- izolösin büyümeyi ve bağışıklığı geliştirebilir; bu, L-izolösin tedavisinin vücudu iyileştirmesi ve bağışıklık sistemini domuz rotavirüsündeki Model Tanıma Reseptörleri (PRR'ler) sinyal yolunu aktive edecek şekilde değiştirmesinden kaynaklanabilir (Mao ve ark 2018). Bu çalışmada izolösin, hastalarda sağlıklı gruba kıyasla, ölenlerde sağlıklı gruba kıyasla ve ayrıca 0. saatte hastalara göre ölenlerde daha yüksek seviyelere sahip olma eğilimindedir.

Format, tek karbon metabolizması bozukluklarıyla ilişkili bazı hastalıklarda rol oynayabileceğine inanılan toksik bir moleküldür (Lamarre ve ark 2013). Mevcut durumda, format 0. saatte hastalarda ve ölenlerde sağlıklılarla karşılaştırıldığında düşük olduğu bulundu.

Fenilalanin metabolizmasındaki değişiklikler, akut böbrek hasarının neden olduğu sepsis ile ilişkilidir. Sepsisteki çoklu omik ağdaki ana değişiklikler; inflamatuvar yanıt, trombosit degranülasyonu, bağışıklık sistemindeki miyeloid aktivasyonu, fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi ve arginin biyosentezidir. Ayrıca 3- hidroksibutirilkarbitin ve L-heksanoilkarbitin gibi enerji metabolizması olan bazı yağ asitleri lipid sinyal iletiminde önemli rol oynar (Chen ve ark 2022). Bu çalışmada hastalarda fenilalanin ve tirozin düzeyleri 0. ve 72. saatlerde arttı. İstatistiksel bir fark olmasa da bunlar ölenlerde de yüksekti.

Karbitin, enerji üretimine ve yağ asitlerinin metabolizmasına yardımcı olan önemli bir besindir. Karbitin eksikliği, karbitinin anormal düzenlenmesi nedeniyle endokrin hastalıklarına, kardiyomiyopatiye, şeker hastalığına, yetersiz beslenmeye, yaşlanmaya, mide ağrısına, karaciğer sirozuna vb. neden olabilir. Klinisyenler, tiamin eksikliği riski taşıyan tüm sepsis hastalarında tiamin kullanımını, septik şok hastalarında ise L-karbitin ve C vitamini kullanımını değerlendirebilir (Belsky ve ark 2018, Alhasaniah 2023). Karbitin, enerji üretimine ve yağ asidi metabolizmasına yardımcı olan önemli bir temel besindir. Bu çalışmada 0. saatte hastalarda ve ölenlerde karbitinin düşük olduğu bulundu.

Glisin'in inhibitör nörotransmitter fonksiyonu özellikle retina, beyin ve omurilikte önemlidir. Bu rolde iyonotropik glisin reseptörlerini aktive ederek, klorür iyonlarının girişini kolaylaştırarak ve böylece nöronal membranları hiperpolarize ederek çalışır (Rusakov 2018). Kanıtlar, glisinin basit ve karmaşık hastalıklarda yaşamı uzatabilen ve sağlığı iyileştirebilen gerontolojik bir ajan olduğunu göstermektedir (Johnson ve Cuellar 2023). Bu çalışmada 0. saatte hastalarda ve ölenlerde glisinin düşük olduğu bulundu.

Enfeksiyöz ensefalomiyelit sırasındaki nöronal hasar, doğrudan enfeksiyöz ajandan veya dolaylı olarak konağın bağışıklık sisteminden kaynaklanabilir. Glutamat gibi uyarıcı amino asit nörotransmitterlerinin aşırı salınımı, nörodejeneratif hastalıklarda ve felçte nöron ölümüne de katkıda bulunabilir. Nöroadaptif Sindbis virüsü, anormal glutamat reseptörü uyarımına ve nöronal hasara yol açan nörotoksik yolları aktive eder (Nargi-Aizenman ve ark 2004). Önceki çalışmalar, nötrofillerin

glutamat reseptörlerini eksprese ettiğini ve bu hücrelerin glutamatı serbest bırakabildiğini bildirmişti, ancak doğrudan nötrofil-nötrofil iletişimine dair kanıtlar zordu (Kopach vd, 2017). Bu çalışmada, sağlıklı ve hasta 72. saatte karşılaştırıldığında ölenlerde glutamatın düşük olduğu bulundu.

Yukarıda bahsedilen suda çözünür spektral bilgilerin tamamı kullanılarak, farklı gruplar arasında ayırım yapmaya yönelik sağlam sınıflandırma modelleri elde edildi; bu da CPV enfeksiyonun köpek metabolomunu önemli ölçüde etkilediğini ortaya koydu.

Fosfolipidler biyolojik sistemlerin önemli bileşenleridir. Fosfolipidlerin yağ asil zinciri bileşimi, membranların biyofiziksel özelliklerini belirler ve biyolojik süreçler üzerindeki etkilerini etkiler (Wang ve Tontonoz 2019). Gliserofosfolipitler, hücre zarlarının lipid bariyerinin çoğunu oluşturan fosfogliseritlerdir (Opgenorth vd. 2020). Hücre zarlarındaki fizyolojik serbest kolesterol/fosfolipit oranları, zar akışkanlığının korunması için gereklidir (Jacobo-Alvera ve ark 2021). Hedeflenmemiş lipidomik analiz, sepsisli köpeklerde farklı tipteki sfingomiyelinler, lisofosfatidilkolin molekülleri ve lipofosfoserin moleküllerinin farklı olduğunu göstermektedir (Montague ve ark 2022). Sfingomiyelin ve asit sfingomiyelinaz, çeşitli virüslerin (yani adenovirüs, Ebola virüsü, rinovirüs ve parvovirüs) neden olduğu enfeksiyonları azaltabilir. (Pakkanen 2009, Pastenkos ve ark. 2019, Avota ve ark 2021).

Bu çalışmada 72. saatte hastalarda ve ölenlerde sfingomiyelin düzeyinin sağlıklı gruba göre daha yüksek olduğu, ayrıca 0. saatte hastalara göre ölenlerde daha yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca yağ asil zinciri CH_2CO , gliserol omurgası C-1 H₂ C-3 H₃ ve serbest kolesterol de hastalarda ve ölenlerde daha yüksekti. Ölenlerde fosfogliseridler ve fosfolipidlerin $(CH_3)_3$ de azalmıştır.

Yukarıda bahsedilen lipitte çözünen parametreler prognostik değere sahip olabilir ve CPV'de sonucun uygun bir öngörücüsü olabilir.

Suda çözünen spektrumlar için bildirildiği gibi, yağda çözünen spektrumlar içinde farklı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ve sağlam bir ayırım doğruluğu vardır. Bütün bunlar, çalışmada ele alınan köpeklerin farklı patofizyolojik koşullarında metabolomun nasıl büyük ölçüde değiştiğini bir kez daha vurgulamaktadır.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu projede, parvoviral enteris gibi ölümcül bir köpek hastalığında yaşayabilirlik öngörüsü için klinik, labaratuvar, patolojik ve ilk defa NMR bazlı metabolomik ölçümler ve değerlendirmeler yapılmıştır. NMR bazlı metabolomikler dışındaki bulgular yaklaşık benzerlikler ve farklılıklar gözlense de NMR bazlı suda ve yağda eriyen metabolitlerin genel olarak değerlendirilmesi ile önemli enerji açığı ve buna bağlı yağ mobilizasyonunun gerçekleştiği, hücre membran koruyuculuğu eksikliği, karaciğer yetmezliği başta olmak üzere çoklu organ yetmezliğinin geliştiği ifade edilebilir. Hastalarda karbonhidrat metabolizmasını doğrudan ilgilendiren glikoz, fruktoz, sitrat, karnitin, format glisin ve gliserat seviyelerinde azalma ile kreatin seviyesinde artış; yağ metabolizması ile ilgili total ve serbest kolesterol ile yağ asitleri, sfingomiyelin seviyelerinde artış ve doymuş kolesterol, fosfoglisid, seviyelerinde azalış, yaşayabilme öngörüsünde değerli olabilir. Kritik hastalıklarda yaşayabilirlik öngörüsünde NMR bazlı ölçümler önemli olmaktadır.

CPV'li kritik ve ölümcül hastaların prognostik değerlendirilmesinde NMR bazlı metabolomik analizlere yer verilebilir.

8. KAYNAKLAR

- Alhasaniah AH, 2023. l-carnitine: Nutrition, pathology, and health benefits. *Saudi J Biol Sci*, 30, 1035-55.
- Alhasaniah AH, 2023. l-carnitine: Nutrition, pathology, and health benefits. *Saudi J Biol Sci*, 30, 103555.
- Allukian AR, Abelson AL, Babyak J, Rozanski EA, 2017. Comparison of time to obtain intraosseous versus jugular venous catheterization on canine cadavers. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 27, 506–11.
- Alves F, Prata S, Nunes T, Gomes J, Aguiar S, Aires da Silva F, Tavares L, Almeida V, Gil S, 2020. Canine parvovirus: a predicting canine model for sepsis. *BMC veterinary research*, 16, 1-11.
- Alves F, Prata S, Nunes T, Gomes J, Aguiar S, Aires da Silva F, Tavares L, Almeida V, Gil S, 2020. Canine parvovirus: a predicting canine model for sepsis. *BMC Vet Res*, 15, 16, 199.
- Apple FS, Murakami MM, Ler R, Walker D, York M, 2008. HESI Technical Committee of Biomarkers Working Group on Cardiac Troponins. Analytical characteristics of commercial cardiac troponin I and T immunoassays in serum from rats, dogs, and monkeys with induced acute myocardial injury. *Clinical chemistry*, 54, 1982-89.
- Avota E, Bodem J, Chithelen J, Mandasari P, Beyersdorf N, Schneider-Schaulies J, 2021. The Manifold Roles of Sphingolipids in Viral Infections. *Front Physiol*, 29,12,715527.
- Aydın Ö, Kırbaş A, 2021. Köpeklerin parvovirüs enfeksiyonunda tedavi uygulamalarına güncel yaklaşım. *Bozok Veterinary Science*, 2(2), 62-72.
- Azad AK, Hakim A, Sohag MM, Rahman, M, 2023. Metabolomics in clinical diagnosis, prognosis, and treatment of infectious diseases. In *Metabolomics*, 71-19.
- Basoglu A, Baspinar N, Tenori L, Licari C, Gulersoy E, 2020. Nuclear magnetic resonance (NMR)- based metabolome profile evaluation in dairy cows with and without displaced abomasum. *Veterinary Quarterly*, 40, 1-15.
- Basoglu A, Baspinar N, Tenori L, Vignoli A, Gulersoy E, 2017. Effects of boron supplementation on peripartum dairy cows' health. *Biological trace element research*, 179, 218-25.
- Basoglu A, Baspinar N, Tenori L, Vignoli A, Yildiz R, 2016. Plasma metabolomics in calves with acute bronchopneumonia. *Metabolomics*, 12, 1-10.
- Basoglu A, Sen I, Meoni G, Tenori L, Naseri A, 2018. NMR-Based Plasma Metabolomics at Set Intervals in Newborn Dairy Calves with Severe Sepsis. *Mediators Inflamm*, 21, 8016510.
- Belsky JB, Wira CR, Jacob V, Sather JE, Lee PJ, 2018. A review of micronutrients in sepsis: the role of thiamine, L-carnitine, vitamin C, selenium and vitamin D. *Nutrition Research Reviews*, 31, 281–9.
- Belsky JB, Wira CR, Jacob V, Sather JE, Lee PJ, 2018. A review of micronutrients in sepsis: the role of thiamine, l-carnitine, vitamin C, selenium and vitamin D. *Nutr Res Rev*, 31, 281- 90.
- Brady S, Norris JM, Kelman M, Ward MP, 2012. Canine parvovirus in Australia: the role of socio- economic factors in disease clusters. *Vet J*, 193, 522-28.
- Bragg RF, Duffy AL, DeCecco FA, Chung DK, Green MT, Veir JK, Dow SW, 2012. Clinical evaluation of a single dose of immune plasma for treatment of canine parvovirus infection. *J Am Vet Med Assoc*, 240, 700–4.
- Brunner C J, Swango LJ, 1985. Canine parvovirus infection: effects on the immune system and factors that predispose to severe disease. *Comp Cont Educ Pract*, 7, 979–88.
- Bueno j, 2021. Metabolimics of infection disease. In: *Encyclopedia Infection and Immunity*, Ed: Razei N, Elsevier p. 387-97.
- Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J Gen Virol*, 82, 3021–25.
- Buyukozkan M, Alvarez-Mulett S, Racanelli AC, Schmidt F, Batra R, Hoffman KL, Sarwath H, Engelke R, Gomez-Escobar L, Simmons W, Benedetti E, Chetnik K, Zhang G, Schenck E, Suhre

- K, Choi J J, Zhao Z, Racine-Brzostek S, Yang HS, Mary E, Choi ME, Krumsiek J, 2022. Integrative metabolomic and proteomic signatures define clinical outcomes in severe COVID- 19. *iScience*, 25, 7, 104612
- Castro TX, Cubel Garcia RdeC, Gonçalves LP, Costa EM, Marcello GC, Labarthe NV, Mendes-de- Almeida F, 2013. Clinical, hematological, and biochemical findings in puppies with coronavirus and parvovirus enteritis. *Can Vet J*, 54(9), 885–88.
- Chen Q, Liang X, Wu T, Jiang J, Jiang Y, Zhang S, Ruan Y, Zhang H, Zhang C, Chen P, Lv Y, Xin J, Shi D, Chen X, Li J, Xu YJ, 2022. Integrative analysis of metabolomics and proteomics reveals amino acid metabolism disorder in sepsis. *Transl Med*, 14, 20, 123.
- Chen Q, Liang X, Wu T, Jiang J, Jiang Y, Zhang S, Ruan Y, Zhang H, Zhang C, Chen P, Lv Y, Xin J, Shi D, Chen X, Li J, Xu Y, 2022. Integrative analysis of metabolomics and proteomics reveals amino acid metabolism disorder in sepsis. *J Transl Med*, 14, 20(1), 123.
- Chih A, Rudloff E, Waldner C, Linklater AKJ, 2018. Incidence of hypochloremic metabolic alkalosis in dogs and cats with and without nasogastric tubes over a period of up to 36 hours in the intensive care unit. *J Vet Emerg Crit Care*, 28, 244–51.
- Chukkapalli V, Heaton NS, Randall G, 2012. Lipids at the interface of virus-host interactions. *Curr Opin Microbiol*, 15(4), 512-8.
- Cohn LA, Kerl ME, Lenox CE, Livingston RS, Dodam JR, 2007. Response of healthy dogs to infusions of human serum albumin. *Am J Vet Res*, 68, 657–63.
- Cohn LA, Rewerts JM, McCaw D, Boon GD, Wagner-Mann C, Lothrop CD Jr, 1999. Plasma granulocyte colony-stimulating factor concentrations in neutropenic, parvoviral enteritis-infected puppies. *J Vet Intern Med*, 13(6), 581–6.
- Danlos FX, Iglesias CG, Durand S, Sauvat A, Roumier M, Cantin D, Colomba E, Rohmer J, Pommeret F, Baciarello G, Willekens C, Vasse M, Griscelli F, Fahrner JE, Goubet AG, Dubuisson A, Derosa L, Nirmalathasan N, Bredel D, Mouraud S, Pradon C, Stoclin A, Rozenberg F, Duchemin J, Jourdi G, Syrine Ellouze S, Levavasseur F, Albigès L, Soria JC, Barlesi F, Solary E, André F, Pène F, Ackerman F, Mouthon L, Zitvogel L, Marabelle A, Michot JM, Fontenay M, Kroemer G, 2021. Metabolomic analyses of COVID-19 patients unravel stage-dependent and prognostic biomarkers. *Cell Death and Dis*, 12, 258.
- De Mari K, Maynard L, Eun HM, B Lebreux B, 2003. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. *Vet Rec*, 152: 105–8.
- Decaro N, Buonavoglia C, 2012. Canine parvovirus—a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol*, 155:(1)1-12.
- Decaro N, Campolo M, Desario C, Elia G, Martella V, Lorusso E, Buonavoglia C, 2005. Maternally- derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biological*, 33(4), 261–7.
- Decaro N, Desario C, Addie DD, Martella V, Vieira MJ, Elia G, Buonavoglia C, 2007. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis*, 13(8), 1222-4.
- Decaro N, Desario C, Amorisco F, Losurdo M, Colaianni ML, Greco MF, Buonavoglia C, 2011. Canine parvovirus type 2c infection in a kitten associated with intracranial abscess and convulsions. *J Feline Med Surg*, 13(4), 231-6.
- Decaro N, Desario C, Beall MJ, Cavalli A, Campolo M, Dimarco AA, Amorisco F, Colaianni ML, Buonavoglia C, 2010. Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in- house rapid test. *Vet J*, 184(3), 373–5.
- Decaro N, Desario C, Billi M, Lorusso E, Colaianni ML, Colao V, Elia G, Ventrella G, Kusi I, Bo S, Buonavoglia C, 2013. Evaluation of an in-clinic assay for the diagnosis of canine parvovirus. *Vet J*, 198, 504–7.
- Decaro N, Desario C, Elia G, Campolo M, Lorusso A, Mari V, Martella V, Buonavoglia C, 2007. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*, 25, 1161–6.
- Diray-Arce J, Conti MG, Petrova B, Kanarek N, Angelidou A, Levy O, 2020. Integrative metabolomics to identify molecular signatures of responses to vaccines and infections. *Metabolites*, 10(12), 492.

- Dodds WJ, 2012. Immune plasma for treatment of parvoviral gastroenteritis. *J Am Vet Med Assoc*, 240, 1056.
- Dossin O, Rupassara SI, Weng HY, Williams DA, Garlick PJ, Schoeman JP, 2011. Effect of parvoviral enteritis on plasma citrulline concentration in dogs. *J Vet Intern Med*, 25, 215–21.
- Duijvestijn M, Mughini-Gras L, Schuurman N, Schijf W, Wagenaar JA, Egberink H, 2016. Enteropathogen infections in canine puppies: (Co-)occurrence, clinical relevance and risk factors. *Vet Microbiol*, 195, 115–22.
- Eckhardt M, Hultquist JF, Kaake RM, Huttenhain R, Krogan NJ, 2020. A systems approach to infectious disease. *Nat Rev Genet*, 21, 339–54.
- Er C, Ok M, 2015. Levels of cardiac biomarkers and coagulation profiles in dog with parvoviral enteritis: *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21, 383–8.
- Eregowda CG, De UK, Mithilesh Singh M, Prasad H, Akhilesh Sarma K, Roychoudhury P, Rajesh JB, Patra MK, Suwendu Kumar Behera SK, 2021. Assessment of certain biomarkers for predicting survival in response to treatment in dogs naturally infected with canine parvovirus. *Microb Pathog*, 149, 104485.
- Farrow CS, 1982. Radiographic appearance of canine parvovirus enteritis. *J Am Vet Med Assoc*, 180, 43–7.
- Faz M, Martínez JS, Gómez LB, Quijano-Hernández I, Fajardo R, Del Ángel-Caraza J, 2019. Origin and genetic diversity of canine parvovirus 2c circulating in Mexico. *Arch Virol*, 164(2), 371–9.
- Faz M, Martínez JS, Gómez LB, Quijano-Hernández I, Fajardo R, Del Ángel-Caraza J, 2019. Origin and genetic diversity of canine parvovirus 2c circulating in Mexico. *Arch Virol*, 64, 371–9.
- Ford RB, Larson LJ, McClure KD, Schultz RD, Welborn LV, 2017. AAHA Canine Vaccination Guidelines. *J Am Anim Hosp Assoc*, 53, 243–51.
- Franco-Martínez L, Tvarijonaviciute A, Horvatić A, Guillemin N, Cerón JJ, Escibano D, Eckersall D, Kocatürk M, Yilmaz Z, Lamy E, Martínez-Subiela S, Mrljak V, 2018. Changes in salivary analytes in canine parvovirus: A high-resolution quantitative proteomic study. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 60, 1–10.
- Franzo G, De Villiers L, De Villiers M, Ravandi A, Gyani K, Van Zyl L, Coetzee LM, Khaiseb S, Molini U, 2022. Molecular epidemiology of canine parvovirus in Namibia: Introduction pathways and local persistence. *Prev Vet Med*, Dec, 209, 105780.
- Gerlach M, Proksch AL, Unterer S, Speck S, Truyen U, Hartmann K, 2017. Efficacy of feline antiparvovirus antibodies in the treatment of canine parvovirus infection. *J Small Anim Pract*, 58, 408–15.
- Goddard A, Leisewitz AL, 2010. Canine parvovirus. *T Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40, 1041–53.
- Goddard A, Leisewitz AL, Christopher MM, Duncan NM, Becker PJ, 2008. Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med*, 22, 309–16.
- Gong WY, Abdelhamid RE, Carvalho CS, Sluka KA, 2016. Resident Macrophages in Muscle Contribute to Development of Hyperalgesia in a Mouse Model of Noninflammatory Muscle Pain. *J Pain*, 2016 17, 1081–94.
- Gowda D, Kellarai A, Hegde PS, Agni MB, Lundstrom K, Barh D, 2023. Metabolites and metabolomics in COVID-19. in *Omics approaches and technologies in COVID-19*, Eds, Barh D, Azevedo V, 1st, Brazil, Academic Press, 87–99.
- Grauslys A, Phelan MM, Broughton C, Baines PB, Jennings R, Siner S, Carrol ED, 2020. NMR-based metabolic profiling provides diagnostic and prognostic information in critically ill children with suspected infection. *Sci Rep*, 10, 20198.
- Gu C, Mao X, Chen D, Yu B, Yang Q, 2019. Isoleucine Plays an Important Role for Maintaining Immune Function. *Curr Protein Pept Sci*, 20, 644–51.
- Gulersoy E, Ok M, Yildiz R, Koral E, Ider M, Sevinc M, Zhunushova A, 2020. Assessment of intestinal and cardiac-related biomarkers in dogs with parvoviral enteritis. *Pol J Vet Sci*, 23(2), 211–9.

- Hasan MR, Suleiman M, Pérez-López A, 2021. Metabolomics in the diagnosis and prognosis of COVID-19. *Front Genet*, 12, 721556.
- Heald RD, Jones BD, Schmidt DA, 1986. Blood gas and electrolyte concentrations in canine parvoviral enteritis. *J Am Anim Hosp Assoc*, 22, 745–8.
- Hosmer DW, Lemeshow S, 2000. John Wiley and Sons, New York. *Applied Logistic Regression* 5, pp160–4.
- Hughes D, Beal MW, 2000. Emergency vascular access. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 30,491–7.
- Ince ME, Turgut K, Akar A, Naseri A, Sen I, Süleymanoglu H, Ertan M, Sagmanligil V, 2019. Prognostic importance of tissue Doppler imaging of systolic and diastolic functions in dogs with severe sepsis and septic shock. *Acta Vet Hung*, 67(4), 517–28.
- Ince ME, Turgut K, Akar A, Naseri A, Sen I, Süleymanoglu H, Ertan M, Sagmanligil V, 2019. Prognostic importance of tissue Doppler imaging of systolic and diastolic functions in dogs with severe sepsis and septic shock. *Acta Vet Hung* 67, 517–28.
- Ince ME, Turgut K, Naseri A, 2011. Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Systolic and Diastolic Functions in Dogs with Severe Sepsis and Septic Shock; Longitudinal Study. *Animals*, Jul 5,11(7),2011.
- Ince ME, Turgut K, Naseri A, 2021. Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Systolic and Diastolic Functions in Dogs with Severe Sepsis and Septic Shock; Longitudinal Study. *Animals(Basel)*, 5, 11, 2011.
- Iris Kalli, Leontides LS, Mylonakis ME, Adamama-Moraitou K, Rallis T, Koutinas AF, 2010. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Res Vet Sci*, 89(2), 174–8.
- Ishiwata K, Minagawa T, Kajimoto T, 1998. Clinical effects of the recombinant feline interferon-omega on experimental parvovirus infection in beagle dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 60, 911–7.
- Jiaqi LiJ, Kun XiaK, Mingdi Xiong M, Xi Wang X, Nianlong Yan N, 2017. Effects of sepsis on the metabolism of sphingomyelin and cholesterol in mice with liver dysfunction. *Exp Ther Med*, 14, 5635–40.
- Johnson AA, Cuellar TL, 2023. Glycine and aging: Evidence and mechanisms. *Ageing Res Rev*, 87, 101922.
- Johnson RH, Smith JR, 1983. Epidemiology and pathogenesis of canine parvo virus. *Aust Vet Pract*, 3,31.
- Kalli I, Leontides LS, Mylonakis ME, Adamama-Moraitou K, Rallis T, Koutinas AF, 2010. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvoviral enteritis. *Res Vet Sci*, 89, 174–8.
- Kelman M, Ward MP, Barrs VR, Norris JM, 2019. The geographic distribution and financial impact of canine parvovirus in Australia. *Transbound Emerg Dis*, 66(1), 299–11.
- Kocaturk M, Martinez S, Eralp O, Tvarijonaviciute A, Ceron J, Yilmaz Z, 2010. Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. *J Small Anim Pract*, 51, 478–83.
- Kopach O, Zheng K, Rusakov DA, 2020. Optical monitoring of glutamate release at multiple synapses in situ detects changes following LTP induction. *Mol Brain*, 13, 13,39.
- Lakhdhir SA, Viall A, Alloway E, Keene B, Baumgartner K, Ward J, 2020. Clinical presentation, cardiovascular findings, etiology, and outcome of myocarditis in dogs: 64 cases with presumptive antemortem diagnosis (26 confirmed postmortem) and 137 cases with postmortem diagnosis only (2004–2017). *J Vet Cardiol*, 30, 44–56.
- Lamarre SG, Morrow G, Macmillan L, Brosnan ME, Brosnan JT, 2013. Formate: an essential metabolite, a biomarker, or more? *Clin Chem Lab Med*, 51, 571–8.
- Li J, Xia K, Xiong M, Wang X, Yan N, 2017. Effects of sepsis on the metabolism of sphingomyelin and cholesterol in mice with liver dysfunction. *Exp Ther Med*, 14, 5635–40.

- Lin ZY, Xu PB, Yan SK, Meng HB, Yang GJ, Dai WX, Liu XR, Li JB, Deng XM, Zhang WD, 2009, A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis by (1)H NMR and pattern recognition. *NMR Biomed*, 22, 601-8.
- Macintire D, Smith-Carr S, Jones R, 1999. Treatment of dogs naturally infected with canine parvovirus with lyophilized canine IgG. *Proceedings of the 17th Annual Conference of the American College of Veterinary Internal Medicine*, 10-13, 1999, 721.
- Macintire DK, 2008. Pediatric fluid therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 38(3):621-7-xii.
- Mantione NL, Otto CM, 2005. Characterization of the use of antiemetic agents in dogs with parvoviral enteritis treated at a veterinary teaching hospital: 77 cases (1997-2000). *J Am Vet Med Assoc*, 227, 1787-93.
- Mao G, Shi T, Zhang S, Crittenden J, Guo S, Du H, 2018. Bibliometric analysis of insights into soil remediation. *Journal of soils and sediments*, 18, 2520-34.
- Marenzoni M L, Calo P, Foiani G, Passantino G, Decaro N, Mandara MT, 2019. Porencephaly and periventricular encephalitis in a 4 month old puppy: detection of canine parvovirus type 2 and potential role in brain lesions. *J Comp Pathol*, 169, 20-4.
- Marenzoni ML, Calò P, Foiani G, Tossici, S, Passantino G, Decaro N, Mandara MT, 2019, Porencephaly and periventricular encephalitis in a 4-month-old puppy: Detection of Canine parvovirus type 2 and potential role in brain lesions. *J Comp Pathol*, 169, 20-24.
- 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.
- Martin LG, Luther TY, Alperin DC, Gay JM, Hines SA, 2008. Serum antibodies against human albumin in critically ill and healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 232, 1004-9.
- Mayer KA, Stockl J, Zlabinger GJ, Gualdoni GA, 2019. Hijacking the supplies: metabolism as a novel facet of virus-host interaction. *Front. Immunol*, 2019, 10, 1533.
- Mayer KA, Stöckl J, Zlabinger GJ, Gualdoni GA, 2019. Hijacking the Supplies: Metabolism as a Novel Facet of Virus-Host Interaction. *Front Immunol*, 3, 10, 1533
- Mazzaferro EM, 2020. Update on canine parvoviral enteritis. *et Clin North Am Small Anim Pract*, 50, 1307-25.
- McCaw DL, Hoskins JD, 2006. Canine viral enteritis. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Eds; Louis St, 4th, Green CE, Saunders, 63-73.
- McClure V, van Schoor M, Thompson PN, Kjelgaard-Hansen M, Goddard A, 2013. Evaluation of the use of serum C-reactive protein concentration to predict outcome in puppies infected with canine parvovirus. *J Am Vet Med Assoc*, 243, 361-6.
- Mckay RT, 2011. How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: an examination of the pulse sequence components and evolution. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 38, 197-20.
- Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJ, Slauson DO, 1985. Pathogenesis of canine parvovirus: the importance of viremia. *Vet Pathol*, 22, 60-71.
- Miranda C, Carnevalheira J, Parrish CR, Thompson G, 2015. Factors affecting the occurrence of canine parvovirus in dogs. *Vet Microbiol*, 180, 59-64.
- Miranda C, Parrish CR, Thompson G, 2014. Canine parvovirus 2c infection in a cat with severe clinical disease. *J Vet Diagn Invest*, 26, 462-4.
- Mohr AJ, Leisewitz AL, Jacobson LS, Steiner JM, Ruaux CG, Williams DA, 2003. Effect of early enteral nutrition on intestinal permeability, intestinal protein loss, and outcome in dogs with severe parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med*, 17(6), 791-8.

- Montague B, Summers A, Bhawal R, Anderson ET, Kraus-Malett S, Zhang S, Goggs R, 2022. Identifying potential biomarkers and therapeutic targets for dogs with sepsis using metabolomics and lipidomics analyses. *PLoS One*, 17, e0271137.
- Montague B, Summers A, Bhawal R, Anderson ET, Kraus-Malett S, Zhang S, Goggs R, 2022. Identifying potential biomarkers and therapeutic targets for dogs with sepsis using metabolomics and lipidomics analyses. *PLoS One*, 8, 17, e0271137.
- Mylonakis ME, Kalli I, Rallis TS, 2016. Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Vet Med*, 7, 91–100.
- Mylonakis ME, Kalli I, Rallis TS, 2016. Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Vet Med*, 7, 91-100. Schoeman JP, Goddard A, Leisewitz AL 2013. Biomarkers in canine parvovirus enteritis. *N Z Vet J*, 61, 217-22.
- Nargi-Aizenman JL, Havert MB, Zhang M, Irani DN, Rothstein JD, Griffin DE, 2004. Glutamate receptor antagonists protect from virus-induced neural degeneration. *Ann Neurol*, 55, 541-9.
- Neuhaus M. 2011. Nonparametric statistical tests: A computational approach. CRC Press.
- Noto A, Dessi A, Puddu M, Mussap M, Fanos V, 2014. Metabolomics technology and their application to the study of the viral infection. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2, 53-7.
- O'Toole E, Miller CW, Wilson BA, Mathews KA, Davis C, Sears W, 2004. Comparison of the standard predictive equation for calculation of resting energy expenditure with indirect calorimetry in hospitalized and healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 225, 58–64.
- Oikonomidis IL, Theodorou K, Papaioannou E, Xenoulis PG, Adamama-Moraitou KK, Steiner JM, Kritsepi-Konstantinou M, Suchodolski JS, Rallis T, Soubasis N, 2023. Serial measurement of cardiac troponin I in hospitalised dogs with canine parvoviral enteritis: Association with outcome and canine pancreas-specific lipase concentration. *Res Vet Sci*, 157, 1-5.
- Ok M, Er C, Yıldız R, 2015. Evaluation of acute phase proteins and cytokines in dogs with parvoviral enteritis. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 31, 143-7.
- Opgenorth J, Sordillo LM, Lock AL, Gandy JC, VandeHaar MJ, 2020. Colostrum supplementation with n-3 fatty acids alters plasma polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediators in newborn calves. *J Dairy Sci*, 103, 11676–88.
- Opgenorth J, Sordillo LM, Lock AL, Gandy JC, VandeHaar MJ, 2020. Colostrum supplementation with n-3 fatty acids alters plasma polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediators in newborn calves. *J Dairy Sci*, 103, 11676-88.
- Otto CM, Drobatz KJ, Soter C, 1997. Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med*, 11, 65–70.
- Otto CM, Rieser TM, Brooks MB, Russell MW, 2000. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *J Am Vet Med Assoc*, 217(10), 1500–4.
- Pakkanen K, 2009. From endosomes onwards: membranes, lysosomes and viral capsid interactions (No. 203). University of Jyväskylä.
- Panda D, Patra RC, Nandi S, Swarup D, 2009. Oxidative stress indices in gastroenteritis in dogs with canine parvoviral infection. *Res Vet Sci*, 86, 36–42.
- Papaioannou E, Soubais N, Theodorou K, et al. The potential role of oseltamivir in the management of canine parvoviral enteritis in 50 natural cases. Abstract BSAVA Congress, April 4–7, 2013 Birmingham, UK.
- Pastenkos G, Miller JL, Pritchard SM, Nicola AV, 2019. Role of Sphingomyelin in Alpha herpesvirus Entry. *J Virol*, 93, e01547-18.
- Polat PF, Şahan A, Aksoy G, Timurkan MO, Dinçer E, 2019. Molecular and restriction fragment length polymorphism analysis of canine parvovirus 2 (CPV-2) in dogs in southeast Anatolia, Turkey. *Onderstepoort J Vet Res*, 86, e1–e8.
- Pollack RV, Carmichael LE, 1982. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *J Am Vet Med Assoc*, 204, 37–42.
- Prittie J, 2004. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *J Vet Emerg Crit Care*, 14, 167-76.

- Prittie J, 2006. Optimal endpoints of resuscitation and early goal-directed therapy. *J Vet Emerg Crit Care*, 16 (4), 329–39.
- Proksch AL, Unterer S, Speck S, Truyen U, Hartmann K, 2015. Influence of clinical and laboratory variables on faecal antigen ELISA results in dogs with canine parvovirus infection. *Vet J*, 204,304–8.
- Purvis D, Kirby R, 1994, Systemic inflammatory response syndrome: septic shock. *The Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 24(6), 1225–47.
- Rallis TS, Papazoglou LG, Adamama-Moraitou KK, Prassinos NN, 2000. Acute enteritis or gastroenteritis in young dogs as a predisposing factor for intestinal intussusception: a retrospective study. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 47, 507–11.
- Rallis TS, Papazoglou LG, Adamama-Moraitou KK, Prassinos NN, 2000. Acute enteritis or gastroenteritis in young dogs as a predisposing factor for intestinal intussusception: a retrospective study. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 47, 507-11.
- Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, Stevens C, Sharma Y, Zhang CK, Boucher G, Ripke S, Ellinghaus D, Burt N, 2011. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nature genetics*, 43, 1066–73.
- Rusakov DA, 2018. An optical sensor to monitor dynamics of extracellular glycine. *Nat Chem Biol*, 14, 835-6.
- Sánchez-García FJ, Pérez-Hernández CA, Rodríguez-Murillo M, Moreno-Altamirano MMB 2021. The Role of Tricarboxylic Acid Cycle Metabolites in Viral Infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 14, 11, 725043.
- Santos MC, Morais CL, Nascimento YM, Araujo JM, Lima KM, 2017. Spectroscopy with computational analysis in virological studies: A decade (2006–2016). *Trends in Analytical Chemistry*, 97, 244-56.
- Savigny MR, Macintire DK, 2010. Use of oseltamivir in the treatment of canine parvoviral enteritis. *J Vet Emerg Crit Care*, 20, 132–42.
- Schaudien D, Polizopoulou Z, Koutinas A, Schwab S, Porombka D, Baumgärtner W, Herden C, 2010. Leukoencephalopathy associated with parvovirus infection in Cretan hound puppies. *J Clin Microbiol*, 48, 3169–75.
- Schoeman JP, Goddard A, Herrtage ME, 2007. Serum cortisol and thyroxine concentrations as predictors of death in critically ill puppies with parvoviral diarrhea. *J Am Vet Med Assoc*, 231, 1534–9.
- Schoeman JP, Goddard A, Leisewitz AL, 2013. Biomarkers in canine parvovirus enteritis. *N Z Vet J*. 61(4), 217-22.
- Schoeman JP, Herrtage ME, 2008. Serum thyrotropin, thyroxine and free thyroxine concentrations as predictors of mortality in critically ill puppies with parvovirus infection: a model for human paediatric critical illness?. *Microbes Infect*, 10, 203–4.
- Silva ROS, Dorella FA, Figueiredo HCP, Costa ÉA, Pelicia V, Ribeiro BLD, Ribeiro MG, Paes AC, Megid J, Lobato FCF, 2017. *Clostridium perfringens* and *C. difficile* in parvovirus-positive dogs. *Anaerobe*, 48, 66–9.
- Silva SP, Silva LNPP, Rodrigues EDL, Cardoso JF, Tavares FN, Souza WM, Santos CMP, Martins FMS, Jesus IS, Brito TC, Moura TPC, Nunes MRT, Casseb LMN, Silva Filho E, Casseb AR, 2017. Full-length genomic and molecular characterization of Canine parvovirus in dogs from North of Brazil. *Genet Mol Res*, 2, 16.
- Sime TA, Powell LL, Schildt JC, Olson EJ, 2015. Parvoviral myocarditis in a 5-week-old Dachshund. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 25, 765-9.
- Smith-Carr S, Macintire DK, Swango LJ, 1997. Canine parvovirus: Part I Pathogenesis and vaccination. *Comp Cont Educ Pract*, 19, 125–33.
- Stander N, Wagner WM, Goddard A, Kirberger RM, 2010. Ultrasonographic appearance of canine parvoviral enteritis in puppies. *Vet Radiol Ultrasound*, 51,69-74.
- Strom L M, Reis JL, Brown CC, 2015. Pathology in practice. Parvoviral myocarditis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 246, 853–55.
- Sullivan LA, Lenberg JP, Boscan P, Timothy B, Hackett TB, David C, Twedt DC, 2018, Assessing the efficacy of maropitant versus ondansetron in the treatment of dogs with parvoviral enteritis. *J Am Anim*

- Hosp Assoc, 54, 338–43.
- Sykes JE, 2010. Immunodeficiencies caused by infectious diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40, 409-23.
- Sykes JE, 2014. Canine parvovirus infections and other viral enteritides. in *Canine and Feline Infectious Diseases*, 141–51.
- Tounta V, Liu Y, Cheyne A, Larrouy-Maumus G, 2021. Metabolomics in infectious diseases and drug discovery. *Mol. Omics*, 17, 376–93.
- Tounta V, Liu Y, Cheyne A, Larrouy-Maumus G, 2021. Metabolomics in infectious diseases and drug discovery. *Mol Omics*, 14, 17, 376-93.
- Tran H, McConville M, Loukopoulos P, 2020. Metabolomics in the study of spontaneous animal diseases. *J Vet Diagn Invest*, 32, 635-47.
- Tunca R, TOPLU N, 2007. Doğal enfekte köpek parvovirus enfeksiyonunda patolojik bulgular ve viral antijenin floresan antikor tekniği ile demonstrasyonu. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54, 55-9.
- Van den Berg MF, Schoeman JP, Defauw P, Whitehead Z, Breemers A, Goethals K, Daminet S, Meyer E, 2018. Assessment of acute kidney injury in canine parvovirus infection: comparison of kidney injury biomarkers with routine renal function parameters. *Vet J*, 242, 8–14.
- Van Nguyen S, Umeda K, Yokoyama H, Tohya Y, Kodama Y, 2006. Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. *Can J Vet Res*, 70, 62–64.
- Wang B, Tontonoz P, 2019. Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol*, 2019 Feb 10;81, 165-88.
- Wilcoxon, F, 1992. Individual comparisons by ranking methods. In *Breakthroughs in Statistics: Methodology and Distribution*, 196-202.
- Williams NC, O'Neill LAJ, 2018. A Role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in Metabolic Reprogramming in Innate Immunity and Inflammation. *Front Immunol*, 5, 9, 141.
- Woldemeskel M, Liggett A, Ilha M, Saliki JT, Johnson LP, 2011, Canine parvovirus-2b-associated erythema multiforme in a litter of English Setter dogs. *J Vet Diagn Invest*, 23, 576-80.
- Yalcin E, Keser GO, 2017. Comparative efficacy of metoclopramide, ondansetron and maropitant in preventing parvoviral enteritis-induced emesis in dogs, *J Vet Pharmacol Ther*, 40, 599-3.
- Yilmaz Z, Senturk S, 2007, Characterisation of lipid profiles in dogs with parvoviral enteritis. *J Small Anim Pract*, 48, 643–50.
- Zobba R, Visco S, Sotgiu F, Pinna P, Parpaglia ML, Pittau M, Alberti A, 2021. Molecular survey of parvovirus, astrovirus, coronavirus, and calicivirus in symptomatic dogs. *Vet Res Commun*. 45, 31-40.