

Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift

JULI - AUGUSTUS 2016

VOL. 85 - NR 4

VERSCHIJNT TWEEMAANDELIJKS

PUBLISHED BIMONTHLY

ISSN 0303 9021


WWW.VDT.UGENT.BE

GENT X

Afgiftekantoor 9099 Gent X

v.u. Luc Peelman

Salisburylaan 133 - B-9820 Merelbeke

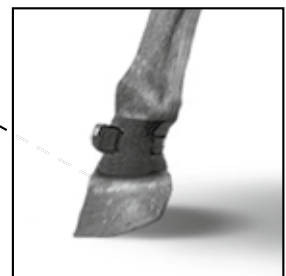
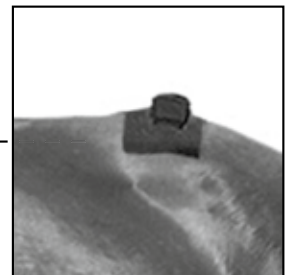
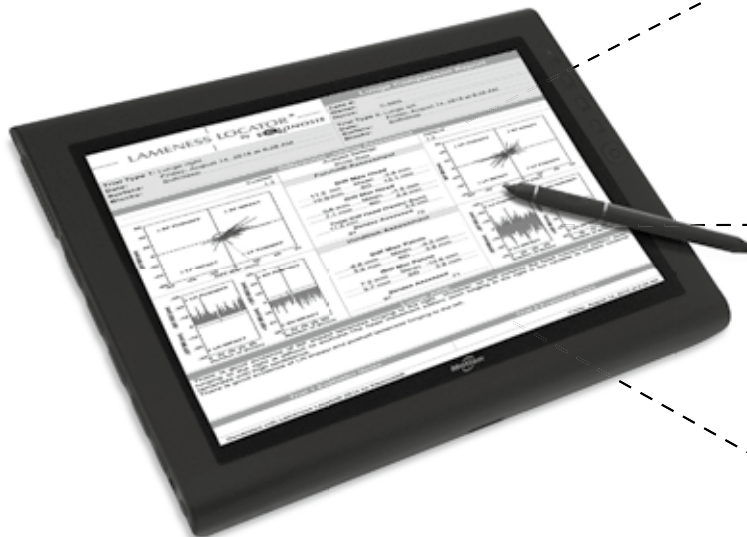
- 
- **Ziekteveroorzakende mutaties bij honden**
 - **Feminisatie en pancytopenie bij een hond**
 - **Negatieve druktherapie als wondbehandeling bij een hond**
 - **Flexorenthesopathie bij een Italiaanse cane corso**
 - **Respiratoire pathogenen bij paarden**
 - **Tandheelkunde bij het paard**
 - **‘Le Jumart’: mythe of mysterie?**

EQUINOSIS Q™

with Lameness Locator® Software

We komen
graag bij u
langs voor
een demo

*Like a microscope in the hands of a scientist,
the Equinosis Q™ allows the veterinary surgeon
to detect movement otherwise invisible to the
naked eye.*



Objective evaluation

Detection of subtle or multiple limb lameness

Fast, accurate, reliable

20x faster than the human eye

User-friendly

Quick and easy to set up



BEKIJK DE VIDEO OP

www.eickemeyer.nl/lameness-locator.html

veterinary technology for life
Eickemeyer®

EICKEMEYER®
Bedrijventerrein
Pavijen-West Bellweg 44
4104 BJ Culemborg

T +31 345 58 9400
F +31 345 58 9401
E info@eickemeyer.nl
www.eickemeyer.nl

VLAAMS DIERGENEESKUNDIG TIJDSCHRIFT

2016, vol. 85, nr. 4

INHOUD

Thema: Ziekteveroorzakende mutaties bij honden

175 E. BECKERS, M. VAN POUCKE, L. RONSYN, L. PEELMAN
Frequentieschatting van ziekteveroorzakende mutaties in de Belgische populatie van enkele hondenrassen - Deel 1: herders

185 E. BECKERS, M. VAN POUCKE, L. RONSYN, L. PEELMAN
Frequentieschatting van ziekteveroorzakende mutaties in de Belgische populatie van enkele hondenrassen - Deel 2: retrievers en andere rasytypes

Casuïstieken

197 D. PAEPE, L. HEBBELINCK, A. KITSHOFF, S. VANDENABEELE
Feminisatie en ernstige pancytopenie veroorzaakt door testiculaire neoplasie bij een cryptorchide hond

206 S. LIPPENS, A. FURCAS, M. OR, B. VAN GOETHEM, I. POLIS, H. DE ROOSTER
Behandeling van een chronische huidwonde bij een hond via negatieve druktherapie

215 L. STAMMELEER, E. DE BAKKER, E. STOCK, V. DEHUISSEER, I. GIELEN, B. VAN RYSSEN
Flexorenthesopathie bij een Italiaanse cane corso: diagnostische bevindingen en resultaat na behandeling

Short communication

221 B. BROUX, A. GRYSPEERDT, H. AMORY, T. FRIPPIAT, B. PARDON, F. GASTHUYLS, L. LEGRAND, P. DEPREZ
Prevalentie van respiratoire pathogenen in neusswabs van paarden met acute ademhalingsstoornissen in België

Permanente vorming

225 E. POLLARIS, E. VAN DER VEKENS, I. GIELEN, C.P. CRIJNS, L. VLAMINCK
Tandheelkunde bij het paard in de 21^e eeuw – Deel 2: Onderzoek van de paardenmond en diagnostische hulpmiddelen voor detectie van gebitspathologie

Uit het verleden

237 P.E.J. BOLS, H.F.M. DE PORTE
‘Le jumart’: mythe of mysterie in de dierlijke reproductie?

Vraag en antwoord

249 Het ontwormen van ezels en paardenveulens
250 Trombocytopenische purpura bij zuigende biggen

Uit de faculteit

Persberichten

Uit het verleden

184, 205,
252

Theme: Disease-causing mutations in dog breeds

E. BECKERS, M. VAN POUCKE, L. RONSYN, L. PEELMAN
Frequency estimation of disease-causing mutations in the Belgian population of some dog breeds - Part 1: shepherds

E. BECKERS, M. VAN POUCKE, L. RONSYN, L. PEELMAN
Frequency estimation of disease-causing mutations in the Belgian population of some dog breeds - Part 2: retrievers and other breed types

Case reports

D. PAEPE, L. HEBBELINCK, A. KITSHOFF, S. VANDENABEELE
Feminization and severe pancytopenia caused by testicular neoplasia in a cryptorchid dog

S. LIPPENS, A. FURCAS, M. OR, B. VAN GOETHEM, I. POLIS, H. DE ROOSTER
Treatment of a chronic skin wound in a dog using negative pressure wound therapy

L. STAMMELEER, E. DE BAKKER, E. STOCK, V. DEHUISSEER, I. GIELEN, B. VAN RYSSEN
Flexor enthesopathy in an Italian cane corso: diagnostic findings and treatment results

Short communication

B. BROUX, A. GRYSPEERDT, H. AMORY, T. FRIPPIAT, B. PARDON, F. GASTHUYLS, L. LEGRAND, P. DEPREZ
Prevalence of respiratory pathogens in nasal swabs from horses with acute respiratory disease in Belgium

Continuing education

E. POLLARIS, E. VAN DER VEKENS, I. GIELEN, C.P. CRIJNS, L. VLAMINCK
Equine dentistry in the 21st century – Part 2: Dental examination of the horse's mouth and diagnostic techniques for detection of dental disease

From the past

P.E.J. BOLS, H.F.M. DE PORTE
‘Le jumart’: myth or mystery in animal reproduction?

Coverfoto: Marianne De Ridder

De genetische gezondheid van vele hondenrassen is door jarenlange strenge selectie in het gedrang gekomen. De voorbije jaren is de bewustwording hierrond sterk toegenomen en worden veel inspanningen geleverd om de algemene genetische gezondheid van de hondenrassen te verbeteren. Er worden aan een snel tempo nieuwe ziekteveroorzakende mutaties gevonden bij allerlei rassen waaronder ook de **Mechelse herder**. Schattingen van de frequentie van oorzakelijke mutaties zoals beschreven in vormen een belangrijk onderdeel om gericht fokadvies te kunnen geven en de prevalentie van de betreffende aandoeningen terug te dringen (cf. pg. 175).

Tekst: Evy Beckers

VLAAMS DIERGENEESKUNDIG TIJDSCHRIFT

ISSN 0303-9021

<http://vdt.UGent.be>

Hoofdredacteur en verantwoordelijke uitgever: Luc Peelman
Coördinator en eindredacteur: Nadia Eeckhout
Redacteur rubriek "Uit het verleden": Luc Devriese

Redactiecomité:

P. Bols, C. Burvenich, E. Cox, S. Daminet, P. De Backer, P. De-prez, L. Devriese, R. Ducatelle, M. Haspeslagh, M. Hesta, K. Houf, J. Laureyns, I. Polis, J. Saunders, P. Simoens, L. Van Ham, F. Van Immerseel, A. Van Soom, A. Van Zeveren

Druk:

Graphius
Eekhoudriesstraat 67, B-9041 Oostakker

Publiciteit:

Boerenbond – Media-Service, Diestsevest 40, B-3000 Leuven
Tel. 016 28 63 33

Inlichtingen (voor auteurs) en Abonnementen:

Nadia Eeckhout
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke
Tel. 09 264 75 13
nadia.eeckhout@UGent.be

Het Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift verschijnt 6 maal per jaar en wordt uitgegeven door de Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent.

Voor intekening dient U contact op te nemen met het secretariaat van het tijdschrift: nadia.eeckhout@UGent.be; tel. 09 264 75 13; fax 09 264 77 99. Er zal u een factuur toegestuurd worden van 60 euro (+6% BTW) (abonnees in België) of 80 euro (+6% BTW) (abonnees in het buitenland). Studenten en faculteitspersoneel kunnen genieten van een gunsttarief.

De verantwoordelijkheid voor alle gepubliceerde methoden, materialen en aanbevelingen berust bij de auteurs van de betreffende bijdragen. De redactie en uitgever zijn niet verantwoordelijk voor eventuele letsels of schade als gevolg van toepassingen die daaruit voortvloeien.

Beknopte richtlijnen voor auteurs

Ieder manuscript zal qua inhoud en vorm beoordeeld worden door 2 onafhankelijke personen.

De samenvatting mag niet langer zijn dan 5% van het artikel met een max. van 150 woorden.

De literatuuaraangave **in de tekst** dient als volgt te gebeuren: de naam van de auteur(s) en het jaar van publicatie (Voorbeeld: "... werd vroeger aangetoond (Brown, 1975; Brown en Ellis, 1975; Brown *et al.*, 1975)" ofwel "Brown (1975) toonde vroeger aan dan ...". Er is dus geen cijferaanwijzing in de tekst.

In de **literatuurlijst** dienen achtereenvolgens vermeld: namen van auteur(s), initialen van voornamen, jaartal, titel van artikel, naam van tijdschrift, volume, paginering. Voorbeeld: Allan W.R., Rowson L.B., (1973). Control of the mare's oestrus cycle by prostaglandins. *Journal of Reproduction and Fertility* 33, 539-543.

De referenties zijn alfabetisch gerangschikt. Artikels van dezelfde auteur(s) dienen per jaartal gerangschikt en in de tekst aangeduid te worden als: (1975a, 1975b)... Bij boeken dienen plaats en naam van uitgever vermeld te worden.

Editor-in-chief and publisher: Luc Peelman
Editorial office: Nadia Eeckhout
Editor "History": Luc Devriese

Editorial board:

P. Bols, C. Burvenich, E. Cox, S. Daminet, P. De Backer, P. De-prez, L. Devriese, R. Ducatelle, M. Haspeslagh, M. Hesta, K. Houf, J. Laureyns, I. Polis, J. Saunders, P. Simoens, L. Van Ham, F. Van Immerseel, A. Van Soom, A. Van Zeveren

Printed by:

Graphius
Eekhoudriesstraat 67, B-9041 Oostakker

Advertisements:

Boerenbond – Media-Service, Diestsevest 40, B-3000 Leuven
Tel. 016 28 63 33

Information (for authors) and Subscriptions:

Nadia Eeckhout
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke
Tel. 09 264 75 13
nadia.eeckhout@UGent.be

The 'Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift' is published six times per year by the Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University. For subscriptions, please contact the administrative offices of the journal: nadia.eeckhout@UGent.be; tel. 0032 9 264 75 13; fax 0032 9 264 77 99. An invoice of 80 euros (+6% VAT) will be sent.

The responsibility for all methods, materials and recommendations published herein rests solely with the authors of the various contributions. No responsibility is assumed by the editorial staff or publisher for any resulting injury or damage.

More detailed information is available on
www.vdt.ugent.be

Figuren en tabellen dienen contrastrijk te zijn en op afzonderlijke bijlagen te worden ingediend. De figuren moeten een grootte hebben van minstens 200 kb.

Het aantal tabellen en figuren wordt tot een noodzakelijk minimum beperkt.

Voor de figuren dienen titels en teksten gezamenlijk op een apart blad aangebracht te worden.

Overzichtsartikelen mogen niet te uitgebreid zijn (norm: max. 20 getypte bladzijden) en het aantal referenties wordt beperkt gehouden.

De auteurs gaan ermee akkoord dat hun gepubliceerd artikel hergebruikt kan worden, mits vermelding van de bron.

Verdere details kunnen verkregen worden op de redactie of op www.vdt.ugent.be

Frequency estimation of disease-causing mutations in the Belgian population of some dog breeds - Part 1: shepherds

Frequentieschatting van ziekteveroorzakende mutaties in de Belgische populatie van enkele hondenrassen - Deel 1: herders

E. Beckers, M. Van Poucke, L. Ronsyn, L. Peelman

Department of Nutrition, Genetics and Ethology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Heidestraat 19, B-9820 Merelbeke, Belgium

luc.peelman@ugent.be

ABSTRACT

In light of improving breeding advice, the frequency was estimated for all the disease-causing mutations that were known at the start of the study and that are potentially relevant for a group of dog breeds, which are relatively popular or in which the genetic diversity in Belgium is low to moderately low. In this study, the results for the German shepherd dog, Malinois, Lakenois, Groenendael, Tervuren, Australian shepherd and Border collie are presented. Disorders with a frequency high enough to warrant routine genotyping for breeding programs are (1) multidrug resistance 1 and hereditary cataract for the Australian shepherd, (2) degenerative myelopathy for the German shepherd dog, Malinois and Groenendael and (3) collie eye anomaly for the Border collie. In addition, the hyperuricosuria mutation described in the German shepherd dog was not found in its Belgian population, but was, to the authors' knowledge discovered for the first time in the Malinois.

SAMENVATTING

Om richter fokadvies te kunnen geven, werd de frequentie geschat van alle ziekteveroorzakende mutaties die bekend waren bij de start van de studie en potentieel relevant zijn voor een aantal hondenrassen die relatief populair zijn of waarvan de genetische diversiteit in België laag tot middelmatig laag is. De resultaten voor de Duitse herder, Mechelse herder, Lakense herder, groenendaeler, Tervurense herder, Australische herder en bordercollie worden hier besproken. Aandoeningen met een frequentie hoog genoeg om deze routinematig te genotyperen voor fokprogramma's zijn (1) "multidrug resistance 1" en "hereditary cataract" voor de Australische herder, (2) degeneratieve myelopathie voor de Duitse herder, de Mechelse herder en de groenendaeler en (3) "collie eye anomaly" voor de bordercollie. De hyperuricosurie-mutatie, beschreven bij de Duitse herder, werd in deze studie niet aangetroffen bij dit ras, maar werd volgens de auteurs wel voor het eerst vastgesteld bij de Mechelse herder.

INTRODUCTION

Common breeding practices in domestic dogs, combined with a small genetic basis in some breeds (Akita inu, Rough collie, Bichon frise, Laekenois, Papillon) have put the genetic diversity of some breeds under pressure. Examples of such practices are selection purely based on breed standards and the (over) use of a popular sire (matador breeding) (Calboli et al., 2008). Without any doubt, this has an impact on the frequency of disease-causing mutations in these breeds. Some breeds, such as the Berger des Pyrénées and the Braque Saint-Germain, have such a small and/or decreasing population size that they are considered

as endangered (Leroy et al., 2006). In order to improve the genetic health of the breeds involved and to avoid the creation of clinically affected individuals as much as possible, breeding programs should be drafted in such a way that the genetic load imposed by hereditary disorders is reduced without reducing the genetic diversity even further. Ideally, these programs could even enhance the genetic diversity at the same time. In order to do so, a good knowledge of the typical disorders in a particular breed and of the frequency of the disease-causing variants is necessary (McGreevy and Nicholas, 1999).

Clinical (phenotypical) typing can only be used to estimate prevalences of genetic disorders, not fre-

quencies of causal mutations (Flint and Woolliams, 2008). It may result in an underestimation of frequencies due to (1) the fact that asymptomatic carriers of recessive disorders will not be identified and may silently accumulate in populations to a considerable degree before popping up in clinical cases, (2) the fact that some hereditary disorders are late-onset diseases (Awano et al., 2009; Zangerl et al., 2006), so that symptoms often show up after phenotyping and after the animal has already produced offspring (Flint and Woolliams, 2008), (3) a sometimes broad range in severity of the symptoms and (4) possible confusion with other diseases. Since the goal of this study was to estimate the frequency of causal mutations and give breeding advice accordingly, genotyping by using a DNA test was the chosen tool.

The most important limitations of the genotyping technique are that the causative mutation(s) of a disorder is not yet known or that a closely linked marker that can be reliably used in marker assisted selection, is absent. This is especially true for polygenic/multifactorial disorders, several of which are sadly enough common in a wide range of dog breeds (Online Mendelian Inheritance in Animal (OMIA)). As a consequence, nearly all DNA tests available to date are for monogenic traits. An example of a polygenic disorder, for which there is a DNA test, is the one for HD, which only explains a small percentage of the variation (Friedenberg et al., 2011). However, it should be noted that some disorders can be caused independently by several mutations and that a DNA test may only detect one of them (Mellersh et al., 2009). This genetic heterogeneity of a disorder can be either caused by different mutations in the same gene (allelic heterogeneity) or by mutations in different genes (locus heterogeneity) (Gelehrter et al., 1998). This means that an animal may be genotyped homozygous wildtype (Wt/Wt) in a certain DNA test and still develop the disorder due to another (unknown) mutation.

Due to the lack of specific mutant allele frequencies of the population at hand, extrapolations from studies in other populations are frequent. Although useful, it may occasionally lead to serious deviation from the actual situation. Allele frequencies are subject to time- and space-related fluctuations caused by several factors, of which the popular sire effect is an important one in dog breeding (Mellersh, 2008; Leroy, 2011). Information from related breeds is sometimes used out of necessity or convenience. This practice is even more prone to error due to a larger genetic divergence and due to the fact that the relationship between breeds is not always clear. Extrapolation may however be an asset in case of data-poor breeds. For example, in this study, DNA tests developed for the popular German shepherd dog were used on Malinois, Laekenois, Groenendael and Tervuren, often collectively called Belgian shepherds. With the exception of the Malinois, the populations of these local breeds are small, and only very few genetic studies of these

breeds have been reported.

In the present study, DNA tests were performed in 17 dog breeds. In this first part, the results obtained for seven shepherd breeds (Australian shepherd, German shepherd dog, Groenendael, Laekenois, Malinois, Tervuren and Border collie) are discussed. The results of another ten dog breeds will be discussed in part two.

MATERIALS AND METHODS

Breed selection

The breeds included in this study were part of a larger group of breeds, of which the genetic diversity was studied in the framework of an action program of the Flemish Government (Wijnrocx et al., 2012). In this program, 23 breeds were studied. Of these, the more popular breeds and breeds with the lowest genetic diversity, for which at least two DNA tests were available at the start of the study, were chosen for inclusion in this frequency study.

Samples and DNA extraction

The blood samples used, originated from a pool of samples (stored at -20 °C) delivered by veterinarians, animal clinics, breeders and breeder associations from all over Belgium for routine genotyping. In order to keep the bias at its lowest, closely related animals (relation >12.5%) were excluded. However, this was not always possible due to the lack of data or to small population size. The aim was to gather at least fifty samples (hundred alleles) for each breed. However, this number was not reached for the Australian shepherd (n = 32) and the Laekenois (n = 27).

For DNA-extraction, whole blood samples collected in EDTA-tubes, were used. One hundred µl of each sample were washed with 500 µl Tris-HCl-EDTA until a clean pellet of white blood cells remained. The cells were resuspended in a lysis buffer containing proteinase K and DNA was released during a forty-five-minute incubation step at 56 °C. The enzyme was afterwards inactivated during a ten-minute incubation step at 95 °C.

Disorders and DNA tests

The disorders were selected based on the data found in the literature for each breed. In total, 14 different tests were performed and the mutant and wild-type allele frequencies were calculated for each disorder. Based on these results, it was checked whether the populations of the present study deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium.

All assays were first validated by sequencing (golden standard) and later performed with easier, quicker and/or cheaper techniques such as PCR (-RFLP) followed by gel electrophoresis or qPCR

Table 1. Overview of the performed DNA tests. Ta indicates the annealing temperature and F and R indicate forward and reverse primers respectively. TR indicates Texas Red.

<p>Disorder: Colly eye anomaly (CEA) Gene symbol: NHEJ1 Assay: PCR with F/R₁/R₂ primers and gel electrophoresis Primers: F: 5'-ttggtgccagctgatca-3'; R1: 5'-ccctgtttgccgttaataagatg-3'; R2: 5'-ccaatcatcagccagcat-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal recessive dbvar ID: nsv1397887 Ta: 64°C</p>	<p>OMIA ID: 000218-9615 Reference: Parker et al., 2007 Amplicon: Wt: 322 bp; Mt: 200 bp</p>
<p>Disorder: Cyclic neutropenia (CN) Gene symbol: AP3B1 Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F primer Primers: F: 5'-ttcttgaaggctaagtgg-3'; R: 5'-gaagtcocatgctctcttacc-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal recessive dbSNP ID: ss1961068737 Ta: 58°C</p>	<p>OMIA ID: 000248-9615 Reference: Benson et al., 2003 Amplicon: 266 bp</p>
<p>Disorder: Degenerative myelopathy (DM) Gene symbol: SOD1 Assay: qPCR with dual labeled probes Primers: F: 5'-cttccatttcttgattg-3'; R: 5'-cacctgtgtattatcccaa-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal recessive dbSNP ID: ss1961068758 Ta: 56°C Probes: Wt: HEX-cgccttcagtcagcc-BHQ1; Mt: TR-cgcctttagtcagccc-BHQ2</p>	<p>OMIA ID: 000263-9615 Reference: Awano et al., 2009 Amplicon: 192 bp</p>
<p>Disorder: Hereditary cataract (HC) Gene symbol: HSF4 Assay: PCR with F/R₁ primers and sequence analysis with R₂ primer Primers: F: 5'-tggcccaaacgagtgatg-3'; R₁: 5'-ttagtggtgtctatctgcaaaagtgg-3'; R₂: 5'-aggctgtggcattctcg-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal dominant dbSNP ID: ss1961068742 Ta: 58°C</p>	<p>OMIA ID: 001758-9615 Reference: Mellersh et al., 2006 Amplicon: 218 bp</p>
<p>Disorder: Hyperuricosuria (HUU) Gene symbol: SLC2A9 Assay: qPCR with dual labeled probes Primers: F: 5'-ccaaggagatcctggc-3'; R₁: 5'-cttcccagcagctcag-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal recessive dbSNP ID: ss1961068738 Ta: 63°C Probes: Wt: FAM-ccatcttcatctgcatcggtg-BHQ1; Mt: TR-catcttcatctcaggtgtg-BHQ2</p>	<p>OMIA ID: 001033-9615 Reference: Bannasch et al., 2008 Amplicon: 101 bp</p>
<p>Disorder: Imerslund-Gräsbeck syndrome (IGS-AS) Gene symbol: AMN Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with R primer Primers: F: 5'-ggcttgaagaagccccca-3'; R: 5'-caagcggggagcctccgaa-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal recessive dbSNP ID: ss1961068745 Ta: 64°C</p>	<p>OMIA ID: 000565-9615 Reference: He et al., 2005 Amplicon: 376 bp</p>
<p>Disorder: Imerslund-Gräsbeck syndrome (IGS-B) Gene symbol: CUBN Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F-Primer Primers: F: 5'-gacttcaaacccaggacaac-3'; R: 5'-acatgaatggtgaggtaaacg-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal recessive dbSNP ID: ss1961068736 Ta: 62°C</p>	<p>OMIA ID: 001786-9615 Reference: Owczarek-Lipska et al., 2013 Amplicon: 248 bp</p>
<p>Disorder: Multidrug resistance 1 (MDR1) Gene symbol: ABCB1 Assay: qPCR with dual labeled probes Primers: F: 5'- gatagttgtatgttggtg -3'; R: 5'-ctaagatcagtgccaca-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal partially dominant dbSNP ID: ss1961068749 Ta: 56°C Probes: Wt: HEX-tgcaaaagtctctgcatgtttc-BHQ1; Mt: TR-tgcaaaagctgcatgtttcc-BHQ2</p>	<p>OMIA ID: 001402-9615 Reference: Mealey et al., 2001 Amplicon: 180 bp</p>
<p>Disorder: Mucopolysaccharidosis VII (MPS VII) Gene symbol: GUSB Assay: qPCR with dual labeled probes Primers: F: 5'-cagcaagtgtgctcagagc-3'; R: 5'-agacgatggtccctggc-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal recessive dbSNP ID: ss1961068744 Ta: 62°C Probes: Wt: FAM-tgtctctctgccgtattacct-BHQ1; Mt: TR-tgtctctctgccatattacct-BHQ2</p>	<p>OMIA ID: 000667-9615 Reference: Ray et al., 1998 Amplicon: 115 bp</p>
<p>Disorder: Neuronal ceroid lipofuscinosis 5 (NCL5) Gene symbol: CLN5 Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with R primer Primers: F: 5'-aaagcgggacaatgaaacag-3'; R: 5'-tcccaagttagtggtctcca-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal recessive dbSNP ID: ss1961068753 Ta: 60°C</p>	<p>OMIA ID: 001482-9615 Reference: Melville et al., 2005 Amplicon: 214 bp</p>
<p>Disorder: Neuronal ceroid lipofuscinosis 6 (NCL6) Gene symbol: CLN6 Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F primer Primers: F: 5'-tgcaccagaagcgaagc-3'; R: 5'-tgctgacgtggagggtgtaga-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal recessive dbSNP ID: ss1961068755 Ta: 64°C</p>	<p>OMIA ID: 001443-9615 Reference: Katz et al., 2011 Amplicon: 189 bp</p>
<p>Disorder: Primary Lens Luxation (PLL) Gene symbol: ADAMTS17 Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F primer Primers: F: 5'-gtctccctcacaagcta-3'; R: 5'-ggcatatgtagatgtatc-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal recessive dbSNP ID: ss1961068740 Ta: 58°C</p>	<p>OMIA ID: 000588-9615 Reference: Farias et al., 2010 Amplicon: 169 bp</p>
<p>Disorder: Renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis (RCND) Gene symbol: FLCN Assay: qPCR with dual labeled probes Primers: F: 5'-ctgacctcttgacaag-3'; R: 5'-ccagtataacctgtactc-3'</p>	<p>Inheritance: Autosomal dominant dbSNP ID: ss1961068743 Ta: 60°C Probes: Wt: FAM-catgctctcaccctctt-BHQ1; Mt: TR-atgctctgacccctt-BHQ2</p>	<p>OMIA ID: 001335-9615 Reference: Lingaas et al., 2003 Amplicon: 111 bp</p>
<p>Disorder: X-Linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XHED) Gene symbol: EDA Assay: PCR-RFLP with SerFI Primers: F: 5'-tcctcttggctcctcacc-3'; R: 5'-ccatctcaccgcaatctctg-3'</p>	<p>Inheritance: X-Linked recessive dbSNP ID: ss1961068763 Ta: 64°C Fragment Lengths: Wt: 146/25/23 bp; Mt: 169/25 bp</p>	<p>OMIA ID: 000543-9615 Reference: Casal et al., 2005 Amplicon: 194 bp</p>

with dual labeled probes when applicable. All specifics, as well as the performed (alternative) test for each disorder can be found in Table 1.

PCR-sequencing

All assays were first validated through PCR followed by sequencing. For the PCR, a mix containing 2.0 μ l of the DNA, 5.7 μ l sterile, enzyme-free water (MQ; Thermo Fisher Scientific Inc., Erembodegem, Belgium), 1.0 μ l 10x FastStart buffer (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium), 1.0 μ l primers (5 μ M each, Integrated DNA Technologies, Leuven), 0.2 μ l deoxynucleoside triphosphate mixture (dNTP's; 10 mM each, Gentaur, Kampenhout, Belgium) and 0.1 μ l FastStart polymerase (5 U/ μ l, Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium) was made. Hereafter, the remaining 8.0 μ l PCR product was cleaned up with 0.6 μ l Exo-AP solution (10 μ l 20 U/ μ l exonuclease I and 20 μ l 5 U/ μ l antarctic phosphatase in a 30 μ l stock; Bioké, Leiden, the Netherlands), digesting the remaining primers and nucleotides (30' at 37°C, 15' at 80°C, hold at 4°C). This product was used as template for the sequencing reaction. To make the sequence mix, 5x sequence buffer (Life Technologies, Ghent, Belgium), ReadyReaction mix (RR-mix, Life Technologies, Ghent, Belgium), primer (2 μ M, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium), MQ and GC-solution (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium) was added to the template product. After this, the mix was sent to Eurofins Scientific (Germany) for running the electrophoresis.

PCR-gel electrophoresis

The detection of INDELs (insertions and/or deletions) longer than 20 bp was performed by PCR followed by gel electrophoresis (PCR-GE). The same PCR mix was used as described for PCR-sequencing. After the PCR, the mix was loaded on a 2%-agarose gel. The length of the fragments is viewed in Table 1.

PCR-RFLP

For mutations creating or abolishing a restriction enzyme recognition site, a PCR- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay was performed. The PCR reaction was performed as described above, followed by a restriction digest with the respective enzyme cutting one of both Wt/Mt alleles. This was done overnight with 5 U of enzyme according to the instructions of Bioké (Leiden, the Netherlands). The end product was loaded on a 3% agarose gel to separate the different fragment lengths (Table 1).

qPCR with dual labeled probes

The standard mix for the real-time PCR consists of 4.7 μ l MQ, 1.0 μ l 10x FastStart buffer, 1.0 μ l

primers (5 μ M each), 0.5 μ l of each probe (10 μ M, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium), 0.2 μ l dNTP's (10 mM each), 0.1 μ l FastStart Polymerase (5 U/ μ l) and 2.0 μ l DNA. The mix was run through a PCR program with conditions specific to the disorder (Table 1), during which a curve was drafted by the Bio-Rad CFX96 C100 Touch™ Thermal Cycler real-time PCR.

RESULTS AND DISCUSSION

All genotyped disorders for each breed, as well as the mutations, for which routine genotyping is advised, are shown in Table 2. Details on causal mutations and genes can be found in Table 1. An overview of all disorders, for which at least one mutant allele was found, can be viewed in Table 3. No deviation in the Hardy-Weinberg equilibrium was found for any of the disorders in the genotyped breeds.

A personal advice is drafted concerning the use of DNA-tests. Routine genotyping in breeding dogs is not recommended when the mutation was not found in the present samples or when the mutant allele frequency is (very) low. However, it might be advisable for breeders to test for a condition anyway, e.g. when a precedent is known in the family or line or when an animal has been imported from another population (country), even if the mutant allele frequency is low. Genotyping may assist in making a deliberate partner choice, thus preventing the birth of affected animals and over time reducing the mutant allele frequency. By seeking individual genetic counseling, a (further) decrease in the genetic diversity can be prevented.

Australian shepherd

Six different tests were performed on the samples of the Australian shepherd. Imerslund-Gräsbeck syndrome in the Australian shepherd (IGS-AS), an autosomal recessive disorder causing cobalamin malabsorption, was previously described in a family of Australian shepherds in the USA (He et al., 2005), and neuronal ceroid lipofuscinosis 6 (NCL6), a neurodegenerative autosomal recessive disorder, was found in the USA (O'Brien and Katz, 2008) and the UK (Bond et al., 2013). The mutant allele was not found in the sample of the present study ($n = 31$ for IGS-AS and $n = 32$ for NCL6) (Table 2). Given the small sample size of this study, the results should be interpreted with care, although it can be concluded that the frequency of IGS-AS and NCL6 might be (very) low in the Belgian population. No frequency data is available for other populations.

Collie eye anomaly (CEA) is a mild autosomal recessive disorder of the eye, present in a variety of breeds. It is caused by a disruption in the development of the retina, chorion and sclera (Parker et al., 2007). Two carriers for CEA were detected for the Australian shepherd ($n = 32$) (Table 3), while a higher frequency

Table 2. Breeds and general outcome of the DNA tests. A “+” indicates at least one mutant allele was found in the breed. A “-” indicates the mutation was not found in the breed. Disorders that should be routinely tested are indicated with a “*”.

Breed	Outcome	Tests
Australian shepherd	+	Hereditary cataract* (HC), multidrug resistance 1* (MDR1), collie eye anomaly (CEA), hyperuricosuria (HUU)
	-	Imerslund-Gräsbeck syndrome (IGS-AS), neuronal ceroid lipofuscinosis 6 (NCL6)
Border collie	+	CEA*, IGS-B, MDR1
	-	Cyclic neutropenia (CN), NCL5, primary lens luxation (PLL)
German shepherd dog	+	Degenerative myelopathy* (DM), mucopolysaccharidosis type VII (MPS VII)
	-	HUU, renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis (RCND), X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia (XHED)
Groenendael	+	DM*
	-	HUU, MPS VII, RCND, XHED
Laekenois	-	DM, HUU, MPS VII, RCND, XHED
Malinois	+	DM*, HUU
	-	MPS VII, RCND, XHED
Tervuren	-	DM, HUU, MPS VII, RCND, XHED

was estimated for the Border collie (see below). In Switzerland, in a clinical retrospective study, a very low prevalence of affected Australian shepherds (only one affected dog was found out of the 571 samples) was found, while a higher percentage of 0.7% was found in the Border collie (Walser-Reinhardt et al., 2009). The results of the present study are in line with these findings.

Another defect of the eye is hereditary cataract (HC), characterized by blurring of the lens. This is an early-onset cataract and probably has an autosomal dominant mode of inheritance (Mellersh et al., 2006). It should be noted that other forms of cataract are present in the Australian shepherd (Mellersh et al., 2009), and recently, a new locus associated with cataract in this breed has been found (Ricketts et al., 2015). In this study, a mutant allele frequency of 7.8% was calculated ($n = 32$) (Table 3). The fairly high frequency of an early-onset dominant disorder may be explained by the fact that it is a mild disease, and breeders do not specifically select against it. No frequency data is available in other countries. Given the fairly high frequency, it should be advised to test breeding dogs routinely.

Hyperuricosuria (HUU) or urolithiasis is an autosomal recessive disorder. In the Dalmatian, all individuals are homozygous mutant (Bannasch et al., 2008) and the causal mutation has also been found in ten other breeds, including the Australian shepherd (Karmi et al., 2010). In this study, two heterozygous individuals were found in the 32 tested Australian shepherds, leading to a mutant allele frequency of

3.1% (Table 3). A similar frequency of 3.5% has been estimated in the USA (Karmi et al., 2010).

Animals homozygous for the multidrug resistance 1 (MDR1) mutation show a high sensitivity to ivermectin and several other chemicals due to a lack of P-glycoproteins in the blood-brain barrier (Table 1). The animals are quickly overdosed and show neurotoxic symptoms. The trait is partially dominant, in that heterozygous animals are more sensitive, but much less than the homozygous mutant ones (Mealey et al., 2001). In the present study, a very high mutant allele frequency ($q = 29.7\%$) was found in the Australian shepherd, which stands in contrast to the 0.5% found in the Border collie (see below). Studies performed in populations in Germany (Geyer et al., 2005; Gramer et al., 2011), the USA (Neff et al., 2004; Mealey and Meurs, 2008) and the UK (Tappin et al., 2012), showed similar frequencies for the Australian shepherd between 17.0% and 46.0%. Routine testing for this mutation should be encouraged, in the first place to support the choice of medication for animals and secondly to gradually reduce the frequency of the mutant allele. The latter should be performed with precaution due to the high frequency, and only to the degree that it does not endanger the genetic diversity of the breed.

Border collie

Six previously described hereditary disorders were tested in the Border collie. Cyclic neutropenia (CN) is an autosomal recessive inheriting disorder (Benson et

al., 2003) and has been described in the collie, a breed closely related to the Border collie (Lund et al., 1967; Reynold et al., 1971; Dale et al., 1972). It is characterized by oscillations in the number of neutrophils and other blood cells (Benson et al., 2003). This disorder in the Border collie was tested in the present study, but no mutant allele was found in the studied population ($n = 95$). As of yet, no frequency data is available in other countries.

For neuronal ceroid lipofuscinosis 5 (NCL5), an autosomal recessive neurodegenerative disease (Melville et al., 2005), the mutation was not found in the Belgian population ($n = 95$). The frequency of the mutant allele was estimated to be 3.5% in Australia. The mutation is relatively wide spread in that country, because some of its champions that carried the mutation, had frequently been used for breeding purposes (Melville et al., 2005). Mizukami et al. (2011) found a frequency of 8.1% in Japan. This high frequency is probably due to the importation of a few Australian champions that carried the mutant allele (founder effect). Moreover, analysis has suggested that the mutation originated in Australia (Mizukami et al., 2012a). The lack of a mutation in the Belgian population can probably be explained by the fact that there has been no contact between the Belgian and the Australian/Japanese population. In light of these results, it is highly recommended to genotype imported animals.

Primary lens luxation (PLL) is an autosomal recessive eye condition (Farias et al., 2010). The causal mutation was first found in the miniature bull terrier, Jack Russel terrier and Lancashire heeler and is additionally present in 14 other breeds (Gould et al., 2011). This mutation is not seen in some other breeds with PLL, suggesting this condition is genetically heterogeneous (Gould et al., 2011). Because this mutation is present in the Lancashire heeler, which is a closely related breed to the Border collie (Gould et al., 2011; Parker et al., 2007), this test was included in this study. However, the mutation was not found in the tested population ($n = 95$). Gould et al. (2011) genotyped one Border collie with PLL and found it Wt/Wt. These results indicate that PLL in the Border collie is caused by a different mutation than the one described.

Ninety-five Border collies were genotyped for CEA, and one (1.1%) homozygous mutant (Mt/Mt) and 15 (15.8%) heterozygous (Wt/Mt) animals and a mutant allele frequency of 8.9% were found (Table 3). A clinical study in Switzerland estimated 0.7% affected Border collies (Walser-Reinhardt et al., 2009), which is in line with the 1.1% homozygous mutant dogs of the present study. As it concerned a clinical study, heterozygotes could not be identified. In previous studies, a frequency of 2.0-3.0% in the UK (Bedford, 1982, referred in Lowe et al., 2003) and the USA (Lowe et al., 2003) has been reported. Given the relatively high frequency, genotyping in animals used for breeding purposes should be encouraged.

The causal mutation of IGS in the Border collie

(IGS-B) (Owczarek-Lipska et al., 2013) is situated in a different gene than the one in the Australian shepherd (He et al., 2005). A carrier (Wt/Mt) frequency of 4.3% was estimated in the studied population ($n = 94$), which is in line with the 6.2% Owczarek-Lipska et al. (2013) found in Switzerland.

Multidrug resistance 1 (MDR1) in the Border collie is caused by the same mutation as in the Australian shepherd. A mutant allele frequency of 0.5% was found in the genotyped population ($n = 95$) (Table 3), which is in contrast with the 29.7% found for the Australian shepherd (see above). In the USA (Mealey and Meurs, 2008) and in Germany (Gramer et al., 2011) a mutant allele frequency of more or less 1.0% has been reported. In Japan, 0.5% heterozygotes and 0.3% homozygous mutants were found (Mizukami et al., 2012b).

German shepherd dog

The German shepherd dog was genotyped for five different disorders. No mutation was found in the sample for HUU ($n = 100$), renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis (RCND) ($n = 96$) and X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia (XHED) ($n = 98$) (Table 2). Hyperuricosuria is present in the German shepherd dog in the USA population (Karmi et al., 2010), though at a very low rate, i.e. one carrier and one affected dog out of 114 animals genotyped. Renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis, a renal tumor inheriting in an autosomal dominant pattern (Lium and Moe, 1985; Moe and Lium, 1997), and XHED, an X-chromosome linked recessive trait (Casal et al., 1997; Casal et al., 2005) have been described previously in the German shepherd dog. So far, no frequency determination has been performed for the two last mentioned disorders.

Degenerative myelopathy (DM) is a fatal late-onset neurodegenerative disorder of the spinal cord with an incomplete penetrance and is found in many different breeds, including the German shepherd dog. Symptoms, typically starting with ataxia in the hind limbs, only manifest around the age of six to eight years (Awano et al., 2009). The results of the present study indicate a very high frequency ($q = 21.4\%$) for DM in the Belgian population of the German shepherd dog ($n = 98$) (Table 3). The high frequency may be explained by the fact that it concerns a late-onset disease and in many cases, animals have already been used for breeding purposes before the symptoms appear. A mutant allele frequency of 15.0% was found in a population consisting of Belgian, German and Dutch dogs (Broeckx et al., 2013), as well as a 17.0% frequency in an Italian population (Capucchio et al., 2014). In a USA population, the frequency was determined at 37.0% (Zeng et al., 2014). The Orthopedic Foundation for Animals (OFA) reported 16.0% homozygous mutant dogs and 31.6% carriers. It should be noted though that these tested dogs were presented in an animal clinic, probably creating bias. Notwith-

Table 3. Overview of the tests with at least one mutant allele detected for each breed with the total number of dogs tested (Total), the number of homozygous normal (Wt/Wt), heterozygous (Wt/Mt) and affected (Mt/Mt) individuals and the mutant allele frequency (q).

Breed	Test	Total	Wt/Wt	Wt/Mt	Mt/Mt	q (%)
Australian shepherd	CEA	32	30	2	0	3.1
	HC	32	27	5	0	7.8
	HUU	32	30	2	0	3.1
	MDR1	32	15	15	2	29.7
Border collie	CEA	95	79	15	1	8.9
	IGS-B	94	90	4	0	2.1
	MDR1	95	94	1	0	0.5
German shepherd dog	DM	98	62	30	6	21.4
	MPS VII	96	95	1	0	0.5
Groenendael	DM	51	49	2	0	2.0
Malinois	DM	73	63	9	1	7.5
	HUU	74	70	3	1	3.4

standing, it does indicate a similar high frequency for DM in the German shepherd dog in the USA as seen in Europe. It is strongly recommended to routinely genotype for this condition in dogs used for breeding purposes.

Mucopolysaccharidosis type VII (MPS VII) is an autosomal recessive lysosomal storage disease with a progressive course, ending in mortality (Ray et al., 1998). It was first described in a mixed-breed German shepherd dog (Haskins et al., 1984). Only one carrier of the *GUSB* mutation was present in the 96 samples of the present study (Table 3). Hence, it can be concluded that the mutation is present at a low to very low frequency in the Belgian population of the German shepherd dog. This conclusion can probably be extended to the general population of German shepherd dogs, as up till now, only two cases (one in a mixed-breed and one in a German shepherd) of MPS VII have been reported (Haskins et al., 1984; Silverstein et al., 2004). Broeckx et al. (2013) did not find the mutant allele.

Belgian shepherds

The Groenendael (n = 51), Laekenois (n = 27), Malinois (n = 74) and Tervuren (n = 56) are often collectively called Belgian shepherds. For these four breeds, in this study, DNA tests developed for the more popular German shepherd dog were used, since they fall under the same breed group by the Fédération Cynologique Internationale (FCI). Little data is available on the Belgian shepherds and no DNA tests are available in the public domain that apply specifically to them. No mutant allele was found in any of these breeds for MPS VII, RCND and XHED (Table 2). A few clinical cases with symptoms resembling and strongly indicating XHED have been described in the Belgian shepherd (Muller and Kirk, 1976), with no further specification of the breed.

Two DM carriers were identified in the Groenendael population of the present study and a mutant allele frequency of 7.5% was estimated for the Malinois (Table 3). The OFA reported the presence of DM in three Belgian shepherd breeds, with a frequency of 3.6% for the Malinois (n = 28), 37.5% for the Groenendael (n = 8) and 9.1% for the Tervuren (n = 11). Unlike the findings by the OFA, the mutation was not present in the Tervuren population of the present study. It should be noted that the used samples of the OFA originate from animal clinics only, probably leading to an overestimation of frequency. However, it can be concluded that the DM mutation is present in all three breeds of the USA population. Recently, a mutant allele frequency of 6.0% has been calculated for a USA population of 101 Malinois (Zeng et al., 2014). This is a result similar to what was found in the Belgian population of the present study. Because of the fairly high frequency in the Malinois, which is however not quite as high as the one found in the German shepherd dog, and because of the severity of the disorder, it is strongly recommended to routinely test for this disorder in the Malinois and the Groenendael.

Next to the Dalmatian and the Australian shepherd, HUU is present in the German shepherd dog (Karmi et al., 2010). Therefore, the Belgian shepherds were also genotyped for this trait. Three carriers and one affected dog were found in the Malinois samples (n = 74) (Table 3). The mutation was solely found in the Malinois and was absent in the other three shepherd breeds.

GENERAL DISCUSSION AND CONCLUSION

For XHED, an X-chromosome linked disorder, a mutant allele was neither found in the Belgian nor in the German shepherd dog (see also part 2).

A low mutant allele frequency may be explained by the fact that males only carry one X-chromosome. Provided that the disease is early-onset and has a 100% penetrance, carrying a mutant allele will be phenotypically identifiable and the dog will most likely be excluded from breeding programs. Since males sire more offspring than females, the exclusion of affected male dogs will have a great impact on the prevalence of these disorders, resulting in a lower frequency.

A similar conclusion can be reached for the autosomal dominant trait RCND (in the Belgian shepherds and the German shepherd), which is an early-onset disorder with a full penetrance of clear symptoms. The mutant allele cannot unknowingly be passed on from generation to generation. No mutant allele was found for this disorder. HC probably has an autosomal dominant mode of inheritance and is an early-onset disease, though a mutant allele frequency of 7.8% was found. This may be explained by the fact that the disorder is relatively mild; hence, there is no or only weak selection against it. A very high frequency of 29.7% for the MDR1 mutation was found in the Australian shepherd. While being a partially dominant trait, MDR1 is not a disease per se and only becomes clear when the affected dog is given the wrong medication.

For most of the genotyped dogs, no or only one disease-causing mutation was found. However, several dogs carried two or even three of the studied mutations. One Australian shepherd tested heterozygous for HC, MDR1 and CEA. The frequencies found in this study were generally in line with those described for populations elsewhere, but there is one that shows a significant deviation, thus proving population specific dynamics and the importance of this type of study. For DM in the Groenendael ($q = 3.9\%$) and the Tervuren ($q = 0.0\%$), a (very) low frequency was found. This is in contrast with the high frequencies found by the OFA of 37.5% and 9.1% for the Groenendael and the Tervuren, respectively. This is a noticeable difference, even considering the selection bias by the OFA.

Neuronal ceroid lipofuscinosis 5 in the Border collie is a clear example of the founder and popular sire effect (Mizukami et al., 2012a). It might also explain why the mutation was not seen in the Belgian population of the present study.

High enough frequencies to warrant routine genotyping in breeding programs were found for DM in the German shepherd dog, the Malinois and the Groenendael, MDR1 and HC in the Australian shepherd and CEA in the Border collie. Genotyping can be used to make a deliberate partner choice or sometimes to exclude animals from breeding programs. Heterozygotes, and in case of a very high frequency also homozygote mutants, should not be routinely excluded from breeding programs, since this may (further) endanger the genetic diversity. They may be paired with homozygous normal individuals, thus slowly but surely decreasing the mutant allele frequency. Individual genetic counseling can be sought after getting the genotyping results.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dominique Vander Donckt, Linda Impe and Ruben Van Gansbeke for their excellent technical assistance. This work was partially funded by the Flemish Government, Department Landbouw en Visserij, MB20121204.

REFERENCES

- Awano T., Johnson G.S., Wade C.M., Katz M.L., Johnson G.C., Taylor J.F., Perloski M., Biagi T., Baranowska I., Long S., March P.A., Olby N.J., Shelton G.D., Khan S., O'Brien D.P., Lindblad-Toh K., Coates J.R. (2009). Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 2794-2799.
- Bannasch D., Safra N., Young A., Karmi N., Schaible R.S., Ling G.V. (2008). Mutations in the SLC2A9 gene cause hyperuricosuria and hyperuricemia in the dog. *Public Library of Science Genetics* 4, e1000246.
- Benson K.F., Li F.Q., Person R.E., Albani D., Duan Z., Wechsler J., Meade-White K., Williams K., Acland G.M., Niemeyer G., Lothrop C.D., Horwitz M. (2003). Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophil elastase. *Nature Genetics* 35, 90-96.
- Bond M., Holthaus S.M., Tammen I., Tear G., Russell C. (2013). Use of model organisms for the study of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1832(11), 1842-1865.
- Broeckx B.J.G., Coopman F., Verhoeven G.E.C., Van Haeringen W., van de Goor L., Bosmans T., Gielen I., Saunders J.H., Soetaert S.S.A., Van Bree H., Van Neste C., Van Nieuwerburgh F., Van Ryssen B., Verelst E., Van Steendam K., Deforce D. (2013). The prevalence of nine genetic disorders in a dog population from Belgium, the Netherlands and Germany. *Public Library of Science One* 8(9), e74811.
- Calboli F.C., Sampson J., Fretwell N., Balding D.J. (2008). Population structure and inbreeding from pedigree analysis of purebred dogs. *Genetics* 179, 593-601.
- Capucchio M.T., Spalenza V., Biasibetti E., Bottero M.T., Rasero R., Dalmasso A., Sacchi P. (2014). Degenerative myelopathy in German shepherd dog: comparison of two molecular assays for the identification of the SOD1:c.118G>A mutation. *Molecular Biology Reports* 41, 665-670.
- Casal M.L., Jezyk P.F., Greek J.M., Goldschmidt M.H., Patterson D.F. (1997). X-linked ectodermal dysplasia in the dog. *Journal of Heredity* 88(6), 513-517.
- Casal M.L., Scheidt J.L., Rhodes J.L., Henthorn P.S., Werner P. (2005). Mutation identification in a canine model of X-linked ectodermal dysplasia. *Mammalian Genome* 16, 524-531.
- Dale D.C., Alling D.W., Wolff S.M. (1972). Cyclic hemato-poiesis: the mechanism of cyclic neutropenia in Grey collie dogs. *Journal of Clinical Investigation* 51, 2197-2204.
- Flint A.P.F., Woolliams J.A. (2008). Precision animal breeding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363, 573-590.

- Friedenberg S.G., Zhu L., Zhang Z., Foels W., Schweitzer P.A., Wang W., Fisher P.J., Dykes N.L., Corey E., Vernier-Singer M., Jung S.W., Sheng X., Hunter L.S., McDonough S.P., Lust G., Bliss S.P., Krotscheck U., Gunn T.M., Todhunter R.J. (2011). Evaluation of a fibrillin 2 gene haplotype associated with hip dysplasia and incipient osteoarthritis in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 72, 530-540.
- Gelehrter T.D., Collins F.S., Ginsburg D. (1998). Mendelian inheritance. In: Kelly P.J. (editor). *Principles of Medical Genetics*. Second edition, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 23-42.
- Geyer J., Doring B., Godoy J.R., Leidolf R., Moritz A., Petzinger E. (2005). Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 28, 545-551.
- Gould D., Pettitt L., McLaughlin B., Holmes N., Forman O., Thomas A., Ahonen S., Lohi H., O'Leary C., Sargan D., Mellersh C. (2011). ADAMTS17 mutation associated with primary lens luxation is widespread among breeds. *Veterinary Ophthalmology* 14, 378-384.
- Gramer I., Leidolf R., Doring B., Klintzsch S., Kramer EM., Yalcin E., Petzinger E., Geyer J. (2011). Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *The Veterinary Journal* 189, 67-71.
- Haskins M.E., Desnick R.J., DiFerrante N., Jezyk P.F., Patterson D.F. (1984). Beta-glucuronidase deficiency in a dog: a model of human mucopolysaccharidosis VII. *Pediatric Research* 18(10), 980-984.
- He Q., Madsen M., Kilkenney A., Gregory B., Christensen E.I., Vorum H., Højrup P., Schäffer A.A., Kirkness E.F., Tanner S.M., de la Chapelle A., Giger U., Moestrup S.K., Fyfe J.C. (2005). Amnionless function is required for cubilin brush-border expression and intrinsic factor-cobalamin (vitamin B12) absorption in vivo. *Blood* 106(4), 1447-1453.
- Karmi N., Brown E.A., Hughes S.S., McLaughlin B., Mellersh C.S., Biourge V., Bannasch D.L. (2010). Estimated frequency of the canine hyperuricosuria mutation in different dog breeds. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, 1337-1342.
- Katz M.L., Farias F.H., Sanders D.N., Zeng R., Khan S., Johnson G.S., O'Brien D.P. (2011). A missense mutation in canine CLN6 in an Australian shepherd with neuronal ceroid lipofuscinosis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 198042.
- Leroy G., Rognon X., Varlet A., Joffrin C., Verrier E. (2006). Genetic variability in French dog breeds assessed by pedigree data. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 123, 1-9.
- Leroy G. (2011). Genetic diversity, inbreeding and breeding practices in dogs: Results from pedigree analyses. *The Veterinary Journal* 189, 177-182.
- Leroy G., Baumung R. (2011). Mating practices and the dissemination of genetic disorders in domestic animals, based on the example of dog breeding. *Animal Genetics* 42, 66-74.
- Lingaas F., Comstock K.E., Kirkness E.F., Sørensen A., Aarskaug T., Hitte C., Nickerson M.L., Moe L., Schmidt L.S., Thomas R., Breen M., Galibert F., Zbar B., Ostrander E.A. (2003). A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German shepherd dog. *Human Molecular Genetics* 12, 3043-3053.
- Lium B., Moe L. (1985). Hereditary multifocal renal cystadenocarcinomas and nodular dermatofibrosis in the German shepherd dog: macroscopic and histopathologic changes. *Veterinary Pathology* 22, 447-455.
- Lowe J.K., Kukekova A.V., Kirkness E.F., Langlois M.C., Aguirre G.D., Acland G.M., Ostrander E.A. (2003). Linkage mapping of the primary disease locus for collie eye anomaly. *Genomics* 82, 86-95.
- Lund J.E., Padgett G.A., Ott R.L. (1967). Cyclic neutropenia in Grey collie dogs. *Blood* 29, 452-461.
- McGreevy P.D., Nicholas F.M. (1999). Some practical solutions to welfare problems in dog breeding. *Animal Welfare* 8, 329-341.
- Mealey K.L., Bentjen S.A., Gay J.M., Cantor G.H. (2001). Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11, 727-733.
- Mealey K.L., Meurs K.M. (2008). Breed distribution of the ABCB1-1Delta (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 233, 921-924.
- Mellersh C.S., Pettitt L., Forman O.P., Vaudin M., Barnett K.C. (2006). Identification of mutations in HSF4 in dogs of three different breeds with hereditary cataracts. *Veterinary Ophthalmology* 9, 369-378.
- Mellersh C.S. (2008). Give a dog a genome. *The Veterinary Journal* 178, 46-52.
- Mellersh C.S., McLaughlin B., Ahonen S., Pettitt L., Lohi H., Barnett K.C. (2009). Mutation in HSF4 is associated with hereditary cataract in the Australian shepherd. *Veterinary Ophthalmology* 12, 372-378.
- Melville S.A., Wilson C.L., Chiang C.S., Studdert V.P., Lingaas F., Wilton A.N. (2005). A mutation in canine CLN5 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Border collie dogs. *Genomics* 86, 287-94.
- Minor K.M., Patterson E.E., Keating M.K., Gross S.D., Ekenstedt K.J., Taylor S.M., Mickelson J.R. (2011). Presence and impact of the exercise-induced collapse associated DNM1 mutation in Labrador retrievers and other breeds. *The Veterinary Journal* 189, 214-219.
- Mizukami K., Kawamichi T., Koie H., Tamura S., Matsunaga S., Imamoto S., Saito M., Hasegawa D., Matsuki N., Tamahara S., Sato S., Yabuki A., Chang H.S., Yamato O. (2011). Novel rapid genotyping assays for neuronal ceroid lipofuscinosis in Border collie dogs and high frequency of the mutant allele in Japan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 1131-1139.
- Mizukami K., Kawamichi T., Koie H., Tamura S., Matsunaga S., Imamoto S., Saito M., Hasegawa D., Matsuki N., Tamahara S., Sato S., Yabuki A., Chang H.S., Yamato O. (2012a). Neuronal ceroid lipofuscinosis in Border collie dogs in Japan: clinical and molecular epidemiological study (2000-2011). *Scientific World Journal*, 383174.
- Mizukami K., Chang H.S., Yabuki A., Kawamichi T., Hosain M.A., Rahman M.M., Uddin M.M., Yamato O. (2012b). Rapid genotyping assays for the 4-base pair deletion of canine MDR1/ABCB1 gene and low frequency of the mutant allele in Border collie dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 127-134.
- Moe L., Lium B. (1997). Hereditary multifocal renal cystadenocarcinomas and nodular dermatofibrosis in 51 German shepherd dogs. *Journal of Small Animal Practice* 38, 498-505.
- Muller G.H., Kirk R.W. (1976). *Small Animal Dermatology*. Second edition, W.B. Saunders, Philadelphia, p. 495-496.

- Neff M.W., Robertson K.R., Wong A.K., Safra N., Broman K.W., Slatkin M., Mealey K.L., Pedersen N.C. (2004). Breed distribution and history of canine *mdr1-1Delta*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11725-11730.
- O'Brien D.P., Katz M.L. (2008). Neuronal ceroid lipofuscinosis in 3 Australian shepherd littermates. *Journal of Veterinary Medicine* 22, 472-475.
- Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA. Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, 23 September 2015. World Wide Web URL: <http://omia.angis.org.au/>
- Orthopedic Foundation for Animals (s.d.). Statistics and data. Available at: <http://www.offa.org/stats.html#breed> (Accessed 08 September 2015).
- Owczarek-Lipska M., Jagannathan V., Drögemüller C., Lutz S., Glanemann B., Leeb T., Kook P.H. (2013). A frameshift mutation in the cubilin gene (*CUBN*) in Border collies with imerslund-gräsbeck syndrome (selective cobalamin malabsorption). *Public Library of Science One* 8, e61144.
- Parker H.G., Kukekova A.V., Akey D.T., Goldstein O., Kirkness E.F., Baysac K.C., Mosher D.S., Aguirre G.D., Acland G.M., Ostrander E.A. (2007). Breed relationships facilitate fine-mapping studies: a 7.8-kb deletion cosegregates with collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Research* 17, 1562-1571.
- Ray J., Bouvet A., Desanto C., Fyfe J.C., Xu D.B., Wolfe J.H., Aguirre G.D., Patterson D.F., Haskins M.E., Henthorn P.S. (1998). Cloning of the canine beta-glucuronidase cDNA, mutation identification in canine MPS VII, and retroviral vector-mediated correction of MPS VII cells. *Genomics* 48, 248-253.
- Reynold H.Y., Dale D.C., Wolff S.M., Johnson J.S. (1971). Serum immunoglobulin levels in Grey collies. *Society for Experimental Biology and Medicine* 136, 574-577.
- Ricketts S.L., Pettitt L., McLaughlin B., Jenkins C.A., Mellersh C.S. (2015). A novel locus on canine chromosome 13 is associated with cataract in the Australian shepherd breed of domestic dog. *Mammalian Genome* 26(5), 257-263.
- Silverstein D.D.C., Carmichael K.P., Wang P., O'Malley T.M., Haskins M.E., Giger U. (2004). Mucopolysaccharidosis type VII in a German shepherd dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224(4), 553-557.
- Tappin S.W., Goodfellow M.R., Peters I.R., Day M.J., Hall E.J., Mealey K.L. (2012). Frequency of the mutant *MDR1* allele in dogs in the UK. *Veterinary Record* 171, 72.
- Walser-Reinhardt L., Hässig M., Spiess B. (2009). Collie eye anomaly in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 151, 597-603.
- Wijnrocx K., Janssens S., Buys N. (2012). Inteelt en genetische diversiteit van 23 populaties van honden in België op basis van afstammingsgegevens van de KMSH, 41. <https://lirias.kuleuven.be/bitstream/123456789/358026/3/RapportInteeltGenetischeDiversiteitHondenBelgië.pdf>
- Zeng R., Coates J.R., Johnson G.C., Hansen L., Awano T., Kolichski A., Ivansson E., Perloski M., Lindblad-Toh K., O'Brien D.P., Guo J., Katz M.L., Johnson G.S. (2014). Breed distribution of *SOD1* alleles previously associated with canine degenerative myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28, 515-521.

Uit het verleden

DIEREN IN ONS LEVEN EN ONZE CULTUUR **Compendium van dieren als dragers van cultuur**

Door M. De Cleene i.s.m. J.P. De Keersmaecker

Volume 1. Zoogdieren, pp. 1047, €95; vol. 2. Vogels, pp. 816, €85; vol. 3. Reptielen, amfibieën, ongewervelden, fabeldieren, pp. 776, €85. De drie delen samen in cassette: €249.

Uitgegeven door Mens & Cultuur, Gent

Drie forse boekdelen met een onvoorstelbare hoeveelheid informatie over het dier in onze cultuur. Ook in tijden van Google en Wikipedia is dit niet te missen voor wie het zich kan permitteren (of laten cadeau doen). De consistente benadering van zoveel verschillende diersoorten biedt onschatbare voordelen. Wat komt er immers niet allemaal aan bod: cultus, symboliek, volksgeloof, volksgebruiken en volksgeneeskunde, legenden, magie, psychologie, biologie en taalkundige weetjes, en niet te vergeten: kunst.

Luc Devriese

Frequency estimation of disease-causing mutations in the Belgian population of some dog breeds - Part 2: retrievers and other breed types

Frequentieschatting van ziekteveroorzakende mutaties in de Belgische populatie van enkele hondenrassen - Deel 2: retrievers en andere rastytes

E. Beckers, M. Van Poucke, L. Ronsyn, L. Peelman

Department of Nutrition, Genetics and Ethology,
Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University,
Heidestraat 19, B-9820 Merelbeke, Belgium

luc.peelman@ugent.be

ABSTRACT

A Belgian population of ten breeds with a low to moderately low genetic diversity or which are relatively popular in Belgium, i.e. Bichon frise, Bloodhound, Bouvier des Flandres, Boxer, Cavalier King Charles spaniel, Irish setter, Papillon, Rottweiler, Golden retriever and Labrador retriever, was genotyped for all potentially relevant disease-causing variants known at the start of the study. In this way, the frequency was estimated for 26 variants in order to improve breeding advice. Disorders with a frequency high enough to recommend routine genotyping in breeding programs are (1) degenerative myelopathy for the Bloodhound, (2) arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and degenerative myelopathy for Boxers, (3) episodic falling syndrome and macrothrombocytopenia for the Cavalier King Charles spaniel, (4) progressive retinal atrophy rod cone dysplasia 4 for the Irish setter (5) Golden retriever progressive retinal atrophy 1 for the Golden retriever and (6) exercise induced collapse and progressive rod-cone degeneration for the Labrador retriever. To the authors' knowledge, in this study, the presence of a causal mutation for a short tail in the Bouvier des Flandres is described for the first time.

SAMENVATTING

De Belgische populatie van tien hondenrassen (de bichonfrisé, sint-hubertushond, Vlaamse koe-hond, boxer, cavalier-kingcharlesspaniël, Ierse setter, het vlinderhondje, de rottweiler, golden retriever en labrador-retriever), waarvan de genetische diversiteit in België laag tot middelmatig laag is of die relatief populair zijn, werd gegenotypeerd voor ziekteveroorzakende mutaties die potentieel relevant zijn voor deze rassen. Op deze manier werd de frequentie van 26 mutaties geschat om zo gerichter fokadvies te kunnen geven. Aandoeningen waarvan de frequentie hoog genoeg ligt om routine-genotypering aan te raden in fokprogramma's zijn (1) degeneratieve myelopathie voor de sint-hubertushond, (2) "arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy" en degeneratieve myelopathie voor boxers, (3) "episodic falling syndrome" en macrothrombocytopenie voor de cavalier-kingcharlesspaniël (4) progressieve retina-atrofie "rod-cone" dysplasie 4 voor de Ierse setter, (5) golden retriever progressieve retina-atrofie 1 voor de golden retriever en (6) "exercise induced collapse" en progressieve "rod-cone" degeneratie voor de labrador-retriever. De aanwezigheid van de oorzakelijke mutatie voor een korte staart bij de Vlaamse koehond wordt hier volgens de auteurs voor het eerst beschreven.

INTRODUCTION

A low genetic diversity prevails in several dog breeds. Consequently, high prevalences of genetic disorders may occur (Calboli et al., 2008; Leroy et al., 2006). In order to improve this situation, a good knowledge of the disorders in each breed is necessary as well as of the prevalence in a population (McGreevy and Nicholas, 1999).

A total of seventeen dog breeds were involved in the entire study. Each breed population was tested for potentially relevant disease-causing variants, more specifically those that have been described in the corresponding breed and that are available in the public domain. In part 2, the results obtained for two retriever breeds (Golden and Labrador retriever) and eight other breeds (the Bichon frise, Bloodhound, Bouvier des Flandres, Boxer, Cavalier King Charles spaniel,

Table 1. Overview of the performed DNA tests. Ta indicates the annealing temperature, bp indicates base pairs and F/R indicates the forward/reverse primer. TR indicates Texas Red.

Disorder: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) Gene symbol: STRN Inheritance: Autosomal dominant, incomplete penetrance Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with R primer Primers: F: 5'-acaaaacagtaaaatcacctatgggt-3'; R: 5'-tgactctcattcctcagattcttgc-3'	dbSNP ID: ss1961068750 Ta: 64°C	OMIA ID: 000878-9615 Reference: Meurs et al., 2010 Amplicon: 239 bp
Disorder: Canine leukocyte adhesion deficiency type 1 (CLAD1) Gene symbol: ITGB2 Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F primer Primers: F: 5'-ggaccctccttccaccac-3'; R: 5'-gctcccggaaacagagt-3'	dbSNP ID: ss1961068757 Ta: 65°C	OMIA ID: 000595-9615 Reference: Kijas et al., 1999 Amplicon: 344 bp
Disorder: Centronuclear myopathy (CNM) Gene symbol: PTPLA Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R primers and gel electrophoresis Primers: F: 5'-tggttctagctattgcatggtacg-3'; R: 5'-acctcaagcaaggcaaatgtctg-3'	dbVar ID: nsv1397888 Ta: 64°C	OMIA ID: 001374-9615 Reference: Pelé et al., 2005 Amplicon: Wt: 115 bp; Mt: 364 bp
Disorder: Degenerative myelopathy (DM) Gene symbol: SOD1 Inheritance: Autosomal recessive Assay: qPCR with dual labeled probes Primers: F: 5'-cttcactttctgtgattg-3' R: 5'-cacctgtgtattatctccaa-3'	dbSNP ID: ss1961068758 Ta: 56°C Probes: Wt: HEX-cgccttcagtcagcc-BHQ1 Mt: TR-cgcctttagtcagccc-BHQ2	OMIA ID: 000263-9615 Reference: Awano et al., 2009 Amplicon: 192 bp
Disorder: Duchenne type muscular dystrophy cavalier (DMD-C) Gene symbol: DMD Inheritance: X-linked recessive Assay: PCR-RFLP with AccI Primers: F: 5'-aatattgtagggtggtgctaaaataat-3' R: 5'-tacctcggccccagaaaag-3'	dbSNP ID: ss1961068760 Ta: 64°C	OMIA ID: 001081-9615 Reference: Walmsley et al., 2010 Amplicon: 752 bp Fragment lengths: Wt: 303/243/206; Mt: 546/206
Disorder: Duchenne type muscular dystrophy Golden retriever (DMD-GR) Gene symbol: DMD Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F primer Primers: F: 5'-aatgatgggcatgggtg-3'; R: 5'-ccagaaatgaccgacctca-3'	dbSNP ID: ss1961068761 Ta: 60°C	OMIA ID: 001081-9615 Reference: Sharp et al., 1992 Amplicon: 235 bp
Disorder: Duchenne type muscular dystrophy rottweiler (DMD-R) Gene symbol: DMD Inheritance: X-linked recessive Assay: PCR-RFLP with PstI Primers: F: 5'-agcattctttctcatctaccag-3' R: 5'-agcattccttccaccaataatctca-3'	dbSNP ID: ss1961068762 Ta: 64°C	OMIA ID: 001081-9615 Reference: Winand et al., 1994 Amplicon: 434 bp Fragment lengths: Wt: 308/126; Mt: 194/126/114
Disorder: Episodic falling syndrome (EFS) Gene symbol: BCAN Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R ₁ /R ₂ primers and gel electrophoresis Primers: F: 5'-aaggtcttacactgcaatgaatag-3'; R ₁ : 5'-agcaaatgtaaagtctgtgacct-3'; R ₂ : 5'-agttcattgtctctctactg-3'	dbVar ID: nsv1397889 Ta: 64°C	OMIA ID: 001592-9615 Reference: Gill et al., 2012 Amplicon: Wt: 393 bp; Mt: 273 bp
Disorder: Exercise induced collapse (EIC) Gene symbol: DNMI Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR-RFLP with SmlI Primers: F: 5'-ggctggtgcccctgactt-3' R: 5'-tttgtttcttttccccagcctgagttccttacctg-3'	dbSNP ID: ss1961068747 Ta: 64°C	OMIA ID: 001466-9615 Reference: Patterson et al., 2008 Amplicon: 232 bp Fragment lengths: Wt: 205/27; Mt: 113/92/27
Disorder: Globoid cell leukodystrophy (GCL) Gene symbol: GALC Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R primers and gel electrophoresis Primers: F: 5'-cacgtctgccttttctattcca-3'; R: 5'-ggttcaatgctggcccaag-3'	dbVar ID: nsv1397890 Ta: 64°C	OMIA ID: 000578-9615 Reference: McGraw & Carmichael, 2006 Amplicon: Wt: 168 bp; Mt: 246 bp
Disorder: Golden retriever progressive retinal atrophy 1 (GR-PRA 1) Gene symbol: SLC4A3 Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F primer Primers: F: 5'-gtcgtggaatactgtgctggt-3'; R: 5'-gccgtgtggctgttc-3'	dbSNP ID: ss1961068759 Ta: 64°C	OMIA ID: 001572-9615 Reference: Downs et al., 2011 Amplicon: 264 bp
Disorder: Hyperuricosuria (HUU) Gene symbol: SLC2A9 Inheritance: Autosomal recessive Assay: qPCR with dual labeled probes Primers: F: 5'-ccaaggagatccgtggc-3' R: 5'-cttcccagcagctcag-3'	dbSNP ID: ss1961068738 Ta: 63°C Probes: Wt: FAM-ccatctcatctgcatcggtg-BHQ1; Mt: TR-catcttcatctcaggtgtgttc-BHQ2	OMIA ID: 001033-9615 Reference: Bannasch et al., 2008 Amplicon: 101 bp

Disorder: Mucopolysaccharidosis I (MPS I) Gene symbol: IDUA Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with R primer Primers: F: 5'-gaccgaggcggaacc-3'; R: 5'-ggacggccgaggtcacg-3'	dbSNP ID: ss1961068739 Ta: 68°C	OMIA ID: 000664-9615 Reference: Menon et al., 1992 Amplicon: 433 bp
Disorder: Macrothrombocytopenia (MTC) Gene symbol: TUBB1 Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F primer Primers: F: 5'-cctgtgtcctgacctga-3'; R: 5'-ggccccgaagatgcag-3'	dbSNP ID: ss1961068754 Ta: 60°C	OMIA ID: 001001-9615 Reference: Davis et al., 2008 Amplicon: 278 bp
Disorder: Narcolepsy (NA) Gene symbol: HCRTR2 Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F primer Primers: F: 5'-ccacacggaagacagagacc-3'; R: 5'-ctccagtctacaatttctacttcc-3'	dbSNP ID: ss1961068748 Ta: 64°C	OMIA ID: 000703-9615 Reference: Lin et al., 1999 Amplicon: 382 bp
Disorder: Osteogenesis imperfecta (OI) Gene symbol: COL1A1 Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F primer Primers: F: 5'-aggcgctgcgtgtga-3'; R: 5'-cctgtggaggcagaaca-3'	dbSNP ID: ss1961068756 Ta: 64°C	OMIA ID: 000754-9615 Reference: Campbell et al., 2000 Amplicon: 282 bp
Disorder: Progressive retinal atrophy (PRA) Gene symbol: CNGB1 Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR-RFLP with AluI Primers: F: 5'-acgtctggcaaacgcag-3' R: 5'-acagagaagcaaacacccgtga-3'	dbSNP ID: ss1961068735 Ta: 64°C Fragment lengths: Wt: 206/45/36; Mt: 116/95/45/36	OMIA ID: 000830-9615 Reference: Ahonen et al., 2013 Amplicon: 287 bp
Disorder: Progressive rod-cone degeneration (PRCD) Gene symbol: PRCD Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR-RFLP with ApaLI Primers: F: 5'-aggatggcgagcagtg-3'; R: 5'-tttttttctgctgagtacgaaggggtg-3'	dbSNP ID: ss1961068746 Ta: 60°C Fragment lengths: Wt: 97/32 bp; Mt: 129 bp	OMIA ID: 001298-9615 Reference: Zangerl et al., 2006 Amplicon: 129 bp
Disorder: Rod-cone dysplasia 1 (RCD1) Gene symbol: PDE6B Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F primer Primers: F: 5'-ttccgtttccacgaaga-3'; R: 5'-gtgtctctcctctccag-3'	dbSNP ID: ss1961068741 Ta: 58°C	OMIA ID: 000882-9615 Reference: Suber et al., 1993 Amplicon: 122 bp
Disorder: Rod-cone dysplasia 4 (RCD4) Gene symbol: C17H2orf71 Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F primer Primers: F: 5'-acacccgagcagacagag-3'; R: 5'-aggacgcggccagaag-3'	dbSNP ID: ss1961068751 Ta: 64°C	OMIA ID: 001575-9615 Reference: Downs et al., 2012 Amplicon: 358 bp
Disorder: Recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) Gene symbol: COL7A1 Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR-RFLP with HaeIII Primers: F: 5'-tggcccagggtgaacgtg-3'; R: 5'-aatgccccagccctgctc-3'	dbSNP ID: ss1961068752 Ta: 64°C Fragment lengths: Wt: 105/66/49/48/18/9/9 bp; Mt: 171/49/48/18/9/9 bp	OMIA ID: 000341-9615 Reference: Baldeschi et al., 2003 Amplicon: 304 bp
Disorder: Short tail (ST) Gene symbol: T Inheritance: Autosomal dominant Assay: PCR-RFLP with BstEII Primers: F: 5'-tgagcgcctggagagcg-3' R: 5'-cccagaaaccagagatgacga-3'	dbSNP ID: ss1961068734 Ta: 64°C Fragment lengths: Wt: 184/159; Mt: 184/128/31	OMIA ID: 000975-9615 Reference: Haworth et al., 2001 Amplicon: 343 bp
Disorder: von Willebrandt disease type 1 (VWD1) Gene symbol: VWF Inheritance: Autosomal recessive Assay: PCR with F/R primers and sequence analysis with F primer Primers: F: 5'-cgaggcaccatctacctgtg-3'; R: 5'-tcaccaacctcagctctctcc-3'	dbSNP ID: ss1961068765 Ta: 65°C	OMIA ID: 001057-9615 Reference: Brewer et al., 1998 Amplicon: 287 bp
Disorder: X-linked hypohydrotic ectodermal dysplasia (XHED) Gene symbol: EDA Inheritance: X-linked recessive Assay: PCR-RFLP with ScrFI Primers: F: 5'-tcctcttctgttgcctctacc-3' R: 5'-ccatctcaccgcaatctctg-3'	dbSNP ID: ss1961068763 Ta: 64°C Fragment lengths: Wt: 146/25/23; Mt: 169/25	OMIA ID: 000543-9615 Reference: Casal et al., 2005 Amplicon: 194 bp
Disorder: X-linked myotubular myopathy (XLMTM) Gene symbol: MTM1 Inheritance: X-linked recessive Assay: qPCR with dual labeled probes Primers: F: 5'-tgcgaggacatagta-3' R: 5'-gcgcttactgactta-3'	dbSNP ID: ss1961068764 Ta: 57°C Probes: Wt: FAM- aactttctctgttagaatgc -BHQ1; Mt: TR- aactttctctgttagaatgc -BHQ2	OMIA ID: 001508-9615 Reference: Beggs et al., 2010 Amplicon: 181 bp

Irish setter, Papillon and Rottweiler) are highlighted. The results of seven shepherd breeds were discussed in part 1.

MATERIALS AND METHODS

Breed selection

The chosen breeds for this research were based on a study examining the genetic diversity of 23 breeds (Wijnrocx et al., 2012). The more popular breeds and breeds with the lowest genetic diversity, for which at least two DNA tests were available at the start of the study, were chosen for inclusion in this frequency study. One exception was the Bloodhound, for which only the presence of degenerative myelopathy was tested.

Samples and DNA extraction

Whole blood samples collected in EDTA-tubes were used. They originated from a pool of samples (stored at -20°C) delivered by veterinarians, animal clinics, independent breeders and breeding associations all over Belgium for routine genotyping, making the sample as representative as possible for the Belgian population. To the best of the authors' ability, closely related animals (relation >12.5%) were excluded in order to keep the bias as low as possible, but in some cases sufficient information was lacking or the population size was too small. The aimed minimum of 50 samples per breed was not reached for the

Bichon frise (n = 27), for the Bloodhound (n = 27) and for the Papillon (n = 39).

One hundred µl of each sample was washed with 500 µl Tris-HCl-EDTA until a clean pellet of white blood cells remained. The cells were resuspended in a lysis buffer with proteinase K, and DNA was released during an incubation kept at 56 °C for 45 minutes. Afterwards, the enzyme was inactivated at 95 °C during a ten-minutes incubation.

Disorders and DNA tests

In total, 26 different tests were performed. The assays were validated by sequencing, which is the golden standard. When applicable, the assays were later performed with quicker, cheaper and/or easier techniques (PCR(-RFLP) followed by gel electrophoresis or qPCR with dual labeled probes). Details of the mutations and the performed (alternative) tests can be found in Table 1. The Hardy-Weinberg (H-W) equilibrium was calculated for each disorder, as well as the allele frequencies.

PCR-sequencing

All assays were first validated through PCR followed by sequencing. This was done in the same manner as explained in part 1.

PCR-gel electrophoresis

For the detection, if INDELs (insertions and/or deletions) longer than 20 bp, a PCR was performed

Table 2. All DNA tests with at least one mutation found in the tested population (+) and with no mutation in the corresponding breed (-). Disorders indicated with a "*" should be routinely tested in the corresponding breed.

Breed	Outcome	Test(s)
Bichon frise	+	Degenerative myelopathy (DM)
	-	X-linked hypohydrotic ectodermal dysplasia (XHED)
Bloodhound	+	DM*
Bouvier des Flandres	+	Exercise induced collapse (EIC), short tail (ST)
Boxer	+	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy* (ARVC), DM*
Cavalier King	+	Episodic falling syndrome* (EFS), macrothrombocytopenia* (MTC)
Charles spaniel	-	Duchenne muscular dystrophy (DMD-C)
Golden retriever	+	Golden retriever progressive retinal atrophy 1* (GR-PRA), progressive rod-cone degeneration (PRCD)
	-	DM, Duchenne muscular dystrophy (DMD-GR), osteogenesis imperfecta (OI), recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB)
Irish setter	+	Progressive retinal atrophy rod cone dysplasia 4* (RCD4)
	-	Canine leukocyte adhesion deficiency type 1 (CLAD1), DM, globoid cell leukodystrophy (GCL), RCD1
Labrador retriever	+	Exercise induced collapse* (EIC), PRCD*, centronuclear myopathy (CNM)
	-	HUU, narcolepsy (NA), X-linked myotubular myopathy (XLMTM)
Papillon	+	Progressive retinal atrophy (PRA), von Willebrandt disease type 1 (VWD1)
Rottweiler	-	DMD-R, mucopolysaccharidosis I (MPS I)

Table 3. Overview of the DNA tests per breed, for which at least one mutant allele was found with the total number of dogs tested (Total), the number of homozygous normal (Wt/Wt), heterozygous (Wt/Mt) and affected (Mt/Mt) individuals and the corresponding mutant allele frequency (q).

Breed	Test	Total	Wt/Wt	Wt/Mt	Mt/Mt	q (%)
Bichon frise	DM	27	25	2	0	3.7
Bloodhound	DM	27	14	13	0	24.1
Bouvier des Flandres	EIC	101	94	7	0	3.5
	ST	102	97	5	0	2.5
Boxer	ARVC	50	41	8	1	10
	DM	51	44	7	0	6.9
Cavalier King Charles spaniel	EFS	57	50	7	0	6.1
	MTC	58	25	24	15	46.6
Golden retriever	GR-PRA1	85	73	12	0	7.1
	PRCD	92	85	5	2	4.9
Irish setter	RCD4	86	52	27	7	23.8
Labrador retriever	CNM	143	141	2	0	0.7
	EIC	143	103	32	8	16.8
Papillon	PRCD	134	103	26	5	13.4
	PRA	39	36	3	0	3.8
	VWD1	39	37	2	0	2.6

followed by gel electrophoresis. The same PCR mix as described for the PCR-sequencing was made. After the PCR, the product was loaded on a 2%-agarose gel. The fragment lengths can be viewed in Table 1.

PCR-RFLP

For mutations creating or destroying a restriction enzyme recognition site, a PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was performed. The same PCR mix was made as described for PCR-sequencing. Subsequently, the product was digested by a restriction enzyme, cutting either the Wt or the Mt allele. The restriction digest was done overnight with 5 U of enzyme according to the instructions of Bioké, Leiden, the Netherlands. The end product was loaded onto a 3%-agarose gel, and the fragment lengths can be viewed in Table 1.

qPCR with dual labeled probes

A mix was made according to the descriptions in part 1. The mix was put in the Bio-Rad CFX96 C100 Touch™ Thermal Cycler real-time PCR, resulting in an amplification curve and a melting curve. The annealing temperature for each test is mentioned in Table 1.

RESULTS AND DISCUSSION

In total, 26 tests were performed. Three different breed specific tests were used for Duchenne type muscular dystrophy (DMD) in the Cavalier King Charles spaniel, the Golden retriever and the Rottweiler. In Table 2, the tested disorders for each breed are shown. An overview of all tests, for which at least one mutant

allele was found, can be viewed in Table 3. In case no mutant allele or a low mutant allele frequency was found, routine genotyping for this disorder is not advised by the authors. It should be noted that in the cases where the mutant allele in the population studied was not found, the allele might however be present in the Belgian population, especially in the breeds, of which only a relatively small number of animals were sampled. In case of precedents in a family or line, it should be considered to test for the disorder anyway. By making a deliberate partner choice, based on the genotyping results, creation of affected animals can be prevented and the mutant allele frequency can be reduced, without (further) endangering of the genetic diversity.

Bichon frise

The Bichon frise ($n = 27$) was genotyped for two disorders. X-linked hypohydrotic ectodermal dysplasia (XHED), an X-linked trait of the ectoderm, usually characterized by the absence of hair follicles and skin glands, has been described previously in the Bichon frise in only one case report (Moura and Cirio, 2004). No mutant allele was found in the tested population. No other cases have been reported as of yet and no frequency data is available. It can be assumed that the mutant allele frequency is low to very low and maybe even absent in the Belgian population. However, the results should be interpreted with care given the small sample size.

Degenerative myelopathy (DM) is a late-onset progressive neurodegenerative disease with an autosomal recessive mode of inheritance (Zeng et al., 2014). Two carriers (Wt/Mt) were found in the sample, which indicates a mutant allele frequency of 3.7% (Table 3). The Orthopedic Foundation for Animals (OFA) geno-

typed six Bichon frise dogs and found one homozygous mutant (Mt/Mt) animal. The Bloodhound and Boxer were also genotyped for DM (see below).

Bloodhound

For the Bloodhound population ($n = 27$), only DM was tested. A mutant allele frequency of 24.1% was found (Table 3). No homozygous mutant and 13 heterozygous animals were found, creating a disequilibrium in the H-W equilibrium. Fifteen point six normal (Wt/Wt) dogs, 9.8 carriers (Wt/Mt) and 1.6 affected (Mt/Mt) animals are expected in an ideally balanced population. The disequilibrium is probably due to the small sample size and not due to (sample) selection bias as DM is a late-onset disorder. Frequency measurements have been performed in the USA. Zeng et al. (2014) found a mutant allele frequency of 30.0%, which is in line with the findings of the present study, and the OFA found an even higher mutant allele frequency of 44.0% ($n = 311$). However, the latter is probably an overestimation due to a selection bias of the sample tested. Despite the H-W disequilibrium, results of the present study indicate a very high frequency in the Belgian population, as was the case in the USA population. Due to the high frequency and the severity of the disorder, routine testing should be encouraged.

Bouvier des Flandres

The Belgian population of the Bouvier des Flandres was tested for the presence of the mutation causing exercise induced collapse (EIC) and that of a short tail (ST) ($n = 101$ and $n = 102$, respectively). The former is an autosomal recessive neuromuscular disorder, first discovered in the Labrador retriever (see also part 1) (Minor et al., 2011). A mutant allele frequency of 3.5% was found in this study for the Bouvier des Flandres (Table 3). No information on frequency elsewhere is available as of yet.

The first causative mutation for “short tail” was found in the Pembroke Welsh corgi. This mutation is autosomal dominant and the mutation is lethal in the homozygous form (Haworth et al., 2001). An innate short tail occurs in many dog breeds and this same mutation was found in several of these breeds (Hytönen et al., 2009). In the present study, it was tested if this mutation is also present in the Bouvier des Flandres. Out of 102 dogs, the five dogs that were born with a short tail, were genotyped as Wt/Mt (Table 3), indicating this mutation is also responsible for or at least one of the causal mutations for the short tail phenotype in the Bouvier des Flandres. None of the other dogs, which had a normal tail length, carried the mutation. A short tail is neither a desirable nor an unattractive property according to the breed standards of the Bouvier des Flandres, so Belgian breeders generally do not breed in favor of this trait. Genotyping

for ST is uncalled-for, since heterozygotes are phenotypically identifiable.

Boxer

Two tests were performed for the Boxer, namely arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) and degenerative myelopathy (DM). The presence of a mutant allele was confirmed in the studied population for both disorders.

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy is a serious and lethal heart condition that is associated with a dominant mutation in the *STRN* gene. The penetrance (the percentage of individuals carrying the mutation that also expresses the associated phenotype) of this mutation was estimated to be 100% for homozygotes and 82% for heterozygotes (Meurs et al., 2013). A far lower penetrance (although it could not be reliably calculated) was recently estimated in the UK by Cattanach et al. (2015). They suggested that the *STRN* mutation is not the cause, but is closely linked to the causal mutation. Pedigree analysis pinpointed the source of ARVC in the UK to a small number of breeding animals imported from America, but the *STRN* mutation had already been present in the UK population. The indigenous population, with no ancestry to the USA, is largely free of the disease. There may be a link between *STRN* homozygosity and more severe symptoms (Cattanach et al., 2015). A mutant allele frequency of 10.0% was found in the Belgian population of Boxers ($n = 50$) (Table 3). No frequency data is available from other countries. Given the high frequency, routine genotyping in breeding dogs is recommended and given the severity of this disease, non-breeding dogs should also be considered for testing. However, it should be stressed that due to the incomplete penetrance, not all animals carrying the mutation, will develop the disease.

Fifty-one Boxers were tested for DM and 13.7% were found to be heterozygous dogs (Table 3). These results are similar to the ones of a recent study, which reported 13.0% carriers out of 15 tested Boxers for DM (Broeckx et al., 2013). The OFA tested 2987 Boxers for DM and found a much higher percentage of 35.9% carriers (Wt/Mt) and 45.9% affected (Mt/Mt) animals. This is however not a randomized study, since the samples are derived from animals presented in the clinic, though the percentage is still a high one. It is advised for the Boxer to be routinely genotyped for DM.

Cavalier King Charles spaniel

The Cavalier King Charles spaniel was genotyped for three disorders. Duchenne muscular dystrophy (DMD-C) is a lethal X-linked recessive muscle disorder (Walmsley et al., 2010). The causal mutation (Walmsley et al., 2010) is different from the one found in the Rottweiler (Winand et al., 1994) and in

the Golden retriever (Sharp et al., 1992), which will both be discussed later. No mutant allele was found in the tested population ($n = 58$) and no frequency determinations have been performed in other populations as of yet.

The autosomal recessive disorder episodic falling syndrome (EFS) causes neurological episodes often triggered by stress, excitement or exercise. Symptoms occur at the age of three months to four years and become progressively worse. A frequency of 12.3% (Wt/Mt) carriers was found in 57 genotyped animals, which is very similar to the estimate of 12.9% carriers in a USA population (Gill et al., 2011). No homozygous mutant individuals were encountered (Table 3). The authors encourage routine genotyping in breeding dogs because of the high frequency.

Macrothrombocytopenia (MTC) is an autosomal intermediate inheriting trait in the Cavalier King Charles spaniel. Animals with this mutation have a shortage of platelets and may potentially develop problems in the primary hemostasis. Heterozygotes have less thrombocytes than homozygous normal animals, but homozygous mutant animals have an even bigger shortage. This disorder is not a disease per se, since affected animals do not usually have bleeding tendencies. The main problem is situated in unnecessary treatments with antibiotics or corticosteroids, which are often given because of the abnormal blood parameters (Davis et al., 2008). In the genotyped population of the Cavalier King Charles spaniel of this study, a large mutant allele frequency of 46.6% was estimated (15.9% homozygous mutant and 41.4% heterozygous dogs) (Table 3). This is similar to the one found by Davis et al. (2008). They genotyped a Dublin population ($n = 40$) and found 12.5% homozygous mutants and 52.5% heterozygotes. In the same study, an even larger percentage (47.0% homozygous mutant and 45.0% heterozygous dogs) was found in a USA population ($n = 60$). In view of the very high percentage, the authors recommend routine genotyping in all dogs in order to prevent wrongful medicinal use.

Irish setter

Of the five disorders the Irish setter was genotyped for, only progressive retinal atrophy rod-cone dysplasia 4 (RCD4) was present in the tested Belgian population. Canine leukocyte adhesion deficiency type 1 (CLAD1) is an autosomal recessive disease of the immune system, giving animals a low immune response against all sorts of infections, often leading to death (Kijas et al., 1999). Eighty-five Irish setters were tested for this disorder and no mutant allele was found. When the causal mutation was described for the first time, a frequency of 4.5% was found (Kijas et al., 1999). A follow-up study was performed, in which they found a mutant allele frequency of 3.2% in the Belgian population of Irish setters. The mutation was

found in all ten countries included in the study (Kijas et al., 2000). Other studies estimated mutant allele frequencies between 7.6% and 13.0% in the USA (Fourman et al., 2002), 7.6% in Australia (Jobling et al., 2003) and 11.0% in Germany (Pfeiffer and Brenig, 2005). The frequency of the CLAD-mutation in the Belgian population has apparently been reduced to near zero during the last 15 years, which is proof of the efficiency of using DNA-testing to decrease genetic disorders.

Eighty-six dogs were genotyped for DM, but no mutant allele was found in the Belgian population ($n = 86$). According to the OFA DM is present in the Irish setter. They estimated a mutant allele frequency of 14.3% in the USA population ($n = 14$). However, the selection bias (animals presented in the animal clinic and small population size) should be taken into account.

Globoid cell leukodystrophy (GCL) is a fatal autosomal recessive lysosomal storage disease. The causal mutation was not found in the tested population ($n = 86$). Three carriers were found in a sample of 24 Irish setters in the USA (McGraw and Carmichael, 2006).

Progressive retinal atrophy rod cone dysplasia 1 and 4 (RCD1 and 4) are autosomal recessive disorders resulting in a degeneration of the retina. The former is an early-onset disorder (Suber et al., 1993), while the latter is a late-onset trait (Downs et al., 2013). The causal mutation for RCD1 was not found in any of the 86 genotyped Irish setters. A frequency determination for RCD1 was performed in the USA, where they found 7.8% heterozygotes (Aguirre et al., 1999). This disorder was tested on Belgian Irish setters in the past years to try and decrease the mutant allele frequency, which was effectively obtained. For RCD4, 31.4% carriers, 8.1% affected animals and a mutant allele frequency of 23.8% were found (Table 3). The mutation causing this disorder is spread worldwide in Irish setters at a high frequency. In the UK and the USA, a study found 41.0% carriers and 8.3% affected animals (Downs et al., 2013). The results of the present study are well in line with these data. The high frequency might be explained by the fact that RCD4 is a late-onset disease. The authors advise to routinely test for this disorder in animals used for breeding.

Papillon

The Papillon was genotyped for progressive retinal atrophy (PRA) and von Willebrandt disease type 1 (VWD1). The mutant allele was found in the tested population ($n = 39$) for both disorders. Progressive retinal atrophy is a degenerative eye condition that may lead to blindness and is transmitted in an autosomal recessive way (Ahonen et al., 2013). Three carriers (Wt/Mt) and no homozygous mutant individuals were found (Table 3). No frequency data is available as of yet in other populations. von Willebrandt disease type 1 is an autosomal recessive disorder of the

platelets that causes mild bleedings. These bleedings are the result of a decrease of von Willebrandt factor multimers, which are important for the adhesion of platelets to the endothelium (Boudreaux, 2012). A mutant allele frequency of 2.6% was found in the studied population (Table 3). No frequency determination is available in the literature for this condition. The results should be interpreted with care, given the small sample size. However, it can be concluded that both disorders are present in the Belgian population of the Papillon.

Rottweiler

Two DNA tests were performed for the Rottweiler, i.e. for genotyping DMD-R and mucopolysaccharidosis I (MPS I). Ninety-one dogs were genotyped 91 for DMD-R, but the mutation was not found. There is no frequency data available as of yet in other populations. The lysosomal storage disease MPS I has an autosomal recessive mode of inheritance (Menon et al., 1992). The mutation was not detected in the genotyped population ($n = 85$) and no frequency data is available from other populations. It can be assumed that the prevalence of these two disorders in the Belgian Rottweiler population is probably very low, and the mutation may even be absent.

Golden retriever

The Golden retriever was genotyped for a total of six disorders. No mutant allele was found in the Golden retriever sample ($n = 91$) for DM, indicating that the frequency in the Belgian population lies much lower and differs significantly from the one found by the OFA in the USA population. Three carriers and four Golden retrievers homozygous for the DM mutation out of a population counting 185 dogs have been reported by OFA. A mutant allele frequency of 3.3% was calculated in another American population, including 334 samples from a variety of sources (Zeng et al., 2014). However, there is a deviation of the Hardy-Weinberg equilibrium in both these studies.

Duchenne muscular dystrophy (DMD-GR), a degenerative muscle disease, has an X-chromosome linked recessive mode of inheritance (Sharp et al., 1992). Other causal mutations have been described for the Cavalier King Charles spaniel (Walmsley et al., 2010) and the Rottweiler (Winand et al., 1994). The mutation was not found in the tested samples ($n = 90$) (Table 2). Nor did Broeckx et al. (2013) find the mutation in their population. No other frequency determinations have been performed as of yet.

Osteogenesis imperfecta (OI) probably has an autosomal dominant mode of inheritance and is caused by a defective collagen type 1 fiber (Campbell et al., 2000). In the Beagle, a mutation in another gene was found, resulting in the same defect, which implies that OI is genetically heterogeneous (Campbell et al.,

2001). The mutation was not found in the Belgian population ($n = 90$) and a frequency determination has not yet been performed elsewhere (Table 2).

For recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB), an autosomal recessive skin disorder caused by a defect in collagen type VII (Palazzi et al., 2000), the mutation was not found in the population of Golden retrievers ($n = 90$), and no frequency data is available in other countries (Table 2).

Golden retriever progressive retinal atrophy 1 (GR-PRA1) is an autosomal recessive disorder caused by degeneration of photoreceptor cells in the retina (Downs et al., 2011). Being a genetic heterogenic trait in the Golden retriever, this mutation is only responsible for part of the PRA cases in this breed, with an estimate of about 56.0% and varying from country to country. Twelve carriers were detected in the available samples ($n = 85$, $q = 7.1\%$), giving a result in line with the frequency in the rest of Europe. Frequencies of 0.0% (USA), 2.0% (France), 4.0% (UK) and 6.0% (Sweden) have been described. The absence of the mutation in the USA suggests that the mutation originated in Europe (Downs et al., 2011). The authors advise to routinely genotype Golden retrievers used for breeding purposes for GR-PRA1.

Progressive rod cone degeneration (PRCD) is an autosomal recessive and late-onset photoreceptor degeneration. The mutation is present in many breeds, including the Golden retriever and Labrador retriever (Zangerl et al., 2006). A total of 92 Golden retrievers were genotyped and a mutant allele frequency of 4.9% was found. The percentage found in the Golden retriever was much lower than for the Labrador retriever (see below). However, a mutant allele frequency of 4.9% is not low enough to be ignored. PRCD is preferably to be tested simultaneously with GR-PRA1. No frequency measurements have been performed as of yet in other countries.

Labrador retriever

Six different tests were performed on the available Labrador retriever samples. No mutant allele was found in the available samples ($n = 143$) for HUU, narcolepsy (NA) and X-linked myotubular myopathy (XLMTM) (Table 2). Hyperuricosuria is present in the Labrador retriever, though at a very low prevalence (Karmi et al., 2010). For NA, an autosomal recessive sleeping disorder (Lin et al., 1999), no frequency data is available as of yet. Also for XLMTM, an X-linked recessive muscular defect, no frequency information is available so far (Beggs et al., 2010).

Centronuclear myopathy (CNM) is an autosomal recessive muscle disorder causing muscle weakness (Pelé et al., 2005). One hundred and forty-three Labrador retrievers were genotyped in this study and a low mutant allele frequency of 0.7% was calculated (Table 3). Maurer et al. (2012) genotyped over 7000 Labrador retrievers in 13 countries. Mutant allele fre-

quencies of 6.9% (Canada), 8.9% (USA) and 10.2% (UK and Ireland; Continental Europe) were found. It was also proven that some of the affected dogs in Germany and France were directly related to popular sires in the UK. The mutation probably originated in the UK and got spread to many other countries in the world (Maurer et al., 2012); however, as the results of the present study indicate, the mutation spread much less or only recently to the Belgian population. In line with the present results, Gentilini et al. (2011) estimated a low frequency of 0.5% in Italy. Despite the low mutant allele frequency in Belgium, the authors advise to test Labrador retrievers for CNM, especially when they have ties to the UK population.

Exercise induced collapse (EIC) is an autosomal recessive neuromuscular disorder characterized by exercise intolerance in otherwise healthy young adult dogs. Clinical signs are precipitated by heavy exercise (Minor et al., 2011). A percentage of 5.6% affected dogs and a high mutant allele frequency of 16.8% were found in the available samples ($n = 143$) for EIC (Table 3). Two independent studies in the USA estimated a frequency of 3.0% affected dogs and 37.0% carriers (Patterson et al., 2008), and 9.9% affected dogs and 37.2% carriers (Minor et al. 2011), respectively, which is in line with the results of the present study. Broeckx et al. (2013) found 29.0% affected animals and 25.0% carriers in a population of Labrador retrievers of Belgium, the Netherlands and Germany. This is a much higher percentage than the percentage of the present study and the one described by Minor et al. (2011). This huge difference in frequency and the deviation in the Hardy-Weinberg equilibrium in the study of Broeckx et al. (2013) may be explained by a bias caused by the fact that most samples were selected for a study involving hip dysplasia and mostly concerned show animals. The highest frequency of EIC in Labrador retrievers is indeed present in show/conformation dogs (Minor et al., 2011). The authors recommend to routinely genotype Labrador retrievers used for breeding for EIC.

The causal mutation of PRCD has been identified in many breeds, including the Labrador retriever (Zangerl et al., 2006). A mutant allele frequency of 13.4% was found in the Belgian population tested ($n = 134$) (Table 3). There is no frequency data available in the literature as of yet. The high mutant allele frequency in the Labrador retriever may be explained by the late-onset of the defect, precluding selection against it. The authors encourage testing in order to (slowly) decrease the frequency.

GENERAL DISCUSSION AND CONCLUSION

No mutant allele was found for the X-linked traits (DMD-C, DMD-GR, DMD-R, XHED and XLMTM) which, as explained in part 1, may be due to their mode of inheritance.

The same logic should apply to dominant traits. Indeed, a similar conclusion may be reached for OI in the Golden retriever, an early-onset disorder with full penetrance. For the previously assumed partially dominant ARVC (Meurs et al., 2013) on the other hand, a high mutant allele frequency of 10.0% was found. However, Cattanach et al. (2015) recently showed that the *STRN* mutation is not the causal mutation, but is only linked to the disorder. They also suggested a very low penetrance, close to the 20.0-30.0% estimate seen in humans. This may partly explain the high frequency of the mutation.

The effectiveness of using a DNA-test to decrease the prevalence of hereditary disorders has been well demonstrated by CLAD and RCD1 in the Irish setter. About 15 years ago, a mutant allele frequency of 3.2% was found for CLAD in Belgium (Kijas et al., 2000) and 7.8% heterozygotes were found in the USA for RCD1 (Aguirre et al., 1999). The routine genotyping for these disorders has probably led to the very low frequency in Belgium (no mutant alleles were found in this study).

A significant deviation was found to frequencies described in other populations for some disorders. The mutant DM allele was not found in the Golden retriever, while it was found in two USA populations at a frequency of 3.0-3.3% (OFA; Zeng et al., 2014). The mutation causing GR-PRA 1 in the Golden retriever was found at a frequency of 7.1% in the Belgian population and at similar frequencies in other countries in Europe, but was not found in a USA population (Downs et al., 2011), suggesting the mutation originated in Europe. The mutant allele frequency of CNM in the Golden retriever was calculated at 0.7%, while larger percentages were previously found in Canada ($q = 6.9%$), the USA ($q = 8.9%$), the UK and Ireland and Continental Europe ($q = 10.2%$) (Maurer et al., 2012), proving that even within the same continent, there may be significant differences in occurrence.

Degenerative myelopathy was tested in the Bichon frise ($q = 3.7%$), the Bloodhound ($q = 24.1%$), the Boxer ($q = 6.9%$), the Irish setter ($q = 0.0%$) and the Labrador retriever ($q = 0.0%$) and RCD4 was tested in the Irish setter ($q = 23.8%$). These (fairly) high frequencies (except for DM in the Irish setter and Golden retriever) may be explained by the fact that both disorders are late onset. Often, affected animals have already sired offspring before they show clinical signs, thus spreading the mutation. Degenerative myelopathy is present in a lot of breeds (see part 1). The OFA has already found the causal mutation in 88 different dog breeds, one of which was a wolf hybrid.

A very high frequency was found for MTC in the Cavalier King Charles spaniel ($q = 46.6%$). The lack of symptoms may partly explain the high frequency. Another hypothesis is that the causal mutation is closely linked to a positive quality, thus selecting in favor of the MTC mutation, but this has yet to be tested.

For five disorders (DM in the Bloodhound, EFS and MTC in the Cavalier King Charles spaniel, RCD4 in the Irish setter and GR-PRA 1 in the Golden retriever), the results are in line with the frequency data reported in the literature. However, for the majority of the genotyped disorders, insufficient (DM in the Bichon frise), contradicting (EIC in the Labrador Retriever) or no frequency data (CN, EIC, ARVC, DMD-C, PRA, VWD1, DMD-R, DMD-GR, MPS I, OI, RDEB, PRCD, NA, XLMTM and HUU) was available, or the results did not correspond with the data found in the literature. This underscores the need of this type of studies to assist breeders in their endeavors to reduce the genetic load put on the populations by genetic diseases. Every year, more and more causal mutations are described. Frequency estimations for these new variants as well as follow-up studies on the frequency of variants already described are necessary in order to be able to further decrease the prevalence of genetic disorders.

Disorders with a frequency high enough to warrant routine genotyping in breeding programs are DM for the Bloodhound and Boxer, ARVC for Boxers, EFS for the Cavalier King Charles spaniel, RCD4 for the Irish setter, GR-PRA1 in the Golden retriever and EIC and PRCD in the Labrador retriever. Macrothrombocytopenia should be tested in all Cavalier King Charles spaniels. Heterozygotes for these mutations and even homozygotes for the less severe disorders should not be routinely excluded from breeding programs, since this may lead to an even more important decrease in genetic diversity of breeds with an already (relatively) small genetic basis. Instead, the results of the genotyping should be used to make a well-reasoned partner choice.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dominique Vander Donckt, Linda Impe and Ruben Van Gansbeke for their excellent technical assistance. This work was partially funded by the Flemish Government, Departement Landbouw en Visserij, MB20121204.

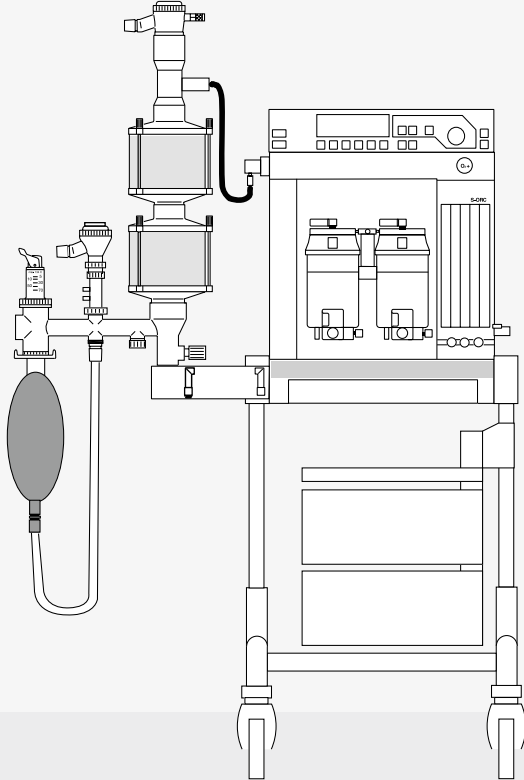

REFERENCES

- Aguirre G.D., Baldwin V., Weeks K.M., Acland G.M., Ray K. (1999). Frequency of the codon 807 mutation in the cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in Irish setters and other dog breeds with hereditary retinal degeneration. *Journal of Heredity* 90, 143-147.
- Ahonen S.J., Arumilli M., Lohi H. (2013). A CNGB1 Frameshift mutation in Papillon and Phalène dogs with progressive retinal atrophy. *Public Library of Science One* 8(8), e72122.
- Baldeschi C., Gache Y., Rattenholl A., Bouillé P., Danos O., Ortonne J.P., Bruckner-Tuderman L., Meneguzzi G. (2003). Genetic correction of canine dystrophic epidermolysis bullosa mediated by retroviral vectors. *Human Molecular Genetics* 12(15), 1897-1905.
- Beggs A.H., Böhm J., Snead E., Kozłowski M., Maurer M., Minor K., Childers M.K., Taylor S.M., Hitte C., Mickelson J.R., Guo L.T., Mizisin A.P., Buj-Bello A., Tired L., Laporte J., Shelton G.D. (2010). MTM1 mutation associated with X-linked myotubular myopathy in Labrador retrievers. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 107, 14697-14702.
- Boudreaux M.K. (2012). Inherited platelet disorders. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 22(1), 30-41.
- Broeckx B.J., Coopman F., Verhoeven G.E., Van Haeringen W., van de Goor L., Bosmans T., Gielen I., Saunders J.H., Soetaert S.S., Van Bree H., Van Neste C., Van Nieuwerburgh F., Van Ryssen B., Verelst E., Van Steendam K., Deforce D. (2013). The prevalence of nine genetic disorders in a dog population from Belgium, the Netherlands and Germany. *Public Library of Science One* 8, e74811.
- Calboli F.C., Sampson J., Fretwell N., Balding D.J. (2008). Population structure and inbreeding from pedigree analysis of purebred dogs. *Genetics* 179, 593-601.
- Campbell B.G., Wootton J.A.M., MacLeod J.N., Minor R.R. (2000). Sequence of normal canine COL1A1 cDNA and identification of a heterozygous alpha 1(I) collagen Gly208Ala mutation in a severe case of canine osteogenesis imperfect. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 384, 37-46.
- Campbell B.G., Wootton J.A.M., Macleod J.N., Minor R.R. (2001). Canine COL1A2 mutation resulting in C-terminal truncation of pro-alpha 2(I) and severe osteogenesis imperfect. *Journal of Bone and Mineral Research* 16, 1147-1153.
- Cattanach B.M., Dukes-McEwan J., Wotton P.R., Stephenson H.M., Hamilton R.M. (2015). A pedigree-based genetic appraisal of Boxer ARVC and the role of the Striatin mutation. *Veterinary Record* 176(19), doi: 10.1136/vr.102821.
- Dale D.C., Alling D.W., Wolff S.M. (1972). Cyclic hematoipoiesis: the mechanism of cyclic neutropenia in Grey collie dogs. *Journal of Clinical Investigation* 51, 2197-2204.
- Davis B., Toivio-Kinnucan M., Schuller S., Boudreaux M.K. (2008). Mutation in beta1-tubulin correlates with macrothrombocytopenia in Cavalier King Charles spaniels. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 540-545.
- Downs L.M., Wallin-Håkansson B., Boursnell M., Marklund S., Hedhammar Å., Truvé K., Hübinette L., Lindblad-Toh K., Bergström T., Mellersh C.S. (2011). A frameshift mutation in golden retriever dogs with progressive retinal atrophy endorses SLC4A3 as a candidate gene for human retinal degenerations. *Public Library of Science One* 6, e21452.
- Downs L.M., Bell J.S., Freeman J., Hartley C., Hayward L.J., Mellersh C.S. (2013). Late-onset progressive retinal atrophy in the Gordon and Irish setter breeds is associated with a frameshift mutation in C2orf71. *Animal Genetics* 44, 169-177.
- Fouremant P., Whiteley M., Giger U. (2002). Canine leukocyte adhesion deficiency: Presence of the Cys36Ser beta-2 integrin mutation in an affected US Irish setter cross-breed dog and in US Irish red and white setters. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16, 518-523.

- Gentilini F., Zambon E., Gandini G., Rosati M., Spadari A., Romagnoli N., Turba M.E., Gernone F. (2011). Frequency of the allelic variant of the PTPLA gene responsible for centronuclear myopathy in Labrador retriever dogs as assessed in Italy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 124-126.
- Gill J.L., Tsai K.L., Krey C., Noorai R.E., Vanbellinghen J-F., Garosi L.S., Shelton G.D., Clark L.A., Harvey R.J. (2011). A canine BCAN microdeletion associated with episodic falling syndrome. *Neurobiology of Disease* 45(1), 130-136.
- Haworth K., Putt W., Cattanaach B., Breen M., Binns M., Lingaas F., Edwards Y.H. (2001). Canine homolog of the T-box transcription factor T; failure of the protein to bind to its DNA target leads to a short-tail phenotype. *Mammalian Genome* 12, 212-218.
- Hytönen M.K., Grall A., Hédan B., Dréano S., Seguin S.J., Delattre D., Thomas A., Galibert F., Paulin L., Lohi H., Sainio K., André C. (2009). Ancestral T-box mutation is present in many, but not all, short-tailed dog breeds. *Journal of Heredity* 100(2), 236-240.
- Jobling A.I., Ryan J., Augusteyn R.C. (2003). The frequency of the canine leukocyte adhesion deficiency (CLAD) allele within the Irish Setter population of Australia. *Australian Veterinary Journal* 81, 763-765.
- Karmi N., Brown E.A., Hughes S.S., McLaughlin B., Mellersh C.S., Biourge V., Bannasch D.L. (2010). Estimated frequency of the canine hyperuricosuria mutation in different dog breeds. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, 1337-1342.
- Kijas J.M.H., Bauer T.R., Gafvert S., Marklund S., Trowald-Wigh G., Johannisson A., Hedhammar A., Binns M., Juneja R.K., Hickstein D.D., Andersson L. (1999). A missense mutation in the beta-2 integrin gene (ITGB2) causes canine leukocyte adhesion deficiency. *Genomics* 61, 101-107.
- Kijas J.M.H., Juneja R.K., Gafvert S., Andersson L. (2000). Detection of the causal mutation for canine leukocyte adhesion deficiency (CLAD) using pyrosequencing. *Animal Genetics* 31, 326-328.
- Leroy G., Rognon X., Varlet A., Joffrin C., Verrier E. (2006). Genetic variability in French dog breeds assessed by pedigree data. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 123, 1-9.
- Lin L., Faraco J., Li R., Kadotani H., Rogers W., Lin X.Y., Qiu X.H., de Jong P.J., Nishino S., Mignot E. (1999). The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98, 365-376.
- Maurer M., Mary J., Guillaud L., Fender M., Pelé M., Bilzer T., Olby N., Penderis J., Shelton G.D., Panthier J.J., Thibaud J.L., Barthélémy I., Aubin-Houzelstein G., Blot S., Hitte C., Tiret L., (2012). Centronuclear myopathy in Labrador retrievers: a recent founder mutation in the PTPLA gene has rapidly disseminated worldwide. *Public Library of Science One* 7, e46408.
- McGraw R.A., Carmichael K.P. (2006). Molecular basis of globoid cell leukodystrophy in Irish setters. *The Veterinary Journal* 171(2), 370-372.
- McGreevy P.D., Nicholas F.M. (1999). Some practical solutions to welfare problems in dog breeding. *Animal Welfare* 8, 329-341.
- Menon K.P., Tieu P.T., Neufeld E.F. (1992). Architecture of the canine IDUA gene and mutation underlying canine mucopolysaccharidosis I. *Genomics* 14(3), 763-768.
- Meurs K.M., Stern J.A., Sisson D.D., Kittleson M.D., Cunningham S.M., Ames M.K., Atkins C.E., DeFrancesco T., Hodge T.E., Keene B.W., Reina Doreste Y., Leuthy M., Motsinger-Reif A.A., Tou S.P. (2013). Association of dilated cardiomyopathy with the striatin mutation genotype in Boxer dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27, 1437-1440.
- Minor K.M., Patterson E.E., Keating M.K., Gross S.D., Ekenstedt K.J., Taylor S.M., Mickelson J.R. (2011). Presence and impact of the exercise-induced collapse associated DNM1 mutation in Labrador Retrievers and other breeds. *The Veterinary Journal* 189, 214-219.
- Moura E., Cirio M. (2004). Clinical and genetic aspect of X-linked ectodermal dysplasia in the dog – a review including three new spontaneous cases. *Veterinary Dermatology* 15, 269-277.
- Orthopedic Foundation for Animals (s.d.). Statistics and data. Available at: <http://www.offa.org/stats.html#breed> (Accessed 08 September 2015).
- Palazzi X., Marchal T., Chabanne L., Spadafora A., Magnol J.P., Meneguzzi G. (2000). Inherited dystrophic epidermolysis bullosa in inbred dogs: a spontaneous animal model for somatic gene therapy. *Journal of Investigative Dermatology* 115, 135-137.
- Patterson E.E., Minor K.M., Tchernatynskaia A.V., Taylor S.M., Shelton G.D., Ekenstedt K.J., Mickelson J.R. (2008). A canine DNM1 mutation is highly associated with the syndrome of exercise-induced collapse. *Nature Genetics* 40, 1235-1239.
- Pelé M., Tiret L., Kessler J.L., Blot S., Panthier J.J. (2005). SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Human Molecular Genetics* 14, 1417-1427.
- Pfeiffer I., Brenig B. (2005). Frequency of the canine leukocyte adhesion deficiency (CLAD) mutation among Irish red setters in Germany. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122, 140-142.
- Sharp N.J.H., Kornegay J.N., Vancamp S.D., Herbstreith M.H., Secore S.L., Kettle S., Hung W.Y., Constantinou C.D., Dykstra M.J., Roses A.D., Bartlett R.J. (1992). An error in dystrophin messenger rna processing in Golden retriever Muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13, 115-121.
- Suber M.L., Pittler S.J., Qin N., Wright G.C., Holcombe V., Lee R.H., Craft C.M., Lolley R.N., Baehr W., Hurwitz R.L. (1993). Irish setter dogs affected with rod/cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta- subunit gene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 3968-3972.
- Walmsley G.L., Arechavala-Gomez V., Fernandez-Fuente M., Burke M.M., Nagel N., Holder A., Stanley R., Chandler K., Marks S.L., Muntoni F., Shelton G.D., Piercy R.J. (2010). A duchenne muscular dystrophy gene hot spot mutation in dystrophin-deficient Cavalier King Charles spaniels is amenable to exon 51 skipping. *Public Library of Science One* 5, e8647.
- Winand N.J. (1994). *Molecular genetic characterization of spontaneously occurring animal models of Duchenne muscular dystrophy*. PhD dissertation.
- Wijnrocx K., Janssens S., Buys N. (2012). Inteelt en genetische diversiteit van 23 populaties van honden in België op basis van afstammingsgegevens van de KMSH. <https://lirias.kuleuven.be/bitstream/123456789/358026/3/RapportInteeltGenetischeDiversiteitHondenBelgië.pdf>

Zangerl B., Goldstein O., Philp A.R., Lindauer S.J., Pearce-Kelling S.E., Mullins R.F., Graphodatsky A.S., Ripoll D., Felix J.S., Stone E.M., Acland G.M., Aguirre G.D. (2006). Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics* 88, 551-563.

Zeng R., Coates J.R., Johnson G.C., Hansen L., Awano T., Kolichski A., Ivansson E., Perloski M., Lindblad-Toh K., O'Brien D.P., Guo J., Katz M.L., Johnson G.S. (2014). Breed distribution of SOD1 alleles previously associated with canine degenerative myelopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28, 515-521.

TECHNIMED

Uw Dräger specialist

- anesthesie
- warmtetherapie
- herstellingen / onderhoud
- verkoop tweedehands

www.technimed.be

126120M103019

Feminization and severe pancytopenia caused by testicular neoplasia in a cryptorchid dog

Feminisatie en ernstige pancytopenie veroorzaakt door testiculaire neoplasie in een cryptorche hond

D. Paepe, L. Hebbelinck, A. Kitshoff, S. Vandenabeele

Small Animal Department,
Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

Dominique.paepe@ugent.be

ABSTRACT

In this case report, a paraneoplastic syndrome caused by testicular neoplasia in a ten-year-old cryptorchid dog is described. Feminization and pancytopenia were observed, resulting from the testicular neoplastic production of estrogens. A diagnosis of testicular tumor and associated bone marrow suppression was made by ultrasonography and blood examination, with estrogen blood levels being severely elevated. Urinalysis revealed a urinary tract infection. Castration was performed together with a blood transfusion, and antibiotic treatment was started. After an initial improvement, the dog died suddenly after approximately three weeks.

In this report, the importance is highlighted of identifying clinical signs associated with feminization in intact male dogs at an early stage, to avoid severe, potentially irreversible, hematological consequences due to bone marrow suppression. Elective orchidectomy of both testes is highly recommended in cryptorchid dogs as neoplastic transformation of the undescended testis may occur, with potentially fatal outcome.

SAMENVATTING

In deze casuïstiek wordt een paraneoplastisch syndroom beschreven veroorzaakt door een testistumor bij een tien jaar oude, cryptorche hond. Feminisatie en pancytopenie werden gezien als gevolg van de productie van oestrogenen door het testiculaire neoplastisch proces. De diagnose van testistumor en geassocieerde beenmergsuppressie werd gesteld door middel van echografie en bloedonderzoek, waarbij de oestrogeenbloedspiegel sterk gestegen was. Urineonderzoek toonde een urineweginfectie aan. De hond werd gecasteerd, kreeg een bloedtransfusie en werd behandeld met antibiotica. Na een initiële verbetering stierf de hond onverwacht, ongeveer drie weken na het stellen van de diagnose.

In deze casus wordt benadrukt dat tekenen van feminisatie tijdig opgemerkt dienen te worden bij intacte, mannelijke honden en dit om erge, mogelijk irreversibele, hematologische gevolgen door beenmergsuppressie te vermijden. Electieve castratie van beide testes is sterk aangeraden bij dieren met cryptorchidie omdat neoplastische transformatie van de niet-afgedaalde testis kan optreden, mogelijk met een fatale uitkomst.

INTRODUCTION

Testicular tumors are the second most common neoplastic conditions of intact male dogs (Lawrence and Saba, 2013), with a prevalence varying from 0.9 to 16.8%, and represent more than 90% of all tumors involving the male genital system (Grieco et al., 2008; Liao et al., 2009; Lopate, 2010). The three most common types of testicular neoplasia in dogs are Sertoli cell tumors, seminomas and interstitial cell tumors,

which represent 8-44%, 31-41% and 25-50% of all testicular tumors, respectively (Lopate, 2010; Sanpera et al., 2002; Kim and Kim, 2005; Kang et al., 2011; Grieco et al., 2008). In approximately 7% of canine testicular neoplasms, mixed tumors are found in the same testicle (Patnaik and Mostofi, 1993). Sertoli cell tumors mostly occur in the undescended testis of cryptorchid dogs, whereas interstitial cell tumors and seminomas are more frequently seen in the descended testis (Lopate, 2010). Canine cryptorchidism has an



Figure 1. The dog was presented with a thin haircoat and greasy skin. Gynecomasty and developing mammary glands, hyperpigmentation and a pendulous prepuce were visible on the ventral abdomen (picture insert).

incidence of approximately 1.2 to 5% (Johnston et al., 2001) with the right testicle being affected more commonly (Plavec et al., 2007), and the incidence of testicular neoplasia is much greater in cryptorchid testes than in normally descended testes. The risk for Sertoli cell tumors and seminomas is respectively 26 and 15 fold higher in cryptorchid dogs (Hong et al., 2011). In a recent study performed on cryptorchid dogs, a higher incidence of seminomas in inguinal and Sertoli cell tumors in abdominal testicles is described (Ciaputa et al., 2012).

Testicular neoplasms are usually benign, but some have malignant characteristics. For Sertoli cell tumors, metastatic rates of 2-14% have been described (Lopate, 2010; Hong et al., 2011). Metastases of these tumors usually occur to regional lymph nodes or organs, such as the kidneys, pancreas, lungs or spleen (Johnston et al., 2001). Seminomas are known to metastasize to the regional lymph nodes in 15% of cases and distantly in 6-10% of cases, (Johnston et al., 2001; Lopate, 2010). Interstitial cell tumors on the other hand are almost always benign (Lopate, 2010).

Dogs with testicular tumors may develop paraneoplastic syndromes, and this is mostly seen in association with Sertoli cell tumors. Neoplastic cells within testicular tumors may produce estrogen and/or testosterone, resulting in excessive hormonal concentrations. Indeed, the sustentacular cells of Sertoli contain large amounts of estrogen, especially in the dog (Huggins and Moulder, 1945). Hyperestrogenism leads to feminization of the male individual, which is observed in 25-50% of dogs with Sertoli cell tumors, in 5% of dogs with interstitial cell tumors, and uncommonly in cases with seminoma (Johnston et al., 2001; Sanpera et al., 2002; Kim and Kim, 2005; Lopate, 2010). Hyperestrogenism leads to clinical signs, such as bilateral symmetrical alopecia, hyperpigmentation, gynecomastia, pendulous prepuce, linear preputial erythema, squamous metaplasia of the prostate gland and attraction of male dogs. Bone marrow hypoplasia, resulting in pancytopenia, may also be

seen as a consequence of hyperestrogenism. (Feldman and Nelson, 2004; Lopate, 2010). High concentrations of testosterone have been reported in dogs with interstitial cell tumors and may lead to prostatic disease, perianal adenoma, perianal gland hyperplasia and perineal herniation (Johnston et al., 2001; Sanpera et al., 2002; Plavec et al., 2007; Grieco et al., 2008; Lopate, 2010; Ciaputa et al., 2012).

In this case report, the occurrence of a paraneoplastic syndrome is described, more specifically, feminization and pancytopenia in a cryptorchid dog with testicular neoplasia. The diagnostic approach and therapeutic management of dogs with testicular tumors and the differential diagnosis of pancytopenia are discussed.

CASE REPORT

A ten-year-old, male Yorkshire terrier was presented at the emergency service of the Small Animal Department of Ghent University with complaints of lethargy, anorexia, vomiting, fever and a tense abdomen since three days. The referring veterinarian performed a blood examination that revealed pancytopenia (leukopenia, non-regenerative anemia and thrombocytopenia), mild hyponatremia, mild hypokalemia and mildly increased serum urea concentration (Table 1). Abdominal ultrasonography revealed a mass in the caudal abdomen. The dog was known to be bilateral cryptorchid, with the right testicle in abdominal and the left testicle in inguinal position. The dog was referred for further diagnostic testing and treatment.

On physical examination, the dog was quiet, alert and responsive, with a body temperature of 39.3°C. Mucous membranes were mildly tacky and pale pink. The dog was cardiovascularly stable, but mildly dehydrated. Abdominal palpation revealed abdominal pain, making deep palpation impossible. Further clinical examination revealed a pendulous prepuce, gynecomasty, enlarged mammary glands, hyperpigmented maculae (macular melanosis), a thin haircoat and greasy skin. These findings were suggestive of feminization (Figure 1).

Complete blood count was repeated and showed severe leukopenia, due to neutropenia and eosinopenia (Table 1), moderate non-regenerative normocytic, normochromic anemia and severe thrombocytopenia. These abnormalities were confirmed by microscopic examination of a blood smear.

Urine was collected by cystocentesis during initial ultrasonographic examination. Urinalysis revealed pyuria, hematuria and proteinuria (urinary protein: creatinine ratio 1.67; reference value < 0.50). Urine bacterial culture revealed growth of *Sphingomonas (Pseudomonas) paucimobilis*, but the bacterial growth was too slow to obtain an antibiogram. The observed proteinuria was most likely postrenal in origin, secondary to the bacterial cystitis. Although an uncompli-

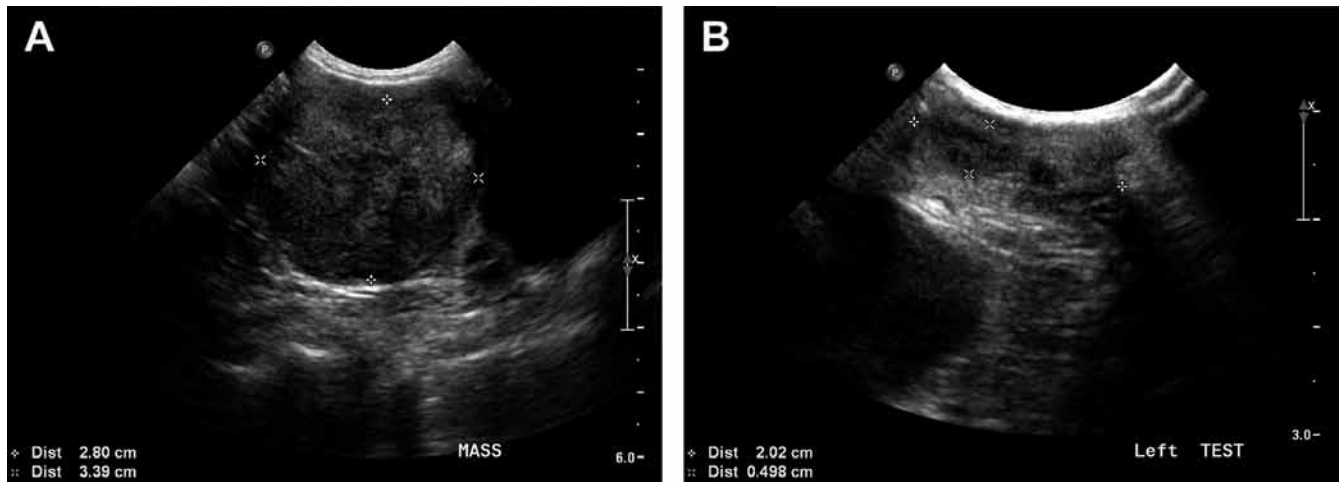


Figure 2. Ultrasonographic images of the dog. **A.** In the abdomen, a mass was detected, which was identified as the right testicle. **B.** The left testicle was normal in size, but located in the inguinal region.

cated urinary tract infection is not associated with fever, a concurrent bacterial prostatitis that is frequently noticed in intact, male dogs with urinary tract infection could explain the fever. Secondly, a pyelonephritis could not be excluded, but increased serum creatinine concentration or evidence of tubular damage (e.g. glucosuria, tubular casts) was lacking.

On abdominal ultrasonography, the liver was normal in size and sharply delineated, but there were multiple ill-defined hypoechoic nodules and one hyperechoic nodule, which could be compatible with degenerative changes, hyperplasia, regeneration or neoplasia. Mineralization of the liver parenchyma was also present and the gall bladder showed a small amount of sludge. Adrenal glands were normal in size, but moderately irregular and hypoechoic. The prostate was normal in size and smoothly delineated, but the parenchyma was heterogeneous, with the presence of multiple cysts and mineralization, which could be consistent with a concurrent prostatitis. The right testicle was located in the abdomen and severely enlarged (Figure 2A). The left testicle was located in the inguinal region, was normal in size and contained one hypoechoic nodule in the cranial pole (Figure 2B). The diagnosis of bilateral cryptorchidism was confirmed. Finally, the kidneys were normal in size and shape and showed no ultrasonographic evidence of pyelonephritis.

Estradiol concentrations were measured, using a rapid immunoassay, and the results indicated hyperoestrogenemia (55.2 pg/mL; reference values for intact male dogs: < 25 pg/mL). Clotting times (prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT)) were assessed and revealed a slight prolongation of aPTT (131 seconds; reference interval 72-102 seconds).

Thoracic radiographs (left-right and right-left lateral, ventrodorsal images) were performed to check for metastases. A focal, ill-defined (3 x 2 cm) interstitial pattern was seen at the dorsal aspect of the caudal lung field in the region of the 9th-11th intercostal

spaces (Figure 3). Pleural fissure lines were present between both parts of the left cranial lung lobes and between the right middle and caudal lung lobes. The significance of the interstitial lesion was unclear and differential diagnosis included pathology in transition (e.g. lung edema or pneumonia), neoplasia and pulmonary thromboembolism. No signs of metastases could be detected.

After the diagnosis was made, the dog was hospitalized (in total six days) in the intensive care unit. He was treated with lactated Ringer's infusion (B. Braun Melsungen AG, Germany), cefazolin (Cefazoline® 1g, Sandoz, Switzerland, 20 mg/kg, q12h), ranitidine hydrochloride (Zantac® 50 mg/2 mL, Glaxo Smith Kline, Belgium, 2 mg/kg) and analgesia. The analgesia consisted of methadone (Comfortan®, Eurovet, Belgium, 0.2 mg/kg, q4h) and lidocaine (Xylocaine® 2%, Astrazeneca, Belgium, bolus of 2 mg/kg, followed by a continuous rate infusion (CRI) of 30 µg/kg/min). Ketamine (Anesketin® 115 mg/mL, Eurovet, Belgium, 1 mg/kg, q4h) was added to the therapy later on and lidocaine was increased to 50 µg/kg/min because of persistent abdominal pain. Because of per-

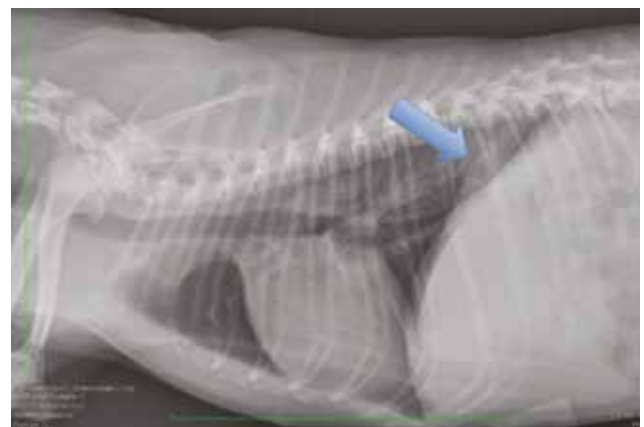


Figure 3. Left lateral radiography of the thorax. An ill-defined interstitial pattern is present in the caudal lung lobe (arrow).

sistent fever, enrofloxacin (Baytril® 2.5%, Bayer, Germany, 5 mg/kg, q24h) was added to the therapy during the first night. To avoid hospital-acquired infections, the hospitalization personnel and students were advised to handle the patient as hygienically as possible (gloves, washing and antiseptics on hands) because of the presence of severe neutropenia.

The second day, the dog was found to be dull and hypothermic most likely due to side effects of the analgesic drugs that were necessary to control the abdominal pain. Hypothermia and lethargy in a neutropenic dog could also be due to a septic process, such as septic peritonitis, but the dog did not present other signs compatible with sepsis. Furthermore, the dog continued to have abdominal discomfort, despite the administration of multi-modal analgesia. Therefore, it was decided to perform surgery for castration and liver biopsy. Before surgery, a fresh blood transfusion was carried out (20 mL/kg), because of the presence of anemia, thrombocytopenia and a slightly prolonged aPTT. The dog was premedicated with methadone (Comfortan® 10 mg/mL, Eurovet, Belgium; 0.3 mg/kg) and midazolam (Dormicum® 15mg/3mL, Roche, the Netherlands; 0.3 mg/kg). Anesthesia was induced with fentanyl (Fentadon® 50 µg/mL, Eurovet, Belgium, 70 µg/kg), and maintained with isoflurane in oxygen (Isoflo®, Abbott laboratories Ltd., United Kingdom (UK)). During surgery, the dog received a CRI of fentanyl (5 µg/kg/h). The undescended abdominal right testicle was located lateral to the corpus of the bladder and the left testicle was atrophied and had an inguinal position. After castration, inspection of the abdomen also showed a subjectively enlarged liver with multiple small yellow masses (< 1mm) located underneath the liver capsule. Cranial to the right kidney, a yellow and nodular area was seen in the caudate lobe and the right lateral lobe of the liver. Biopsies were taken from this mass, the draining lymph node (celiac lymph node) and other affected parts of

the liver. Both testicles, the liver biopsies and lymph node were sent for histopathological examination. After surgery, the infusion therapy, a CRI of lidocaine (50 µg/kg/min), and methadone (0.2 mg/kg q4h) were continued. The dog appeared less painful on abdominal palpation, so ketamine was not reinstated.

During the third day of hospitalization, maropitant (Cerenia® 10 mg/mL, Pfizer, UK, 1 mg/kg) was added to the treatment because the dog appeared nauseated. On day four, a nasoesophageal feeding tube was placed because of persistent anorexia. In addition, potassium supplementation was initiated because of developing hypokalemia (Kali-sterop® 3g/10 mL, Sterop, Belgium, 30 milliEquivalents/L), resulting in rapid normalization of serum electrolyte concentrations.

During hospitalization, the infusion rate and analgesia were regularly adjusted based on clinical parameters and abdominal pain. Hematological values (CBC, blood smear, manual hematocrit) were also monitored (Table 1). The amount of thrombocytes varied between 0 thrombocytes per high power field (HPF) at arrival and 3 to 5 thrombocytes per HPF during follow-up in the hospitalization. On the third day of hospitalization, small thrombocyte aggregates and mild polychromasia were detected. On the last day of hospitalization, several band neutrophils could be detected in the periphery, corresponding to a left shift in the blood.

After gradual tapering of the infusion rate and analgesia, the infusion therapy and lidocaine administration were stopped on day six because the dog started eating and because no pain could be elicited on abdominal palpation. Urinalysis was repeated and found to be negative for pathogenic bacteria. Medication was switched to oral treatment and the dog was discharged with the following treatment advice: enrofloxacin (Xeden®, Eurovet, Belgium, 5 mg/kg), tramadol hydrochloride (Tramadol EG® 50mg, Euro-

Table 1. Summary of the results of the complete blood count performed by the referring veterinarian and during hospitalization at the Small Animal Clinic of the Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University.

	D-2	D1	D3	D4	D5	D7	D16	Reference interval RV	Reference interval Ghent University
Hemoglobin	10.9	9.7	12.5	13.4	12	12.4	11.8	14.0-20.0 g/dL	13.1-20.5 g/dL
Hematocrit	30.7	25.8	33	35.8	33.4	34.4	36.6	43.0-59.0 %	37.3-61.7%
Reticulocytes	0.4	12.6	10.5	10.1	14.5	20.4	0.4	%	10-110 x 10 ³ /µL
Leukocytes	3.0	2090	2180	2070	1690	2660	2300	6.0-16.0 x 10 ⁹ /L	5050-16760 x 10 ⁶ /L
Neutrophils	1950	40	90	60	870	1170	828	3000-11500 x 10 ⁶ /L	2950-11640 x 10 ⁶ /L
Lymphocytes	930	1200	1400	1630	580	840	1403	1000-4800 x 10 ⁶ /L	1050-5100 x 10 ⁶ /L
Eosinophils	0	0	10	10	10	10	0	< 1250 x 10 ⁶ /L	60-1230 x 10 ⁶ /L
Monocytes	120	850	680	370	230	640	69	<1350 x 10 ⁶ /L	160-1120 x 10 ⁶ /L
Basophils	0	0	0	0	0	0	0	0-100 x 10 ⁶ /L	0-100 x 10 ⁶ /L
Platelets	47	12	15	22	39	14	19	164-510 x 10 ³ /L	148-484 x 10 ³ /µL

D-2 = Blood examination performed by the referring veterinarian 2 days prior to hospitalization; D1-D7 = Blood examination performed during hospitalization at the Small Animal Clinic of Ghent University; D16 = Blood examination performed by referring veterinarian 10 days after discharge; ND = Not determined; Reference interval RV = Reference interval for blood examinations performed by the referring veterinarian; Reference interval Ghent University = Reference interval for blood examinations performed during hospitalization at the Small Animal Clinic of Ghent University

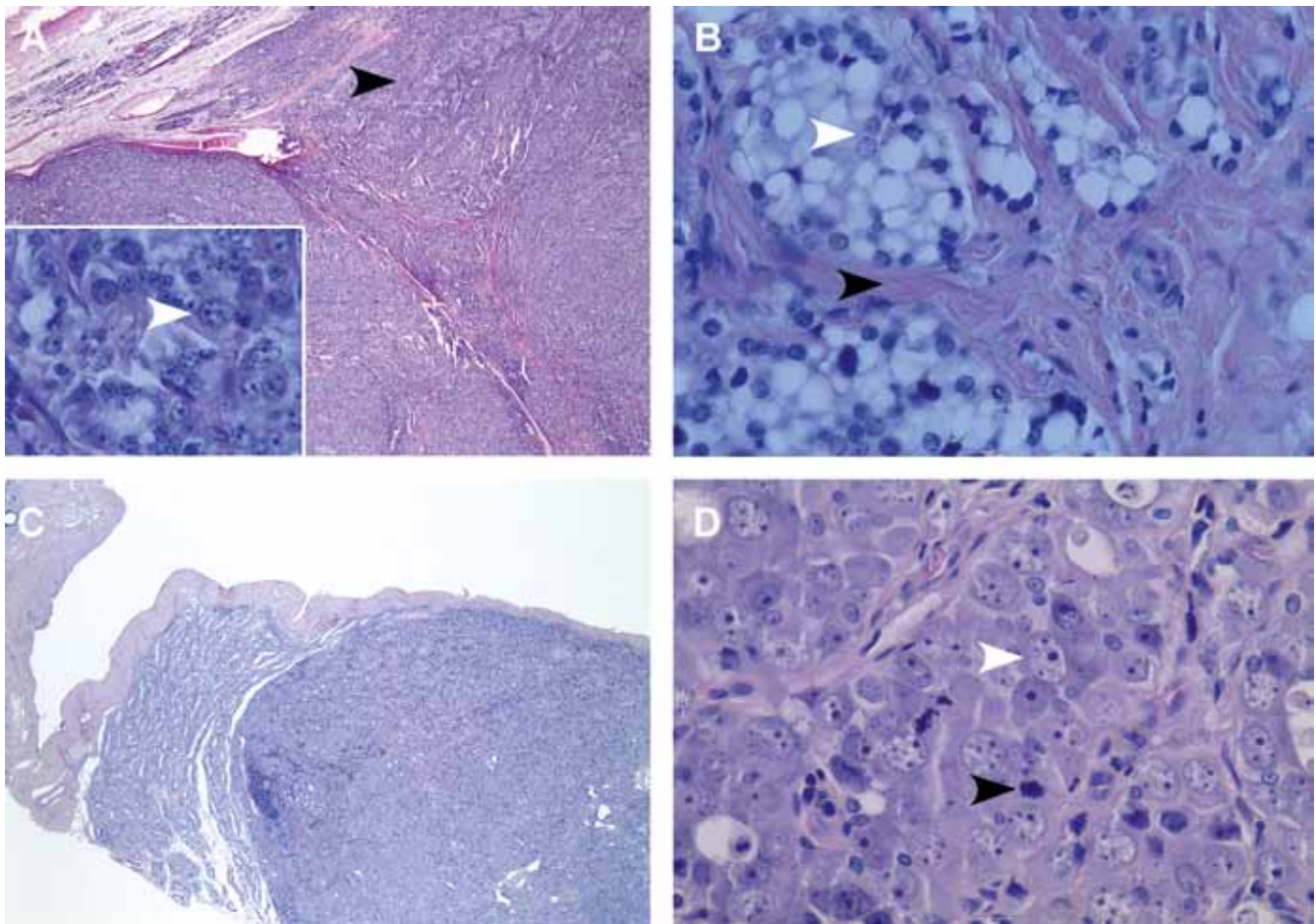


Figure 4. Images of the histology (hematoxylin-eosin stain) of the right (A, B) and left testicle (C, D). **A.** Overview of the seminoma in the largest right testicle. At the black arrow, remaining compressed tubules can be seen. The picture insert shows the neoplastic cells of the seminoma of the right testicle. These cells are large, irregular, round to oval cells with a moderate amount of basophilic, vacuolated cytoplasm and show mild anisocytosis and anisokaryosis. Large, round to oval and irregular nuclei (white arrow) containing 1 to 2 nucleoli and punctate chromatin can be observed. **B.** This image shows pockets of neoplastic cells of the Sertoli cell tumor, separated by eosinophilic fibrinous stroma (black arrow). The neoplastic cells (white arrow) are pleiomorphic with a small amount of basophilic, strongly vacuolated cytoplasm. **C.** Overview of the seminoma located in the smallest left testicle. Surrounding the nodular mass, the normal testicular parenchyma is atrophied. **D.** Detail of the neoplastic cells of the seminoma in the left testicle. The tumor cells (white arrow) are diffusely arranged, large pleiomorphic to round cells, with a moderate amount of basophilic cytoplasm and large, round basophilic nuclei with prominent nucleoli. There is a moderate anisokaryosis and a mitotic rate of 3-5 mitotic figures (black arrow) per high power field.

generics NV, Belgium, 3-5 mg/kg) and ranitidine (Zantac® 150 mg/10 mL, 2 mg/kg, q 8h). The owners were advised to return to their referring veterinarian for a follow-up examination and hematology after one week. Enrofloxacin was prescribed for three weeks, and a urinalysis was planned five days after termination.

Histopathological examination was indicative of a seminoma in both testicles, combined with a Sertoli cell tumor in the right testicle and severe atrophy of the left testicle (Figure 4). No signs of malignancy were detected in the samples taken from the liver nodules and lymph nodes. Histopathology of the liver was consistent with atrophy of the parenchyma and severe fibrosis.

Results of the hematology performed ten days after discharge are presented in Table 1. The dog died

unexpectedly at home, approximately three weeks after diagnosis. No necropsy was performed.

DISCUSSION

As illustrated by this case, dogs with paraneoplastic syndromes due to testicular tumors are often presented with vague complaints of anorexia and lethargy. On physical examination, signs of feminization, such as bilateral symmetrical alopecia, gynecomastia, pendulous prepuce and macular melanosis are present in many cases, but may remain unnoticed. Sometimes, the appearance of female behavior is the only symptom that is observed by the owner, for example taking a female position during urination (squatting) or attracting male attention. Often, a distended abdo-

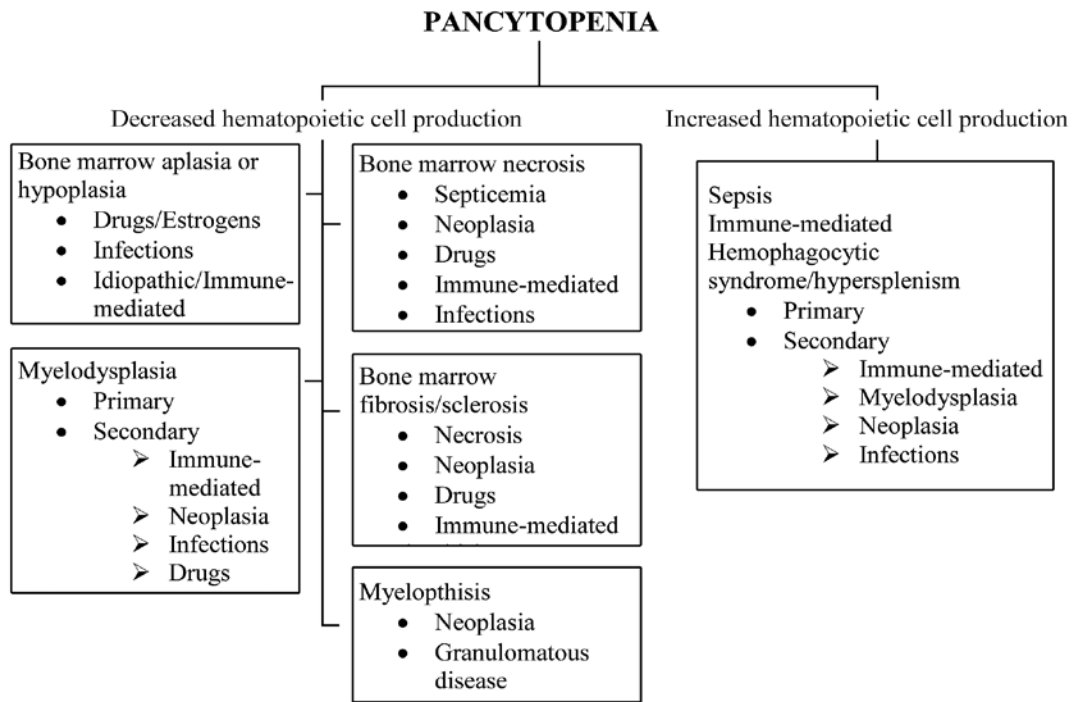


Figure 5. Summary of the causes of pancytopenia (Adapted from: Kearns and Ewing, 2006).

men is noticed and a mass is palpated in the abdomen or inguinal region. Some animals suffer from pyrexia, as happened in this case. This is mostly due to secondary infections, for example of the urinary tract, due to the presence of neutropenia (Dhaliwal et al., 1999; Sanpera et al., 2002; Kim and Kim, 2005; Plavec et al., 2007; De Bosschere and Deprest, 2010; Hong et al., 2011; Kang et al., 2011; Warland et al., 2011; Carreira et al., 2012; Herndon et al., 2012; Quartuccio et al., 2012).

The present case showed pancytopenia, namely a combination of non-regenerative anemia, leukopenia and thrombocytopenia, on complete blood count. General causes of pancytopenia can be divided into two groups: diseases that cause a decrease or an increase in hematopoietic bone marrow cell production (Kearns and Ewing, 2006; Sontas et al., 2009). The etiology of both groups is further illustrated in Figure 5. Estrogens are well known as suppressors of the bone marrow leading to decreased hematopoiesis, but the exact mechanism is still incompletely understood. They might have an effect on stem cell differentiation and iron utilization and possibly inhibit or stimulate the production of erythrocyte stimulating factors. Dogs are more susceptible to these myelotoxic effects than cats. The effects of estrogens on the bone marrow occur in several stages. Initially a leukocytosis occurs. At the same time an increase in platelet numbers, followed by severe thrombocytopenia is observed. The leukocytosis is followed by leukopenia, which persists for a period of approximately three weeks. Leukopenia and thrombocytopenia are seen within two weeks of bone marrow injury. This is followed

by a decrease in erythrocyte production. Anemia is often delayed in onset, because of the longer life span of erythrocytes (120 days, compared to 4 to 8 hours for leukocytes and 5 to 7 days for platelets) (Kearns and Ewing, 2006; Sontas et al., 2009; De Bosschere and Deprest, 2010). Recovery, in cases of acute injury and especially in chronic cases, may take weeks to months after the removal of the causative agent. In cases of chronic exposure to estrogens, damage is often irreversible and leads to a replacement of the red bone marrow by fat or fibrous tissue (75-100%). This results into irreversible neutropenia, thrombocytopenia and moderate to severe anemia (Kearns and Ewing, 2006; Sontas et al., 2009; De Bosschere and Deprest, 2010). Estrogen-induced myelotoxicity may be caused by exogenous estrogens or endogenous estrogens produced by ovarian or testicular neoplasms (Sontas et al., 2009) and should be a major differential for pancytopenia in cryptorchid dogs or dogs suspected of testicular tumors.

Therefore, a complete blood examination is usually performed in canine cases suspected of testicular neoplasia. Especially hematology is important because of the possible myelotoxic effects when the tumor is secreting estrogens (Kearns and Ewing, 2006; Sontas et al., 2009; De Bosschere and Deprest, 2010). In cases with leukopenia, pancytopenia and/or fever, urinalysis is also indicated. It may reveal the presence of pyuria, bacteriuria, proteinuria and hematuria, due to urinary tract infections (Dhaliwal et al., 1999; Lawrence and Saba, 2013). Myelotoxicosis occurs in 15% of the individuals with Sertoli cell tumors (Sanpera et al., 2002). Most of the time a moderate non-regener-

ative anemia, leukopenia, neutropenia and/or severe thrombocytopenia are detected (Sanpera et al., 2002; Plavec et al., 2007; Warland et al., 2011; Quartuccio et al., 2012). In cases of testicular neoplasia presenting with signs of myelotoxicosis, it is therefore useful to determine the concentration of circulating estrogens (estradiol 17 β), which is often elevated. Many, but not all, of these dogs also show external symptoms of feminization (Sanpera et al., 2002; Plavec et al., 2007; Warland et al., 2011; Quartuccio et al., 2012). De Bosschere and Deprest (2010) reported a case of a nine-year-old Beauceron with estrogen-induced pancytopenia without obvious clinical signs related to feminization. On the other hand, feminization symptoms may be subtle, and hence may remain unnoticed. Unexpectedly, in a study of Mischke et al. (2002), not all dogs with clinical symptoms of feminization had increased concentrations of estradiol. Other authors also report wide variation in estradiol concentrations in dogs with Sertoli cell tumors, varying from 10-150 pg/mL with a reference value below 15 pg/mL (Feldman and Nelson, 2004). Therefore, not only an absolute elevation of the estrogen levels, but also an imbalance of estrogen versus testosterone concentrations is thought to be important. The amount of estrogen production is directly proportional to the size and location of the tumor. Large tumors are often located in the abdomen and are associated with a higher production of estrogen (Mischke et al., 2002).

Furthermore, medical imaging should be carried out in patients suspected of testicular tumors, in order to determine the location and extension of the neoplastic process. Thoracic radiographs can be useful in detecting metastases in the lungs or thoracic lymph nodes, although this is seen infrequently. Abdominal radiographs can reveal the neoplastic testicle as an abdominal soft tissue mass effect. Abdominal radiographs were not performed in this case, because ultrasonography was available and is considered to be more sensitive in the detection of neoplastic cryptorchid testicles and abdominal metastases. Sometimes, fine needle aspirates are taken from the abdominal mass, mostly to confirm its neoplastic origin (Dhaliwal et al., 1999; Barrand and Scudamore, 2001; Sanpera et al., 2002; Kim and Kim, 2005; De Bosschere and Deprest, 2010; Hong et al., 2011; Warland et al., 2011; Lawrence and Saba, 2013).

Bone marrow aspirates can be very helpful to support the diagnosis of pancytopenia and especially to estimate the prognosis. In cases of estrogen toxicity, necrotic and inflammatory lesions can be seen in the bone marrow, which may develop into a condition of hypocellularity in chronic cases. In particular, hypocellularity in combination with replacement of the red bone marrow by fat or fibrous tissue indicates a poor prognosis (Sontas et al., 2009). Bone marrow aspiration and biopsy were discussed with the owners of this dog, but they preferred to evaluate the effect of the surgery without examining the bone marrow.

Castration is the treatment of choice in dogs with testicular tumors, regardless of the presence of paraneoplastic syndromes. The removed testicles should be sent for histopathological examination to allow detection and typing of any small early testicular neoplasm. In some cases, the contralateral testicle is atrophied and shows signs of severe fibrosis on histopathological examination (Dhaliwal et al., 1999; Kim and Kim, 2005; Bosschere and Deprest, 2010; Carreira et al., 2012). In the present case, the contralateral descendent testicle was indeed atrophied, but also contained neoplastic tissue.

In cases with concurrent pancytopenia, additional treatment aims to correct the hematologic abnormalities, provide protection against secondary infections and stimulate the remaining bone marrow elements. Fluid therapy, full blood or packed red blood cell transfusions and broadspectrum bactericidal antibiotics can be used as supportive treatment. Because repeated transfusions are sometimes needed, it is advised to use donors of the same blood type and perform crossmatches before every blood transfusion (Sanpera et al., 2002; Sontas et al., 2009). In human medicine, androgens may have beneficial effects on bone marrow recovery in aplastic anemia of different causes (Sontas et al., 2009). Nandroloneacetate, an anabolic steroid, was successfully used in a canine case of estrogen-induced myelotoxicity (De Bosschere and Deprest, 2010). Four months after starting the treatment, hematological variables almost completely normalized. Lithium carbonate is another treatment option that stimulates the proliferation of pluripotent stem cells by an unknown action. It has already been used with success for cyclic hemato-poiesis and in some cases of estrogen-induced myelotoxicity in dogs (Maddux and Shaw, 1983; Hall, 1992; Weiss, 2003; Sontas et al., 2009). On the other hand, beneficial effects with lithium carbonate did not occur in a case reported by Sanpera et al. (2002). During treatment, serum or plasma lithium levels and renal values should be monitored to see if the drug reaches optimum therapeutic levels (dog: 0.5-1.8 mmol/L) and because of possible nephrotoxic effects (Sontas et al., 2009). In human medicine, the treatment of choice is bone marrow transplantation. Bone marrow transplantations are not frequently performed in practice because of the difficulties to find a compatible donor (Weiss, 2003). In the present case, the dog died unexpectedly shortly after discharge from the clinic, and prior to the start of additional drugs to stimulate bone marrow recovery. A possible explanation for the initial improvement of the dog, before discharge, could be the beneficial effect of the blood transfusion that was carried out during hospitalization.

Chemotherapy has been rarely used in dogs as adjuvant treatment of testicular tumors because castration is usually a curative treatment and these tumors usually have a low metastatic potential. Methotrexate, vinblastine and cyclophosphamide can be useful in

cases with metastases and also cisplatin has proven to be efficient in two out of three treated dogs (Dahliwal et al., 1999).

In general, the prognosis for hyperestrogenism is considered to be unfavorable if severe hematologic abnormalities are present (Dahliwal et al., 1999; Feldman and Nelson, 2004; Lawrence and Saba, 2013). In case of a positive response, initial signs of bone marrow regeneration usually occur within three to six weeks after castration and supportive therapy (Feldman and Nelson, 2004). To the authors' knowledge, there are no large studies describing a median survival time and the percentage of dogs that show hematologic recovery.

It is especially important for practitioners to prevent possible life-threatening paraneoplastic syndromes by advising elective castration, both of the undescendent and the descendent testicle, in every case of cryptorchidism. Besides the prevention of paraneoplastic syndromes, castration of cryptorchid dogs is also recommended to prevent further spread of this condition as it is a hereditary trait within several dog breeds (Feldman and Nelson, 2004).

CONCLUSION

Testicular tumors are commonly seen in cryptorchid dogs and can be associated with a possibly life-threatening estrogen-induced pancytopenia. It is crucial to remove both testes in cases of cryptorchidism in order to prevent tumor formation, potential paraneoplastic syndromes and because of genetic implications. Early recognition of feminization may potentially prevent life-threatening irreversible estrogen-induced bone marrow hypoplasia.

REFERENCES

- Barrand K.R., Scudamore C.L. (2001). Canine hypertrophic osteoarthropathy associated with a malignant Sertoli cell tumor. *Journal of Small Animal Practice* 42, 143-145.
- Carreira V.S., Langohr I.M., Ferrari H.F., Luvizotto M.C.R. (2012). Pathology in practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 241, 55-57.
- Ciapiuta R., Nowak M., Kielbowicz M., Antonczyk A., Blasiak K., Madej J.A. (2012). Seminoma, Sertolioma, and Leydigoma in dogs: clinical and morphological correlations. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 56, 361-367.
- De Bosschere H., Deprest C. (2010). Estrogen-induced pancytopenia due to a Sertoli cell tumor in a cryptorchid Beauceron. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 79, 292-296.
- Dahliwal R.S., Kitchell B.E., Knight B.L., Schmidt B.R. (1999). Treatment of aggressive testicular tumors in four dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 35, 311-318.
- Feldman E.C., Nelson R.W. (2004). Disorders of the testes and epididymides. In: Feldman E.C., Nelson R.W. (Editors). *Canine and feline endocrinology and reproduction*. Third edition, Elsevier Saunders, St-Louis, pp. 961-976.
- Grieco V., Riccardi E., Greppi G.F., Teruzzi F., Iermanò V., Finazzi M. (2008). Canine testicular tumors: a study on 232 dogs. *Journal of Comparative Pathology* 138, 86-89.
- Hall E.J. (1992). Use of lithium for treatment of estrogen-induced bone-marrow hypoplasia in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200, 814-816.
- Herndon A.M., Casal M.L., Jaques J.T.S. (2012). Testicular neoplasia in the retained testicles of an intersex male dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 48, 118-124.
- Hong S., Lee H.-A., Han S.-J., Kim O. (2011). Spontaneous Sertoli cell tumor with cryptorchidism in a beagle dog. *Laboratory Animal Research* 27, 177-178.
- Huggins C., Moulder P. (1945). Estrogen production by Sertoli cell tumors of the testis. *Cancer Research* 5, 510-514.
- Johnston S.D., Kustritz M.V.R., Olson P.N.S. (2001). Disorders of the canine testes and epididymides. In: Johnston S.D., Kustritz M.V.R., Olson P.N.S. (Editors). *Canine and Feline Theriogenology*. WB Saunders Company, Philadelphia, 312-332.
- Kang S.-C., Yang H.-S., Jung J.-Y., Jung E.-H., Lee H.-C., Hwang E.-K. and Kim J.-H. (2011). Malignant Sertoli cell tumor in shih tzu dog. *Korean Journal of Veterinary Research* 51, 171-175.
- Kearns S.A., Ewing P. (2006). Causes of canine and feline pancytopenia. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 28, 122-134.
- Kim O., Kim K.-S. (2005). Seminoma with hyperestrogenemia in a Yorkshire terrier. *Journal of Veterinary Medical Science* 67, 121-123.
- Lopate C. (2010). Clinical approach to conditions of the male. In: England G.C.W. and Von Heimendahl A. (Editors). *BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. Second edition, British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, 191-211.
- Lawrence J.A., Saba C.F. (2013). Tumors of the male reproductive system. In: Withrow S.J., Vail D.M., Page R.L. (Editors). *Small Animal Clinical Oncology*. Fifth edition, Elsevier Saunders, St-Louis, Missouri, 557-571.
- Liao A.T., Chu P.Y., Yeh L.S., Lin C.T., Liu C.H. (2009). A 12-year retrospective study of canine testicular tumors. *Journal of Veterinary Medical Science* 71, 919-923.
- Maddux J.M., Shaw S.E. (1983). Possible beneficial effect of lithium-therapy in a case of estrogen-induced bone-marrow hypoplasia in a dog - a case report. *Journal of the American Animal Hospital Association* 19, 242-245.
- Mischke R., Meurer D., Hoppen H.-O., Ueberschär S., Hewicker-Trautwein M. (2002). Blood plasma concentrations of oestradiol-17 β , testosterone and testosterone/oestradiol ratio in dogs with neoplastic and degenerative testicular disease. *Research in Veterinary Science* 73, 267-272.
- Patnaik A.K., Mostofi F.K. (1993). A clinicopathologic, histologic, and immunohistochemical study of mixed germ cell-stromal tumors of the testis in 16 dogs. *Veterinary Pathology* 30, 287-295.
- Plavec T., Tozon N., Kotnik N. (2007). Generalized symmetric alopecia and hyperoestrogenism associated with concurrent lymphoma, Sertoli cell tumor and seminoma in a samoyed. *Slovenian Veterinary Research* 44, 109-114.

- Sanpera N., Masot N., Janer M., Romeo C., De Pedro R. (2002). Oestrogen-induced bone marrow aplasia in a dog with a Sertoli cell tumor. *Journal of Small Animal Practice* 43, 365-369.
- Sontas H.B., Dokuzeylu B., Turna O., Ekici H. (2009). Estrogen-induced myelotoxicity in dogs: a review. *Canadian Veterinary Journal* 50, 1054-1058.
- Quartuccio M., Marino G., Garufi G., Cristarella S., Zanghi A. (2012). Sertoli cell tumors associated with feminizing syndrome and spermatic cord torsion in two cryptorchid dogs. *Journal of Veterinary Science* 13, 207-209.
- Warland J., Constantino-Casas F., Dobson J. (2011). Hyperoestrogenism and mammary adenosis associated with a metastatic Sertoli cell tumor in a male Pekingese dog. *Veterinary Quarterly* 31, 211-214.
- Weiss D.J. (2003). New insights into the physiology and treatment of acquired myelodysplastic syndromes and aplastic pancytopenia. *The Veterinary Clinics of North-America. Small Animal Practice* 33, 1317-1334.

Uit het verleden

DE PEST IN ATHENE (430 - 426 vChr.)

Deze vorm van ziekte, die geen woorden kunnen beschrijven, overviel eenieder met een groter geweld dan de menselijke natuur kon verdragen en bleek onder meer van gewone ziekten vooral in volgend opzicht te verschillen: de vogels en dieren die lijken eten, hoewel er vele doden onbegraven lagen, kwamen er niet op af, of als zij ervan hadden gegeten, stierven ze. Een bewijs hiervan was de opvallende afwezigheid van zulke vogels, die noch bij de lijken noch elders te zien waren. Maar de honden die met mensen samen leefden, gaven meer gelegenheid om de uitwerking van de ziekte waar te nemen.

Velen stierven door verwaarlozing, anderen ondanks de beste verpleging. Nog anderen overleefden.

Meer nog hadden medelijden met de zieken en de stervenden, zij die van de ziekte hersteld waren. Zij wisten wat het was en voelden zich veilig, want voor de tweede maal greep de ziekte niemand aan, althans niet met dodelijke afloop. Zij werden gelukkig en in hun vreugde van het moment koesterden zij de lichtvaardige hoop in de toekomst nooit meer aan een andere ziekte te zullen sterven.

Fragmenten uit Thucydides, *Historiae*, II

Ondanks de uitvoerige en accurate beschrijving van de ramp die zowel stad als platteland trof - niet toevallig - tijdens een oorlog, is men er lange tijd niet in geslaagd de aard van de ziekte met enige zekerheid vast te stellen. In 1995 echter bleek uit de studie van DNA uit een massagraf in het centrum van Athene dat de ziekte niet verwekt was door de klassieke oorzaken van pest zoals *Yersinia pestis*, Anthrax of pokken, maar door *Salmonella enterica* serovar Typhi, de verwekker van tyfus. De door Thucydides beschreven symptomen komen hiermee overeen, al kenden tyfusepidemieën in latere tijden een veel trager verloop.

Uit: Dralans, S. Griekenland. In: *Onder het mes. Geneeskunde in de oudheid*, Amarant syllabus, 2016.

Luc Devriese

Behandeling van een chronische huidwonde bij een hond via negatieve druktherapie

Treatment of a chronic skin wound in a dog, using negative pressure wound therapy

S. Lippens, A. Furcas, M. Or, B. Van Goethem, I. Polis, H. de Rooster

Vakgroep Geneeskunde en Klinische Biologie van de Kleine Huisdieren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, België

hilde.derooster@ugent.be

SAMENVATTING

Een vier jaar en acht maanden oude whippet werd aangeboden met een chronische huidwonde ter hoogte van het mediale aspect van de rechterelleboog. Wegens de chroniciteit van de wonde werd het wondbed eerst zorgvuldig gedebrideerd en nadien behandeld met negatieve druktherapie. Deze relatief nieuwe techniek in de diergeneeskunde biedt allerlei voordelen die het genezingsproces van een chronische wonde ten goede komen. In de huidige casus leidde de negatieve druktherapie in eerste instantie tot de snelle ontwikkeling van een mooi granulatied. Om een optimaal eindresultaat te bekomen werd daaropvolgend gebruik gemaakt van een autologe huidtransplantatie ("full-thickness mesh graft"), die eveneens onder negatieve druktherapie werd geplaatst. Dit zorgde, ondanks de lastige lokalisatie van de wonde, voor een snelle aanhechting en optimale overleving van de huidgreffe. Na amper vier weken was de wonde nagenoeg volledig geheeld, terwijl ze eerder, ondanks allerlei behandelingen, gedurende meer dan twee maanden geen genezing vertoonde.

ABSTRACT

A four-year-and-eight-month-old whippet was presented with a chronic skin wound situated at the medial aspect of the right elbow. Because of its chronic nature, the wound was initially carefully debrided and subsequently treated by means of negative pressure therapy. This fairly new technique offers a wide range of advantages that improve the healing capacities of a chronic wound. The beneficial effect of negative pressure wound therapy on the development of a nice granulation bed was clear. In order to optimize the final result, an autologous skin grafting (full-thickness free mesh graft) was performed. By applying negative pressure on the skin graft, a quick and solid attachment of the graft was achieved. After a period of four weeks, the wound was almost completely healed despite various earlier attempts to successfully treat that wound in the two-months period prior to referral.

INLEIDING

Het chronisch worden van een huidwonde bij huisdieren kan verschillende oorzaken hebben. Een aantal belangrijke factoren die een slechte wondheling veroorzaken, zijn bacteriële contaminatie en/of (laag-gradige) infectie van het wondbed, de aanwezigheid van necrotisch of neoplastisch weefsel, het achterblijven van vreemde voorwerpen, aanhoudend trauma, een slechte doorbloeding of combinaties ervan (Demidova-Rice et al., 2012). De meeste helingremmende factoren kunnen evenwel dankzij een aangepaste behandeling onder controle gebracht worden.

Negatieve druktherapie is een relatief recente vorm van wondbehandeling in de diergeneeskunde, maar wordt al langer toegepast in de humane wondzorg (Argenta en Morykwas, 1997). De therapie kan aangewend worden bij zowel acute, subacute als chronische wonden (Argenta en Morykwas, 1997; Spillebeen et al., 2013). Negatieve druktherapie bevordert de wondheling door het creëren van een betere doorbloeding en door het stimuleren van de vorming van granulatieweefsel (Jacobs et al., 2009; Demaria et al., 2011). Bij het aanleggen van een negativedruktherapieverband wordt het wondbed volledig bedekt met een schuimverband met een open celstructuur,

zodat de negatieve druk zich evenredig over de wonde verdeelt. Nadien wordt alles afgedekt met een luchtdichte polyurethaanfolie en wordt het geheel verbonden met een vacuümpomp. Zo ontstaat een gecontroleerd gesloten systeem. Negatieve druktherapie kan op verschillende manieren aangepast worden aan de noden van de wonde. In de eerste plaats zijn verschillende soorten schuimverbanden beschikbaar (Payne en Ambrosio, 2009; Timmer et al., 2009). Ook kan de ingestelde negatieve druk variëren van 25 mmHg tot 500 mmHg (Morykwas et al., 2001; Borgquist et al., 2010a; Borgquist et al., 2010b; Birke-Sorensen et al., 2011). Ten slotte heeft men ook de mogelijkheid om continue of intermitterende negatieve druk aan te leggen (Borgquist et al., 2010b).

De behandeling van grote wonden ter hoogte van de ledematen van honden en katten vereist dikwijls huidtransplantaten (Fowler, 2006). Esthetisch gezien is de beste keuze een vrije huidgreffe, die zowel de dermis als de epidermis ("full-thickness graft") bevat (Swaim, 1990; Pavletic, 1999). De overleving van vrije huidgreffen is volledig afhankelijk van de ingroei van bloedvaatjes vanuit het wondbed. Het postoperatief verband is hierbij enorm belangrijk (Pavletic, 1999). Succesvol getransplanteerde huid vertoont een nagenoeg normale kleur, textuur, elasticiteit en haargroei (Swaim, 1990; Pavletic 1999).

In deze casus wordt een behandeling van een chronische huidwonde beschreven, waarbij conventionele behandelingen niet het gewenste resultaat opleverden. Negatieve druktherapie werd aanvankelijk toegepast om het wondbed te optimaliseren en daarna om het aanslaan van de huidtransplantatie te bevorderen.

CASUÏSTIEK

Een vrouwelijke, gecastreerde whippet van vier jaar en acht maanden oud werd aangeboden met een huidwonde ter hoogte van het mediale aspect van de rechterelleboog. De wonde was twee maanden eerder ontstaan, vermoedelijk na het vastzitten in een afsluiting. Het oorspronkelijk huiddefect had een grootte van 10 x 20 cm en kon, gezien de locatie, niet primair gesloten worden. De eerste behandeling bij de eigen dierenarts bestond uit een dagelijkse sessie van lasertherapie en een honingzalfverband. Daarna werden behandelingen geprobeerd met behulp van pinchgreffen en gelverbanden, allemaal echter zonder succes. Op het moment van aanbieden kreeg de hond reeds tien dagen amoxicilline-clavulaanzuur (Clavaseptin, Vétoquinol, België; 15 mg/kg BID) en carprofen (Rimadyl, Zoetis, België; 2 mg/kg BID).

Tijdens het algemeen lichamelijk onderzoek vertoonde de hond een kalme, algemene indruk. Er waren geen afwijkingen merkbaar, met uitzondering van de wonde ter hoogte van het mediale aspect van de rechterelleboog. De wonde had een glanzend aspect en was 5 x 9 cm groot (Figuur 1).

De wonde werd eerst gedebrideerd. Het glanzend weefsel kwam gemakkelijk los van de onderliggende fascie van de spieren. Er werden stalen van het verwijderde weefsel opgestuurd voor bacteriologisch onderzoek. Na curettage was een goede doorbloeding van het wondbed aanwezig. De wondranden werden getrimd, waardoor een huiddefect van 6 op 10 cm bekomen werd. In afwachting van het resultaat van de kweek werd op de wonde een hydrogel honingverband (L-Mesitran Hydro, Medeco, Nederland) aangebracht en werd de antimicrobiële behandeling stopgezet. Als pijnstiller werd carprofen, 2 mg/kg BID voorgeschreven.

De bacteriologische kweek was negatief en de hond werd aangeboden voor verdere behandeling onder algemene anesthesie. Het wondbed zag er na twee dagen met honingverband gezonder en actiever uit dan vóór het debridement. Om zo snel mogelijk een gezond en glad granulatiedek te bekomen, werd besloten een negatieve drukverband aan te brengen. De huid rondom het defect werd eerst ruim geschoren. Het wondbed werd gespoeld met een steriele fysiologische oplossing (NaCl 0,9%, B. Braun, België). De huid rondom de wonde werd daarna gedroogd en met ether vetvrij gemaakt. In het wondbed werd een zwart schuimverband (GranuFoam, KCI Medical B.V., Nederland) geplaatst, zodat het volledige wondoppervlak (maar niet de intacte omliggende huid) bedekt werd. Nadien werd een polyurethaanfolie (VAC-wondfolie, KCI Medical B.V., Nederland) aangebracht over het volledige wondbed met rondom minstens 5 cm overlapping van de intacte huid (Figuur 2). Centraal op het schuimverband werd in de folie een opening geknipt met een diameter van 2 cm. Over die opening werd de connectieslang (T.R.A.C. Pad, KCI Medical B.V., Nederland) aangebracht, die vervolgens aangesloten werd aan het vacuümtoestel (V.A.C Therapy, KCI Medical B.V., Nederland) (Figuur 3). Er werd een continue negatieve druk van 75 mmHg aangelegd. Een beschermend verband werd aangebracht.

De hond werd gehospitaliseerd. De negatieve druktherapie werd goed verdragen door de patiënt en er traden geen luchtlekken op. De vocht drainage was gemiddeld 15 à 20 ml per uur en het wondvocht was licht hemorragisch tot bruin gekleurd. Pijnstilling werd bekomen door het toedienen van tramadolhydrochloride (Tramadol, Eurogenerics N.V., België; 4 mg/kg BID).

Na drie dagen werd de hond gesedeerd om het wondbed te inspecteren. Het vacuümtoestel werd 20 minuten voor het verwijderen van het negatieve drukverband uitgeschakeld. De rechtervoorpot (met de polyurethaanfolie) werd gereinigd met hibiscrub en er werd een steriel veld gecreëerd met alcoholverneveling. Na het creëren van een steriele omgeving werd de polyurethaanfolie gemakkelijk verwijderd met zo weinig mogelijk beschadiging van de omliggende huid. Daarna werd de folie ter hoogte van de



Figuur 1. Macroscopisch beeld van de chronische huidwonde ter hoogte van het mediale aspect van de rechte elleboog van een volwassen whippet. Het wondbed is rood en glanzend.



Figuur 4. Wonde na behandeling met negatieve druktherapie gedurende drie dagen. Er is voldoende granulatieweefsel aanwezig in het wondbed om over te gaan tot het plaatsen van een vrije huidgreffe.



Figuur 2. Foto na het plaatsen van het schuimverband in het wondbed. De omliggende intacte huid werd afgeschermd met behulp van polyurethaanfolie om direct contact met het schuimverband te voorkomen. Een gedeelte van de afsluitende folie werd reeds aangelegd.



Figuur 5. Voltooiing van de autologe huidtransplantatie. Er zijn niet-resorbeerbare hechtingen aanwezig aan de wondranden alsook ter hoogte van enkele "mesh"-incisies.



Figuur 3. Afgewerkt negativedrukverband na het aanbrengen van de connectieslang.



Figuur 6. Het vernieuwen van het negativedrukverband, drie dagen na de transplantatie.



Figuur 7. Resultaat zes dagen na de transplantatie, na het verwijderen van de genecrotiseerde overlappende randen van de huidgreffe en de loszittende huidhechtingen.



Figuur 8. Uitzicht van de wonde negen dagen na de huidtransplantatie (drie dagen na het verwijderen van het NPWT-verband).

wondranden voorzichtig ingesneden met behulp van een scalpel en een schaar. Het schuimverband liet gemakkelijk los van het wondbed. Er was duidelijk jong vaatbindweefsel aanwezig (Figuur 4). De wonde werd gespoeld met een steriele fysiologische oplossing en de overblijvende randen van de folie werden verwijderd. Aangezien er voldoende activatie van het wondbed was, werd beslist om over te gaan tot de autologe huidtransplantatie. De wonde werd in de tussentijd beschermd met een hydraterende gel op waterbasis (IntraSite gel, Smith & Nephew, België) met daarboven niet-adhesieve kompressen (Melolin, Smith & Nephew, België) en een polsterverband.

De volgende dag werd de hond verdoofd en in een rechts laterale positie geplaatst. De exacte plaats waar de huiddonorflap genomen moest worden, werd preoperatief afgetekend met een chirurgische markeerstift. Er werd gebruik gemaakt van donorhuid afkomstig van de linkerflank met een grootte van 6 x 10 cm in longitudinale richting voor een “full-thickness mesh graft”. Het donordefect werd nadien routinematig in drie lagen gesloten. De diepe subcutis, de subcutis en de huid werden achtereenvolgens gehecht met polyglecaprone (Monocryl, Ethicon, België). Ondertussen werd de donorhuid voorbereid voor transplan-



Figuur 9. Uitzicht van de wonde 18 dagen na de huidtransplantatie. Er is epithelialisatie te zien ter hoogte van de “mesh”-openingen.



Figuur 10. Uitzicht van de wonde een jaar na de operatie. Er is diffuse beharing zichtbaar.

tatie. Daarbij werden de huidspier en het vet volledig verwijderd tot op het niveau van de haarfollikels. Ten slotte werden meerdere longitudinale “mesh”-incisies gemaakt, met een lengte van ongeveer 1 cm. De huidgreffe werd aan de wondranden verankerd met 4/0 polyamide (Ethilon, Ethicon, België) met een overlapping van 0,5 cm. Om de huidgreffe voldoende goed te verankeren met het wondbed werden bijkomend vier hechtingen geplaatst doorheen de mesh-incisies (Figuur 5).

Na het aanbrengen van de vrije huidgreffe werd opnieuw een negatieve druktherapieverband aangelegd met een negatieve druk van 75 mmHg. Over de greffe en de intacte omliggende huid werden ditmaal twee witte polyvinylalcohol-schuimverbanden (WhiteFoam, KCI Medical B.V., Nederland) aangebracht die met polyurethaan wondfolie luchtdicht gefixeerd werden. De beweging ter hoogte van de rechterelleboog werd bijkomend gelimiteerd met een lateraal geplaatst spalkverband.

Na drie dagen werd de wonde geëvalueerd. De wondvochtproductie was minimaal. De huidgreffe bleek goed aan te slaan en het wondbed was goed droog. Het deel van de huidgreffe dat het oorspronkelijke wondbed bedekte, was roze tot lavendelkleurig;

ter hoogte van de randen van de huidgreffe die de gezonde huid overlapt, was de greffe grijs van kleur (Figuur 6). In de mesh-openingen was granulatieweefsel zichtbaar. Opnieuw werden witte schuimverbanden en een spalk aangebracht en de negatieve druktherapie werd verdergezet aan 75 mmHg tijdens een tweede cyclus van drie dagen.

Na de tweede cyclus was de huidgreffe volledig aangeslagen en waren alle mesh-openingen volledig opgevuld met granulatieweefsel (Figuur 7). Enkel de randen van de huidgreffe die de gezonde huid overlapt, vertoonden droge necrose en werden verwijderd, samen met de loszittende hechtingen. De wonde werd afgeschermd door het plaatsen van een droog verband met een niet-adhesief kompres als contactlaag. De patiënt mocht vervolgens met de eigenaren terug naar huis. Qua medicatie kreeg ze nog tramadolhydrochloride 4 mg/kg BID.

De hond werd drie dagen later opnieuw aangeboden voor een verbandwissel. Het verband zat nog mooi ter plaatse en de transplantatie zat goed vast op het wondbed maar anderzijds waren er verschillende erosies van het oppervlakte-epitheel zichtbaar in het caudomediale deel van het wondbed (Figuur 8). Er werd een nieuw verband geplaatst, doch deze keer werd een dunne laag IntraSite-gel aangebracht op de niet-adhesieve kompressen om een vochtiger milieu te waarborgen.

Dertien dagen na de transplantatie werd het verband er opnieuw afgehaald. De wonde vertoonde een goede epithelialisatie over 70% van de wondoppervlakte en een milde hypergranulatie over 30% van de wondoppervlakte. Op de wonde werd een ontsmettende en wondhelende zalf (Neo-Cutigenol, Takeda, België) op niet-adhesieve kompressen (Melolin, Smith & Nephew, België) aangebracht en het verband werd afgewerkt met een dun laagje cohesief verbandmateriaal (Rinkilastic, Karl Otto Braun, Duitsland). De eigenaren werden geadviseerd om tweemaal daags een dunne laag Neo-Cutigenol aan te brengen en de poot te beschermen door middel van niet-adhesieve kompressen en een dun laagje cohesief verbandmateriaal. De wondheling verliep vlot. Achttien dagen na de transplantatie was er reeds diffuse haargroei aanwezig (Figuur 9). Verband en dus verdere afscherming van de poot waren vanaf 25 dagen na de transplantatie niet meer noodzakelijk.

Een jaar na de operatie werden de eigenaren opnieuw gecontacteerd. Ze waren heel tevreden met het cosmetisch resultaat. Op de plaats van de wonde was er diffuus lichte beharing aanwezig (Figuur 10) en ter hoogte van de donorplaats op de rechterflank was enkel nog een dun litteken op te merken.

DISCUSSIE

De hond in deze casus werd aangeboden met een chronische, niet-helende wonde ter hoogte van het

mediale aspect van de elleboog, die reeds twee maanden aanwezig was.

Een eerste belangrijke factor die de normale wondheling kan verhinderen, is de aanwezigheid van bacteriën. Een persisterende infectie veroorzaakt een erge en langdurige ontstekingsreactie (Demetriou en Stein, 2011). De bacteriën, maar ook de ontstekingscellen, produceren matrix metalloproteïnasen (MMPs). Die proteasen zorgen voor een lagere concentratie aan extracellulaire matrix, receptoren en groeifactoren. De cellen die in het wondbed aanwezig zijn, kunnen daardoor niet prolifereren en/of migreren, waardoor de wondheling vertraagd of geïnhibeerd wordt. Bij gecompliceerde wonden kan daarom beter een bacteriologische cultuur ingezet worden van eventueel aanwezige etter of van een diep weefselstaal (Steed, 2004; Demetriou en Stein, 2011). Bij de beschreven casus konden uit het verwijderde granulatieweefsel geen bacteriën gekweekt worden. Aangezien het om een diep weefselstaal ging, was een valsnegatief laboresultaat en dus een persisterende infectie geen waarschijnlijke oorzaak van de chroniciteit van de wonde. Andere factoren die de wondheling kunnen inhiberen, zijn de aanwezigheid van necrotisch of neoplastisch weefsel en/of vreemde voorwerpen (Demetriou en Stein, 2011). Het niet helen van een wonde kan ook te wijten zijn aan aanhoudend trauma of een geringe doorbloeding van het wondbed, waardoor de vorming van granulatieweefsel en vervolgens de epithelialisatie vertraagd worden. Weinig doorbloeding veroorzaakt een ontoereikend metabolisme en onvoldoende aanvoer van voedingsstoffen. Bovendien moet de patiënt een gebalanceerde voeding met een correct gehalte aan glucose, proteïnen, vitaminen en mineralen toegediend krijgen (Swaim en Angarano, 1990; Demetriou en Stein, 2011; Demidova-Rice et al., 2012). In deze casus was er een duidelijk verhaal van trauma en was een geringe doorbloeding hoogstwaarschijnlijk de hoofdoorzaak van de vertraagde heling. De negatieve druktherapie heeft ervoor gezorgd dat die doorbloeding gestimuleerd werd. De bijkomende huidgreffe was noodzakelijk gezien de grootte van de wonde.

Bij grotere wonden ter hoogte van de ledematen stelt zich vaak het probleem dat eenvoudige sluiting niet mogelijk is. Daarenboven is er meestal ook weinig huid in de onmiddellijke omgeving, waardoor het gebruik van lokale flaptechnieken vaak niet mogelijk is. Bij grote defecten wordt bijgevolg tot een huidtransplantatie overgegaan (Fowler, 2006). Wegens de grootte en de lokalisatie van de wonde werd bij de besproken hond besloten om de wonde te sluiten met behulp van een vrije huidgreffe afkomstig van de flank. Onmiddellijk na het debrideren van het wondbed was het echter niet ideaal om een huidtransplantatie uit te voeren wegens de oneffenheid van het wondoppervlak. Het wondbed werd daarom eerst gedurende drie dagen voorbereid met negatieve druktherapie. Negatieve druk kan aangewend worden bij zowel acute

als subacute en chronische wonden (Argenta en Morykwas, 1997). Het gebruik van negatieve druk werd reeds meermaals beschreven in de humane geneeskunde (Alvarez et al., 2001; DeFranzo et al., 2001; Hersh et al., 2001; Scherer et al., 2002; Blume et al., 2008), maar kent ook een opkomend succes in de diergeneeskunde (Ben-Amotz et al., 2007; Guille et al., 2007; Owen et al., 2009; Demaria et al., 2011). In de literatuur worden verschillende voordelen beschreven van het gebruik van negatieve druktherapie ten opzichte van een conventionele wondbehandeling met diverse wonddressings. Die voordelen zijn te wijten aan vier basismechanismen, namelijk microdeformatie, macrodeformatie, verwijdering van extracellulair vocht en stabilisatie van het milieu van het wondbed (Orgill et al., 2009). Het mechanisme van microdeformatie was de voornaamste reden om negatieve druktherapie ter voorbereiding van het wondbed toe te passen. De mechanische krachten die ontstaan door de negatieve druk, zorgen voor een deformatie van de cellen in en rond de wonde en werken ook in op de extracellulaire matrix (Orgill et al., 2009). De krachten veroorzaken een mechanische stress op de individuele cellen, wat leidt tot een verhoogde proliferatie. Er ontstaat een verhoging van de mitose van de fibroblasten en als gevolg een stimulatie van de vorming van granulatiweefsel. Granulatiweefsel ontstaat dus sneller bij het gebruik van negatieve druktherapie. Volgens het onderzoek van Demaria et al. (2012) is het granulatiweefsel tevens gladder en groeit het niet voorbij de wondranden. Het gladde en mooie granulatiweefsel is in deze casus het belangrijkste voordeel, aangezien een vrije huidgreffe hierop meer kans heeft om aan te slaan dan wanneer het granulatiweefsel een onregelmatig oppervlak vertoont (Pope, 1990). De overige voordelen van de negatieve druktherapie zijn minder belangrijk voor een goede voorbereiding van het wondbed op de huidtransplantatie, maar hebben ook een positieve invloed op de verdere heling van de huidwonde. Macrodeformatie wijst op de contractie van de wonde. Door het aanbrengen van negatieve druk worden de wondranden door schuimverband naar elkaar toe getrokken en ontstaat er dus wondcontractie (Mouës et al., 2004; Orgill et al., 2009). Volgens Demaria et al. (2011) zou die wondcontractie echter enkel duidelijk aanwezig zijn gedurende de eerste week. Nadien is de wondcontractie zelfs kleiner dan bij conventionele wondbehandeling. Als voorbereiding op een huidtransplantatie is wondcontractie ook voordelig, aangezien er een minder grote huiddonorflap genomen moet worden. Een volgend basismechanisme is het verwijderen van extracellulair vocht. De negatieve druk zorgt voor het verwijderen van interstitieel vocht, waardoor er minder interstitiële druk aanwezig is en de kans op oedeemvorming verlaagt. Bovendien wordt niet alleen interstitieel vocht, maar ook wondexsudaat gelijktijdig verwijderd (Banwell en Musgrave, 2004; Orgill et al., 2009). Ten slotte wordt het milieu ter hoogte van het wondbed stabiel

gehouden. Het wondbed is luchtdicht afgesloten door het aanbrengen van een polyurethaan plasticfolie, die tevens ondoorlaatbaar is voor bacteriën en proteïnen (Orgill et al., 2009). De osmotische en oncotische gradiënten blijven stabiel, doordat het aanwezige wondvocht samen met elektrolyten en proteïnen via de afzuigslang verwijderd wordt. Een behandeling met negatieve druk heeft volgens Morykwas et al. (1997) een positieve invloed op het aantal bacteriën in het wondbed. Dit wordt echter weerlegd door een onderzoek van Mouës et al. (2004). Daaruit blijkt dat er geen significant verschil is tussen het aantal aanwezige bacteriën in het wondbed voor en na negatieve druktherapie. Het wondbed in deze casus bleek niet geïnfecteerd te zijn, maar door het aanleggen van een negativedruktherapieverband werd potentiële contaminatie met nieuwe bacteriën voorkomen. De kans op nieuwe bacteriële contaminatie is echter heel klein, aangezien de suctie continu en altijd weg is van de patiënt.

Voor het aanleggen van de negatieve druk kunnen verschillende soorten schuimverbanden gebruikt worden. Het schuimverband zorgt ervoor dat de subatmosferische druk uniform verdeeld wordt over het wondbed (Argenta en Morykwas, 1997). In deze casus werd voor de eerste applicatie een zwart schuimverband gebruikt. Dat is een polyurethaanschuim met een open celstructuur en een poriëgrootte van 400-600 μm (Argenta en Morykwas, 1997). Het polyurethaanschuim is een droog hydrofoob schuimverband, waardoor het wondvocht op een effectieve manier afgevoerd kan worden (Banwell, 2007). Het zwarte polyurethaanschuim wordt het meest gebruikt als schuimverband (Orgill et al., 2009). Een nadeel van het polyurethaanschuim is de grote kans op ingroei van granulatiweefsel tussen de poriën van het schuimverband. Omwille daarvan wordt in de literatuur aangeraden om na twee à drie dagen een verbandwissel uit te voeren (Morykwas et al., 1997; Demaria et al., 2011). In deze casus was er na drie dagen inderdaad ingroei te zien van het granulatiweefsel in het schuimverband, doch dat schuimverband kon verwijderd worden zonder het gevormde granulatiweefsel te beschadigen en zonder partikels van het schuimverband in de wonde achter te laten. Achterblijvende partikels kunnen een vreemd voorwerpreactie of granuloom veroorzaken. Het wondbed is bij achterblijvende partikels ook gevoeliger voor secundaire bacteriële infecties. Door het toepassen van minder hoge negatieve druk, het gebruik van kortere cycli of het gebruik van een schuimverband met kleinere poriën kunnen deze nadelen voorkomen worden. Bij geïnfecteerde wonden kan gebruik gemaakt worden van een polyurethaanschuim dat geïmpregneerd is met metallisch zilver. Naast de aanwezigheid van zilver zijn de eigenschappen gelijk aan die van het gewone polyurethaanschuim. Wanneer het metallisch zilver in contact komt met wondvocht, komen er zilverionen vrij via oxidatie (Payne en Ambrosio, 2009). Die zilverio-

nen zijn sterk antimicrobieel, aangezien ze in staat zijn om zich te binden aan celwandproteïnen van bacteriën met beschadiging van de bacteriële cel tot gevolg. Bovendien kunnen ze ook binden aan enzymen en bacterieel DNA, waardoor de bacterie niet meer kan functioneren en replicatie onmogelijk wordt (Ovington, 2005). Naast het zwarte polyurethaanschuim kan ook gebruik gemaakt worden van een vochtig wit schuimverband. Het witte schuimverband is een polyvinylalcoholschuim met een kleinere poriëgrootte (60-270 μm) dan het polyurethaanschuim (400-600 μm). Het polyvinylalcoholschuim is hydrofiel. Die eigenschappen maken het witte schuimverband minder gevoelig voor ingroei van granulatiweefsel, waardoor het gebruik ervan aangeraden wordt bij meer delicate weefsels (Timmers et al., 2005). Om beschadiging van de getransplanteerde huid te voorkomen, werd na de huidtransplantatie in de besproken casus gekozen voor een wit schuimverband. Het gebruik van een wit schuimverband is echter weinig beschreven in de diergeneeskundige literatuur (Jordana et al., 2011; Or et al., 2015) maar wordt wel vaker vermeld in de humane geneeskunde (Fleischmann et al., 1995; Fleischmann et al., 1997; Timmers et al., 2005).

Naast de keuze van het type schuimverband kan ook gekozen worden om de negatieve druk continu of intermitterend aan te leggen en aan welke negatieve drukken gewerkt wordt. Bij een intermitterende negatieve druktherapie is er een afwisseling tussen atmosferische en subatmosferische druk. Er kan ook geopteerd worden voor een variabele druk, waarbij er afgewisseld wordt tussen twee verschillende subatmosferische drukken. Wanneer een intermitterende therapie gebruikt wordt, is de doorbloeding van het wondbed beter dan bij een continue therapie (Borgquist et al., 2010b). Ook de vorming van granulatiweefsel is beter bij een intermitterende therapie (Morykwas et al., 1997). Uit humaan onderzoek blijkt echter dat intermitterende druk als oncomfortabel kan ervaren worden door de patiënt (Argenta et al., 2006). Morykwas et al. (2001) raden voor een klassieke wondbehandeling een negatieve druk van 125 mmHg aan, omdat een behandeling met die druk resulteert in een grotere doorbloeding en een verhoogde vorming van granulatiweefsel dan bij behandelingen aan -25 mmHg of -500 mmHg. Borgquist et al. (2010a, 2010b) toonden in twee onderzoeken aan dat er geen verschil was in wondcontractie tussen behandelingen met -75 mmHg en -125 mmHg en dat de doorbloeding van het wondbed gelijk was bij een behandeling met -80 mmHg versus -125 mmHg. Bij deze hond werd, omwille van het ras en de dunne huid met weinig subcutis, voorzichtigheidshalve gekozen voor een continue negatieve druk van 75 mmHg. Een andere motivatie om een lager negatief drukniveau te selecteren, is wanneer pijn ervaren wordt (Banwell, 2007).

Na één cyclus met negatieve druk was het wondbed geschikt om de huidtransplantatie uit te voeren. Er werd gebruik gemaakt van een vrije huidgreffe

(“full-thickness free mesh graft”) die de epidermis en de volledige dermis bevat. De mesh-incisies worden aangebracht om de overleving van de greffe te optimaliseren. De incisies zorgen immers voor een betere aanhechting door een efficiënte afvoer van wondvocht en een betere ingroei van granulatiweefsel (Pope, 1990). Na het plaatsen van een vrije huidgreffe is het aanbrengen van een stevig verband noodzakelijk. Dit zorgt voor absorptie van wondvocht, maar ook voor immobilisatie van de greffe en bescherming tegen uitwendig trauma (Gibbs en Tobias, 2004). In deze casus werd echter niet gekozen voor een conventionele wond dressing, maar opnieuw voor een behandeling met negatieve druk, aangelegd met een wit schuimverband. Daardoor werd het risico op het niet aanslaan van de vrije huidgreffe, door de vorming van een hematoom of seroom onder de greffe, de ontwikkeling van een infectie of beweging van de greffe ten opzichte van het wondbed, sterk verminderd (Ben-Amotz et al., 2007). De combinatie van een huidtransplantatie met een negativedruktherapieverband wordt in de literatuur meermaals beschreven, humaan (Blackburn et al., 1998; Sposato et al., 2001; Scherer et al., 2002) maar ook diergeneeskundig (Ben-Amotz et al., 2007; Jordana et al., 2011; Stanley et al., 2013). Een eerste voordeel is uiteraard de goede fixatie van de huidgreffe door de aangelegde negatieve druk (Blackburn et al., 2013). In deze casus was dat vermoedelijk het belangrijkste voordeel van de behandeling met negatieve druk. De locatie van de wonde zou immers bij het gebruik van een klassiek verband onderhevig geweest zijn aan schuren. Wanneer een huidgreffe wordt aangebracht met mesh-incisies, zoals ook in deze casus het geval was, zullen de mesh-incisies snel dichtgroeien (Stanley et al., 2013). Ook het verwijderen van vocht met dus minder kans op oedeemvorming, en een goede neovascularisatie zorgen voor een betere kans op het overleven van de huidgreffe (Blackburn et al., 1998; Ben-Amots et al., 2007). Na twee achtereenvolgende cycli met een wit schuimverband en verdere bescherming met een verband was het huiddefect nagenoeg volledig dichtgegroeid.

Indien een “full-thickness mesh graft” goed aanslaat, bestaat de acceptorplaats na genezing hoofdzakelijk uit normale huid met een normale kleur, beharing en textuur, die resistent is tegen uitwendig trauma (Swaim, 1990). Tijdens het onderzoek van Stanley et al. (2013) werd aangetoond dat er betere haargroei en minder necrose aanwezig waren bij de huidgreffen die behandeld werden met negatieve druk, dan bij huidgreffen die enkel bedekt werden met een conventionele wond dressing. Een jaar na de huidtransplantatie vertoonde de huid bij de beschreven hond echter slechts diffuse beharing en een donkerdere kleur. Hoewel de greffe onder het negativedruktherapieverband volledig was aangeslagen, traden tijdens de verdere heling huiderosies op die resulteerden in het suboptimale resultaat. Vermoedelijk werden deze veroorzaakt door een schurend effect van

het conventionele verband dat aangelegd werd na het beëindigen van de negatieve druktherapie, mogelijk in combinatie met een te droog wondoppervlak.

Negatieve druktherapie kan de wondheling van huiddefecten positief beïnvloeden door de verschillende fasen van de wondheling te versnellen. Zeker wanneer blijkt dat allerlei conventionele behandelingen niet aanslaan, is het zeker de moeite waard om een behandeling met negatieve druktherapie te overwegen, eventueel in combinatie met een huidgreffe.

LITERATUUR

- Alvarez A.A., Maxwell G.L., Rodriguez G.C. (2001). Vacuum-assisted closure for cutaneous gastrointestinal fistula management. *Gynecologic Oncology* 80, 413-416.
- Argenta L.C., Morykwas M.J. (1997). Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience. *Annals of Plastic Surgery* 38, 563-576.
- Argenta L.C., Morykwas M.J., Marks M.W., DeFranzo A.J., Molnar J.A., David L.R. (2006). Vacuum-assisted closure: state of clinic art. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117, 127-142.
- Banwell P. (2007). V.A.C.[®] therapy clinical guidelines. A reference source for clinicians. *KCI Ltd*, 5-9.
- Banwell P.E., Musgrave M. (2004). Topical negative pressure therapy: mechanisms and indications. *International Wound Journal* 1, 95-106.
- Ben-Amotz R., Lanz O.I., Miller J.M., Filipowicz D.E., King M.D. (2007). The use of vacuum-assisted closure therapy for the treatment of distal extremity wounds in 15 dogs. *Veterinary Surgery* 36, 684-690.
- Birke-Sorensen H., Malmsjö M., Rome P., Hudson D., Krug E., Berg L., Bruhin A., Caravaggi C., Chariker M., Depoorter M., Dowsett C., Dunn R., Duteille F., Ferreira F., Francos Martinez J.M., Grudzien G., Ichioka S., Ingemansson R., Jeffery S., Lee C., Vig S., Runkel N., Martin R., Smith J. (2011). Evidence-based recommendations for negative pressure wound therapy: treatment variables (pressure levels, wound filler and contact layer) – steps towards an international consensus. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 64, 1-16.
- Blackburn J.H., Boemi L., Hall W.W., Jeffords K., Hauck R.M., Banducci D.R., Graham W.P. (1998). Negative-pressure dressings as a bolster for skin grafts. *Annals of Plastic Surgery* 40, 453-457.
- Blume P.A., Walters J., Payne W., Ayala J., Lantis J. (2008). Comparison of negative pressure wound therapy using vacuum-assisted closure with advanced moist wound therapy in the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 31, 631-636.
- Borgquist O., Gustafsson L., Ingemansson R., Malmsjö M. (2010a). Micro- and macromechanical effects on the wound bed of negative pressure wound therapy using gauze and foam. *Annals of Plastic Surgery* 64, 789-793.
- Borgquist O., Ingemansson R., Malmsjö M. (2010b). The effect of intermittent and variable negative pressure wound therapy on wound edge microvascular blood flow. *Ostomy Wound Management* 56, 60-67.
- DeFranzo A.J., Argenta L.C., Marks M.W., Molnar J.A., David L.R., Webb L.X., Ward W.G., Teasdall R.G. (2001). The use of vacuum-assisted closure therapy for the treatment of lower-extremity wounds with exposed bone. *Plastic and Reconstructive Surgery* 108, 1184-1191.
- Demaria M., Stanley B.J., Hauptman J.G., Steficek B.A., Fritz M.C., Ryan J.M., Lam N.A., Moore T.W., Hadley H.S. (2011). Effects of negative pressure wound therapy on healing of open wounds in dogs. *Veterinary Surgery* 40, 658-669.
- Demetriou J., Stein S. (2011). Causes and management of complications in wound healing. *In Practice* 33, 392-400.
- Demidova-Rice T.N., Hamblin M.R., Herman I.M. (2012). Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Advances in Skin & Wound Care* 25, 304-314.
- Fleischmann W., Becker U., Bischoff M., Hoekstra H. (1995). Vacuum sealing: indication, technique, and results. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* 5, 37-40.
- Fleischmann W., Lang E., Russ M. (1997). Vacuum-sealing technique for the treatment of infections. *Unfallchirurg* 100, 301-304.
- Fowler D. (2006). Distal limb and paw injuries. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 36, 819-845.
- Gibbs A., Tobias K.M. (2004). Skin reconstruction techniques: full-thickness mesh grafts. *Veterinary Medicine* 99, 882-888.
- Guille A.E., Tseng L.W., Orsher R.J. (2007). Use of vacuum-assisted closure for management of a large skin wound in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 230, 1669-1673.
- Hersh R.E., Jack J.M., Dahman M.I., Morgan R.F., Drake D.B. (2001). The vacuum-assisted closure device as a bridge to sternal wound closure. *Annals of Plastic Surgery* 46, 250-254.
- Hosgood G. (2006). Stages of wound healing and their clinical relevance. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 36, 667-685.
- Jacobs S., Simhaee D.A., Marsano A., Fomovsky G.M., Niedt G., Wu J.K. (2009). Efficacy and mechanisms of vacuum-assisted closure (VAC) therapy in promoting wound healing: a rodent model. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 62, 1331-1338.
- Jordana M., Pint E., Martens A. (2011). The use of vacuum-assisted wound closure to enhance skin graft acceptance in a horse. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 80, 343-350.
- Pavletic M.M. (1999). Free grafts. In: Pavletic M.M. (editor). *Atlas of Small Animal Reconstructive Surgery*. Tweede editie, W.B. Saunders Company, Pennsylvania, p. 275-295.
- Morykwas M.J., Argenta L.C., Shelton-Brown E.I., McGuirt W. (1997). Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation. *Annals of Plastic Surgery* 38, 553-562.
- Morykwas M.J., Faler B.J., Pearce D.J., Argenta L.C. (2001). Effects of varying levels of subatmospheric pressure on the rate of granulation tissue formation in experimental wounds in swine. *Annals of Plastic Surgery* 47, 547-551.
- Mouës C.M., Vos M.C., Van Den Bemd G.C., Stijnen T., Hovius S.E. (2004). Bacterial load in relation to vacuum-assisted closure wound therapy: a prospective randomized trial. *Wound Repair and Regeneration* 12, 11-17.

- Or M., Van Goethem B., Polis I., Spillebeen A., Vandekerckhove P., Saunders J., de Rooster H. (2015). Pedicle digital pad transfer and negative pressure wound therapy for reconstruction of the weightbearing surface after complete digital loss in a dog. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 1, 140-144.
- Orgill D.P., Manders E.K., Sumpio B.E., Lee R.C., Attinger C.E., Gurtner G.C., Ehrlich H.P. (2009). The mechanisms of action of vacuum assisted closure: more to learn. *Surgery* 146, 40-51.
- Ovington L.G. (2004). The truth about silver. *Ostomy Wound Manage* 50, 1-10.
- Owen L.J., Hotston-Moore A., Holt P.E. (2009). Vacuum-assisted wound closure following urine-induced skin and thigh muscle necrosis in a cat. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 22, 417-421.
- Payne J.L., Ambrosio A.M. (2009). Evaluation of an antimicrobial silver foam dressing for use with V.A.C.® therapy: morphological, mechanical, and antimicrobial properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 89B, 217-222.
- Pope E.R. (1990). Mesh skin grafting. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 20, 177-187.
- Scherer L.A., Shiver S., Chang M., Meredith J.W., Owings J.T. (2002). The vacuum assisted closure device. A method of securing skin grafts and improving graft survival. *Archives of Surgery* 137, 930-934.
- Sposato G., Molea G., Di Caprio G., Scioli M., La Rusca I., Ziccardi P. (2001). Ambulant vacuum-assisted closure of skin-graft dressing in the lower limbs using a portable mini-VAC device. *British Journal of Plastic Surgery* 54, 235-237.
- Stanley B.J., Pitt K.A., Weder C.D., Fritz M.C., Hauptman J.G., Steficek B.A. (2013). Effects of negative pressure wound therapy on healing of free full-thickness skin grafts in dogs. *Veterinary Surgery* 42, 511-522.
- Steed D.L. (2004). Debridement. *The American Journal of Surgery* 187, 71-74.
- Swaim S.F. (1986). The full-thickness mesh graft. *Veterinary Medicine* 81, 524-531.
- Swaim S.F. (1990). Skin grafts. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 20, 147-176.
- Swaim S.F., Angarano D.W. (1990). Chronic problem wounds of dog limbs. *Clinics in Dermatology* 8, 175-180.
- Timmers M.S., Le Cessie S., Banwell P., Jukema G.N. (2005). The effects of varying degrees of pressure delivered by negative-pressure wound therapy on skin perfusion. *Annals of Plastic Surgery* 55, 665-671.
- Zhou M., Yu A., Wu G., Xia C., Hu X., Qi B. (2012). Role of different negative pressure values in the process of infected wounds healing treated by vacuum-assisted closure: an experimental study. *International Wound Journal* 9, 1-9.

Dierenkliniek De Ark



Dierenkliniek de Ark is een moderne gezelschapsdierenkliniek met vestigingen in Middelburg, Vlissingen en Terneuzen.

Wij zoeken een ervaren collega om ons dierenartsenteam te versterken.
De functie betreft 28 – 32 uur per week met deelname aan het dienstverband.

Wij zoeken iemand voor een langdurige samenwerking die goed in ons team past. Iemand die in de omgeving woont of wil komen wonen heeft daarom de voorkeur.

Voor meer informatie over de functie en/of kliniek en Uw sollicitatie kunt u sturen naar administratie@dierenkliniekdeark.nl

www.dierenkliniekdeark.nl



126344M100308

Vind de juiste werker voor je bedrijf



Plaats je personeelsadvertentie in *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* en krijg 15% korting.

12633M000133 © SHUTTERSTOCK

Media service 

Flexorenthesopathie bij een Italiaanse cane corso: diagnostische bevindingen en resultaat na behandeling

Flexor enthesopathy in an Italian cane corso: diagnostic findings and treatment results

L. Stammeleer, E. de Bakker, E. Stock, V. Dehuysser, I. Gielen, B. Van Ryssen

Vakgroep Medische Beeldvorming van de Huisdieren en Orthopedie van de Kleine Huisdieren en Vakgroep Geneeskunde en Klinische Biologie van de Kleine Huisdieren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

lisa.stammeleer@ugent.be
bernadette.vanryssen@ugent.be

SAMENVATTING

Flexorenthesopathie is een elleboogaandoening die voornamelijk bij volwassen honden mankheid veroorzaakt. In deze casus wordt de evolutie van primaire flexorenthesopathie op lange termijn besproken bij een Italiaanse cane corso. Deze hond werd op 1,5 jarige leeftijd gediagnosticeerd met bilaterale primaire flexorenthesopathie. De diagnose werd gesteld op basis van verschillende beeldvormingstechnieken, i.e. radiografie, computertomografie en artroscopie. De behandeling bestond uit het herhaaldelijk injecteren van het gewricht met methylprednisolone-acetaat en had telkens een tijdelijk effect van enkele maanden en leidde uiteindelijk tot een acceptabele mobiliteit. Radiografisch was er na vier jaar een duidelijke toename in grootte van de calcificatie en een toename van artrose in het gewricht.

ABSTRACT

The pathological condition of the enthesis at the medial humerus epicondyle is referred to as flexor enthesopathy. Lesions include thickening, inflammation, fibrillation, partial rupture and calcification of the enthesis. In this case report, the evolution of primary flexor enthesopathy in a 1,5-year-old Italian cane corso is described. Several medical imaging techniques, i.e. radiography, ultrasound and computed tomography were used to diagnose primary flexor enthesopathy, in this case bilaterally. An intra-articulaire injection with methylprednisolone-acetate is regarded the standard treatment. The long term follow-up was evaluated based on the clinical improvement, the size of the calcification and the increase in osteoarthritis.

INLEIDING

Flexorenthesopathie is een pathologische aandoening van de buigspieren van de elleboog die aanhechten op de mediale humerusepicondyl. Deze aandoening ontstaat meestal geleidelijk en veroorzaakt mankheid en pijn ter hoogte van de elleboog.

Flexorenthesopathie kan alleenstaand (primair) voorkomen of in combinatie met elleboogdysplasie (concomitant), in het bijzonder met een losse processus coronoïdeus (MCD) (de Bakker et al., 2012; Van Ryssen et al., 2012). Rottweilers en grote Zwitserse sennenhonden lijken gepredisponeerd (de Bakker et al., 2012).

De enthesis is voornamelijk van belang voor de spieraanhechting en stressverstrooiing (Benjamin en

McGonagle, 2001). Een herhaaldelijke overbelasting van de enthesis (en dus een accumulatie van stress op de enthesis) liggen aan de basis van de klachten bij primaire flexorenthesopathie. De oorzaak van deze overbelasting komt niet meteen voort uit het activiteitsniveau van de hond maar eerder uit de specifieke bouw van het ras en van het individu (de Bakker, 2012).

De diagnose van flexorenthesopathie gebeurt aan de hand van verschillende beeldvormingstechnieken. Standaard wordt gebruik gemaakt van radiografie, computertomografie (CT) en artroscopie. Radiografisch worden een onregelmatig afgelijnde mediale epicondyl, wekedelencalcificaties en/of een beenderige spoorvorming gezien. Calcificaties kunnen worden waargenomen caudoventraal, distaal of



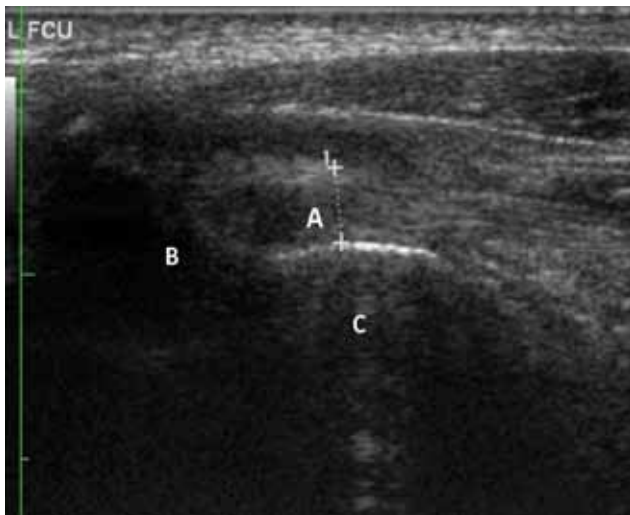
Figuur 1. Mediolaterale opnames in flexie van de linker- (A1-C1) en rechter- (A2-C2) elleboog bij het eerste bezoek aan de faculteit Diergeneeskunde (UGent) (A1-A2), drie jaar (B1-B2) en vier jaar (C1-C2) na het ontstaan van de klachten. De aanwezigheid van calcificatie in de enthesis wordt aangegeven door de witte pijlen. De zwarte pijlen duiden de reactie (nieuwbeenvorming) ter hoogte van de mediale humerusepicondyl aan. Degeneratieve veranderingen worden aangeduid door de witte cirkels.

mediaalvan de mediale epicondyl ter hoogte van de gewrichtsspleet (Meyer-Lindberg et al., 2004; Van Ryssen et al., 2012).

CT is een zeer waardevolle techniek en heeft het voordeel dat er geen superpositie van structuren aanwezig is (de Bakker et al., 2013a; de Bakker et al., 2014b). Er kunnen een onregelmatige aflijning, sclerose en/of een verdikte cortex van de mediale humerusepicondyl worden waargenomen. Hiernaast kunnen al dan niet een verdikking van de buigspieren en een calcificatie worden vastgesteld. Een belangrijk voordeel van CT is de mogelijkheid tot het gebruiken van contrast. Bij beschadiging van de buigspieren ontstaat een betere doorbloeding als fysiologische respons om herstel te bekomen. Hierdoor wordt een verhoogde contrastopname gezien in de buigspieren in het ge-

val van flexor-enthesopathie (Puchalski et al., 2009). Er kan aan de hand van CT ook meteen een beoordeling worden gemaakt van de mediale processus coronoideus. Dit is belangrijk om het verschil te maken tussen primaire en concomitante flexor-enthesopathie (de Bakker et al., 2014b).

Arthroscopie brengt het gewricht direct in beeld (de Bakker et al., 2013a). Door de artroscopie in de richting van de "trochlear notch" van de ulna te bewegen en de kijkhoek te draaien in de richting van de mediale humerale epicondyl (de kijkhoek opwaarts gericht) wordt de enthesis in beeld gebracht. Typische letsels zijn een gefibrilleerde of gescheurde enthesis, lokale synovitis en erosies ter hoogte van de enthesis samen gaand met verdikte, gele buigspieren (de Bakker et al., 2013b).



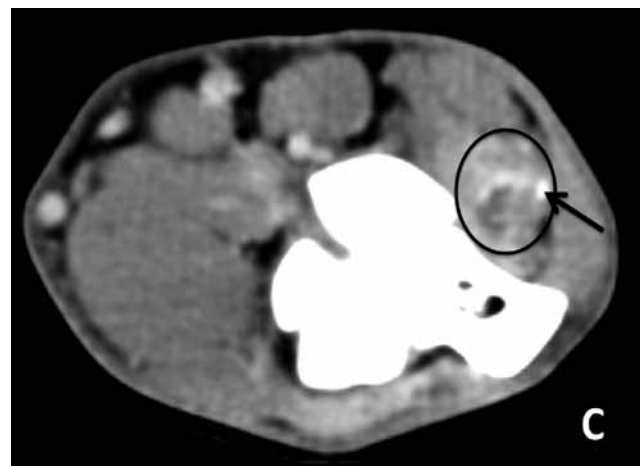
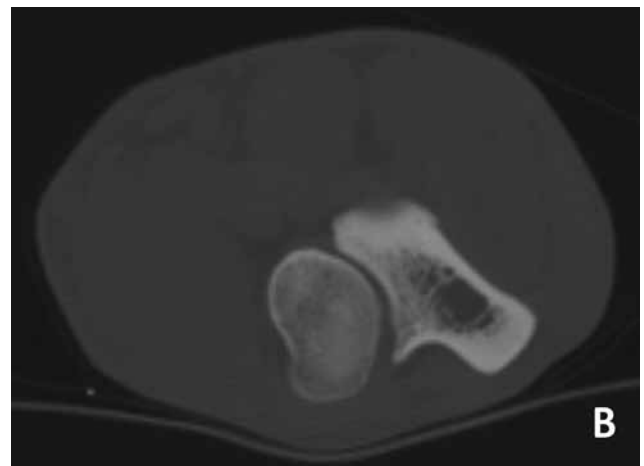
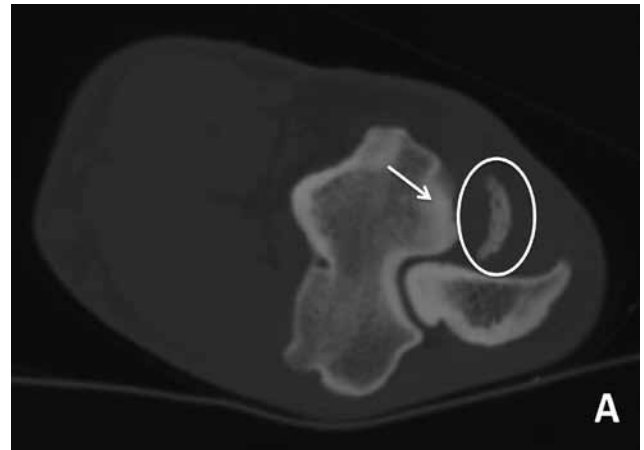
Figuur 2. Echografisch beeld van de linkerelleboog. De stippe lijn geeft de aanwezigheid van een calcificatie weer in de enthesis (A) van de buigspieren van ongeveer 1,2 cm net voor de aanhechting op de mediale humerusepicondyl (B). Deze werpt een schaduw over de onderliggende structuren (C).

Voor de behandeling van flexor-enthesopathie zijn er twee opties. Naar analogie met de behandeling van de golferselleboog bij de mens kan er gebruik gemaakt worden van een of meerdere intra- en peri-articulaire injecties met methylprednisoloneacetaat (0,5mg/kg) (Jobe en Ciccotti, 1994; Van Ryssen et al., 2012; De Bakker, et al. 2014a.). Indien dit zonder resultaat blijft, kan steeds overgegaan worden tot een chirurgische behandeling. Deze bestaat uit het oversnijden van de aangetaste flexoren en het verwijderen van de calcificatie en/of aangetaste deel van de pees (Meyer-Lindberg et al., 2004, Van Ryssen et al., 2012; de Bakker et al., 2014a.). Een alternatieve therapie bestaande uit de lokale injectie van groeifactoren geïsoleerd uit het plasma van de patiënt, zou tot herstel van de pees leiden en niet enkel een onderdrukking geven van de ontstekingsreactie. Objectieve studies over deze behandeling zijn nog niet beschikbaar (Stammeleer, 2015)

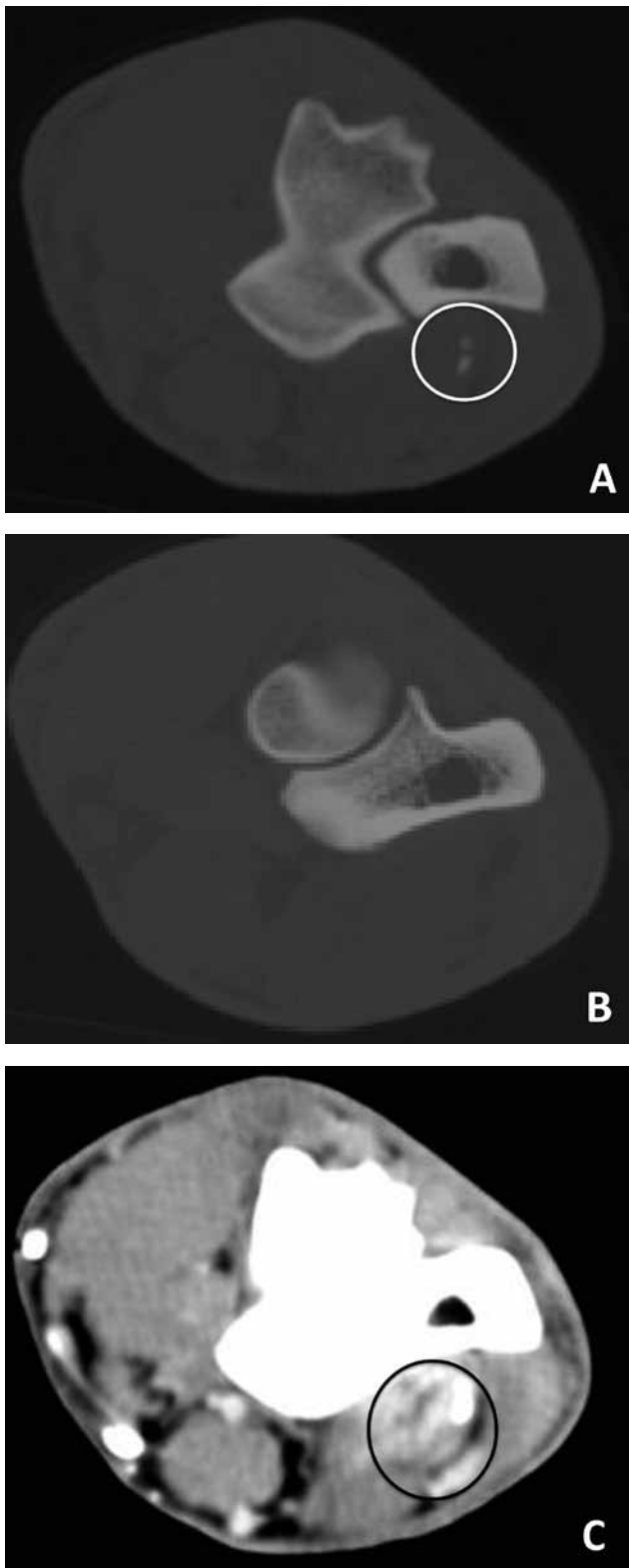
CASUSBESCHRIJVING

Signalement en anamnese

Een anderhalf jaar oude, mannelijke, intacte Italiaanse cane corso werd aangeboden met de klacht van continu manken links voor sinds enkele maanden, afwisselend in ernst en zonder traumatische aanleiding. Het manken was erger na rust en inspanning. Een behandeling met carprofen (Rimadyl, Zoetis, België; 2mg/kg 2x/dag) gaf onvoldoende verbetering van de klachten.



Figuur 3. CT-beelden van de linkerelleboog. A en B. Dwarse doorsnede in het botvenster ter hoogte van de distale humerus (A) en ter hoogte van het mediale coronoid (B). Er is sclerose zichtbaar ter hoogte van de mediale humeruscondyl (pijl) en een gecalcificeerd fragment is aanwezig ter hoogte van de flexorpezen (cirkel). Het mediale coronoid lijkt normaal. C. Dwarse doorsnede ter hoogte van de humeruscondylen distaal in het wekedelenvenster na intraveneuze contrasttoediening. Ter hoogte van de flexoren is er zwelling en diffuse captatie met vocht centraal (cirkel). Het distale deel van het fragment is nog net zichtbaar (pijl).



Figuur 4. CT-beelden van de rechterelleboog. A en B. Dwarse doorsnede in het botvenster ter hoogte van de distale humerus (A) en ter hoogte van het mediale coronoïd (B). Twee kleine gecalcificeerde fragmenten zijn aanwezig ter hoogte van de flexorpezen (cirkel). Het mediale coronoïd lijkt normaal. C. Dwarse doorsnede ter hoogte van de humeruscondylen distaal in wekedelenvenster na intraveneuze contrasttoediening. Ter hoogte van de flexoren is er zwelling en diffuse captatie met vocht centraal (cirkel).

Klinisch en orthopedisch onderzoek

Er werden geen afwijkingen waargenomen op het algemeen klinisch onderzoek. Op inspectie bleek de hond licht te manken op de linkervoorpoot. Ter hoogte van de schouderpijlen links werd een matige spieratrofie vastgesteld. De linkerelleboog bleek matig opgezet en was pijnlijk bij flexie en extensie. De plooibaarheid van het gewricht was beperkt.

Medische beeldvorming

In de eerste plaats werd een radiografisch en echografisch onderzoek uitgevoerd. Hiervoor werd de hond gesedeerd met dexmedetomidine (Dexdomitor, Orion Corporation, Finland; 5 µg/kg) IV. Na afloop van deze onderzoeken werd atipamezole 5mg/ml (Antisedan P. Zero AH, Finland; 2,5 µg/kg dexmedetomidine) IM gebruikt om de sedatie om te keren.

Radiografisch werden in de linkerelleboog minimale, degeneratieve veranderingen waargenomen en een grote calcificatie ter hoogte van de buigspieren (Figuur 1, A1-A2).

De mediale processus coronoïdeus was scherp afgeijnd en vertoonde een normale driehoekige vorm. Er was geen subtrochleaire sclerose of incongruentie van het gewricht.

Rechts werden radiografisch enkel milde, degeneratieve veranderingen waargenomen. Op echografie werd links een beenderige calcificatie ter hoogte van de proximale aanhechting van de flexoren opgemerkt. Rechts werden geen afwijkingen gezien (Figuur 2). Op basis van deze resultaten werd bilaterale primaire flexorenthesopathie vermoed. De eigenaar besliste voorlopig af te wachten en geen therapie in te stellen.

Na twee maanden werd in het kader van een doctoraatsstudie een computertomografisch onderzoek van beide ellebogen uitgevoerd. Ter hoogte van de aanhechting van de flexoren op de mediale humerus condyl was er bilateraal sclerose en links ook nieuwbeenvorming te zien. In beide ellebogen was er ter hoogte van de flexorpezen een gecalcificeerd fragment aanwezig. Links was het fragment 1 cm breed, rechts waren er twee kleine fragmenten aanwezig. De processus coronoïdeus in beide ellebogen toonde een normaal aspect. Na toediening van intraveneuze contraststof waren er ter hoogte van de flexoren zwelling en diffuse contrastcaptatie met vocht centraal te zien (Figuur 3 en 4).

Behandeling

Aansluitend op het CT-onderzoek werd een diagnostische arthroscopie van beide ellebogen uitgevoerd met een 2,4 mm-artroscop (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Duitsland) (Figuur 5). Synovitis was duidelijk aanwezig in de linkerelleboog. De mediale humeruscondyl, mediale processus coronoïdeus en de processus anconeus vertoonden een normaal aspect.

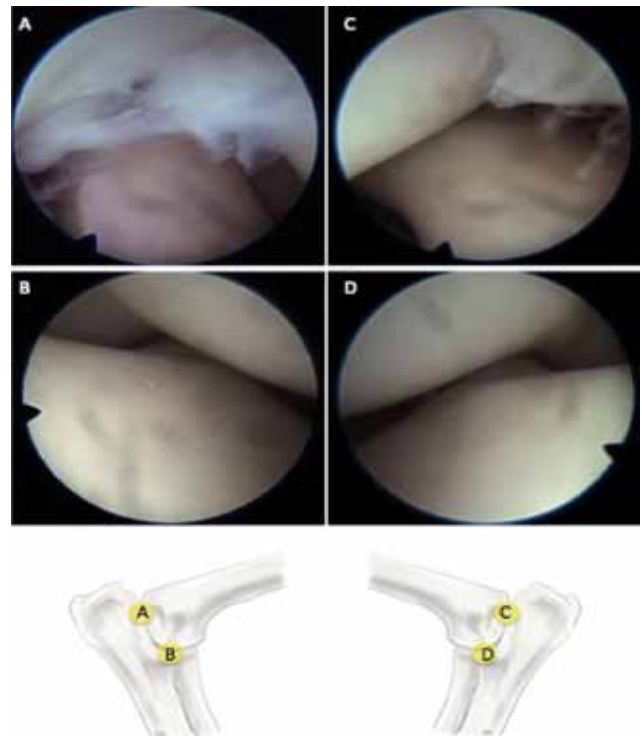
De flexorpees was duidelijk afwijkend: er werden verdikte, witte en deels losse vezels gezien die onvolledig aanhechten. Dezelfde waarnemingen werden rechts gevonden. In beide gevallen was de processus coronoïdeus intact en vertoonde het gewrichtskraakbeen geen afwijkingen (Modified Outerbridge score 0). Gelijktijdig met het uitvoeren van de arthroscopie werd ook meteen de behandeling ingesteld. Er werd 0,9 ml methylprednisoloneacetaat (Moderin LA, Zoetis, België; 0,5mg/kg, 20 mg/ml) geïnjecteerd in de linkerelleboog (intra-articulair en rond de aanhechting van de buigspieren). De rechterelleboog werd op dat moment niet behandeld wegens de beperktheid van de letsels en het ontbreken van klinische klachten. Als premedicatie werd gebruik gemaakt van de combinatie dexmedetomidine (Dexdomitor, Orion Corporation, Finland; 3 µg/kg) en butorphanol (Dolorax, Intervet, België; 0,2 mg/kg), beide IV toegediend. De anesthesie werd geïnduceerd aan de hand van propofol (Propovet, Abbott Lab, UK; 1-4 mg/kg) IV. Het onderhoud van de anesthesie gebeurde aan de hand van isofluraan in zuurstof via een rebreathing systeem. Perioperatieve analgesie werd voorzien met fentanyl (Fentadon, Eurovet, België) een ladingsdosis van 1µg/kg gevolgd door een CRI aan 5 µg/kg/u. Cefazoline (Cefazoline Mylan, Mylan, België; 0,2 mg/kg) werd IV toegediend en een onderhoudsinfuus (Hartmann, B. Braun Medical NV, Duitsland; 10 ml/kg/u) werd opgestart.

Langetermijnevolutie

Tijdens de vier daaropvolgende jaren werd de hond nog drie keer aangeboden voor mankheid afwisselend op beide voorpoten. Telkens waren er een lichte opzetting en pijn bij hyperflexie aanwezig. Er werden controleradiografieën gemaakt drie en vier jaar na de initiële diagnose. De evolutie van de radiografische afwijkingen worden weergegeven in Figuur 1. Bij ieder aanbod werd het pijnlijke gewricht lokaal behandeld met een corticosteroideninjectie, met langdurig maar tijdelijk effect. Het uiteindelijke resultaat was positief. Bij een gemiddeld activiteitsniveau mankte de hond nog zelden, onafhankelijk van de inspanning. Op radiografisch onderzoek bleef echter steeds een duidelijke evolutie aanwezig waarbij de grootte van de calcificatie en nieuwbeenvorming steeds toenamen.

DISCUSSIE

Flexorenthesopathie is een aandoening die voornamelijk wordt gediagnosticeerd bij volwassen honden van grote rassen, zoals ook bij deze cane corso het geval was. Slechts zelden wordt deze aandoening aangetroffen bij honden jonger dan één jaar. Rassen, zoals de rottweiler en grote Zwitserse sennenhond, zijn sterk vertegenwoordigd (Stammeleer, 2015). Stijfheid na rust en pijnlijkheid na inspanning zijn symptomen



Figuur 5. Arthroscopische beelden van de linker- (A en B) en rechter- (C en D) elleboog. Op beeld A en C is een duidelijk afwijkende enthesis van de buigspieren te zien (verdikt, gefibrilleerd). De processus coronoïdeus is niet afwijkend (C en D).

die ook kunnen passen bij elleboogdysplasie. Het gebruik van beeldvormingstechnieken is dan nodig om tot de juiste diagnose te komen.

Hoewel de radiografische tekenen van flexorenthesopathie bij deze hond duidelijk aanwezig waren, kon de aanwezigheid van “medial coronoid disease” (MCD) niet volledig worden uitgesloten. Aanvullende gegevens verkregen met CT en arthroscopie konden in dit geval bevestigen dat het om bilaterale primaire flexorenthesopathie ging, en MCD of andere afwijkingen in het ellebooggewricht uitgesloten konden worden. Het differentiëren van primaire en concomitante flexorenthesopathie is belangrijk omwille van de verschillende behandeling. In het geval van de concomitante vorm wordt flexorenthesopathie niet behandeld (de Bakker et al., 2014a).

Bij deze hond werd niet gekozen voor een chirurgische behandeling wegens een vrij goede respons op de lokale infiltratie met corticosteroiden, die een goedkope en eenvoudige behandelingsoptie is. Het bleek zinvol om deze behandeling te herhalen aangezien de lange periode tussen de eerste en tweede injectie waarbij er een (tijdelijk) positief resultaat werd bekomen. Een alternatieve behandeling met groeifactoren en fysiotherapie werd niet toegepast.

Ondanks het onderdrukken van de symptomen bleven de calcificaties in grootte toenemen. Dit wees op een actief proces in de elleboog. De medicamenteuze behandeling steunt dan ook voornamelijk op het wegnemen van de ontstekingsreactie. Nochtans

werd in een langetermijnstudie opgemerkt dat sommige dieren klinisch volledig herstelden, zelfs na één lokale injectie met corticosteroiden (Stammeleer, 2015). Bij een derde van de honden van die studie was meer dan één injectie met corticosteroiden nodig om de klachten voldoende te reduceren. Deze resultaten zijn onafhankelijk van de aanwezigheid van artrose en/of calcificaties. Noch artrose, noch calcificatie leek invloed te hebben op de prognose. In dezelfde studie werd gezien dat de chirurgische behandeling tot gelijkaardige resultaten leidde. Sommige dieren herstelden volledig, andere bleven een zekere graad van mankheid behouden. Er dient echter verder onderzoek te gebeuren naar de prognose na chirurgische behandeling en in welke gevallen deze optie dient verkozen te worden boven de conservatieve behandeling (Stammeleer, 2015).

CONCLUSIE

Primaire flexorenthesopathie is een aandoening van de buigpezen van de elleboog met een nog onvolledig opgehelderde etiologie. Deze hond had het typische signalement voor primaire flexorenthesopathie (groot, zwaar gebouwd ras) en de typische symptomen, die echter ook bij elleboogdysplasie worden gezien. In de eerste plaats is een juiste diagnose vereist om een correcte behandeling in te stellen. Primaire flexorenthesopathie kan op verschillende manieren behandeld worden, waarbij echter geen volledig herstel gegarandeerd is. Vaak lijkt het nodig de patiënten herhaaldelijk te behandelen met corticosteroiden en/of over te gaan tot chirurgie om een goed resultaat te bekomen. Verder onderzoek is hierbij zeker nog noodzakelijk. Deze casus illustreert het actieve proces in de elleboog, gekenmerkt door de verdere ontwikkeling van letsels in de buigspieren en de ontwikkeling van artrose, ondanks een vrij positieve respons op de behandeling.

REFERENTIES

- Benjamin M., McGonagle D. (2001). Entheses: tendon and ligament attachment sites. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 19(4), 520-527.
- de Bakker E., Samoy Y., Gielen I., Van Ryssen B. (2011). Medial humeral epicondylar lesions in the canine elbow. A review of the literature. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 24, 9-17.
- de Bakker E. (2012). The diagnosis of primary and concomitant flexor enthesopathy in the canine elbow. Doctoraatsthesis Faculteit Diergeneeskunde, Gent.
- de Bakker E., Gielen I., Saunders J.H., Polis I., Vermeire S., Peremans K., Dewulf J., van Bree H., Van Ryssen B. (2013a). Primary and concomitant flexor enthesopathy of the canine elbow. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 26, 425-434.
- de Bakker E., Samoy Y., Coppieters E., Mosselmans L., Van Ryssen B. (2013b). Arthroscopic features of primary and concomitant flexor enthesopathy in the canine elbow. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 26, 340-347.
- de Bakker E., Gielen I., Kromhout K., van Bree H., Van Ryssen B. (2014a). Magnetic resonance imaging of primary and concomitant flexor enthesopathy in the canine elbow. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 55, 56-62.
- de Bakker E., Gielen I., Van Caelenberg A., van Bree H., Van Ryssen B. (2014b). Computed tomography of canine elbow joints affected by primary and concomitant flexor enthesopathy. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 55, 45-55.
- Jobe F.W., Ciccotti M.G. (1994). Latera and medial epicondylitis of the elbow. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2, 1-8.
- Meyer-Lindberg A., Heinen V., Hewicker-Trautwein M. (2004). Vorkommen und Behandlung von knöchernen Metaplasien in den am medialen Epikondylus des Humerus entspringenden Beugeschienen beim Hund. *Tierärztliche Praxis* 32, 276-285.
- Puchalski S.M., Galuppo L.D., Drew C.P., Wisner E.R. (2009). Use of contrast enhanced computed tomography to assess angiogenesis in deep digital flexor tendinopathy in a horse. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 50, 292-297.
- Stammeleer L. (2015). Resultaten na de behandeling van primaire flexor enthesopathie bij de hond. *Onderzoek in het kader van de Masterproef*.
- Van Ryssen B., de Bakker E., Beaumlin Y., Samoy Y., Van Vynck D., Gielen I., Ducatelle R., van Bree H. (2012). Primary flexor enthesopathy of the canine elbow: imaging arthroscopic findings in eight dogs with discrete radiographic changes. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 25, 239-245.

Prevalence of respiratory pathogens in nasal swabs from horses with acute respiratory disease in Belgium

Prevalentie van respiratoire pathogenen in neusswabs van paarden met acute ademhalingsstoornissen in België

¹B. Broux, ²A. Gryspeerdt, ³H. Amory, ⁴T. Fripiat, ¹B. Pardon, ⁵F. Gasthuys, ⁶L. Legrand, ¹P. Deprez

¹Department of Large Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

²Dierengezondheidszorg Vlaanderen, Deinse Horsweg 1, 9031 Drongen, Belgium

³Department Clinique des Animaux de Compagnie et des Equides, Faculté de Médecine Vétérinaire, Liège University, Avenue de Cureghem 2, Liège, Belgium

⁴Equine Sports Medicine, PO box 46, 1270 AA Huizen, the Netherlands

⁵Department of Large Animal Surgery and Anesthesiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

⁶LABÉO Frank Duncombe, EA4655 U2RM Université Caen Basse-Normandie, Fondation Hippolia, 14053 Caen, France

Barbara.Broux@UGent.be

ABSTRACT

Contagious respiratory infections are an important cause of respiratory disease in horses, resulting in impaired pulmonary function, poor performance and sometimes severe illness. Although bacterial infections are often suspected to be involved, viruses are frequently overlooked and are an underestimated cause of respiratory disease outbreaks in horses. In this study, nasal swabs of 103 horses with acute symptoms of respiratory disease were analyzed for the presence of 13 different respiratory pathogens. Gamma herpesviruses were the most commonly detected, with 60% of the samples being positive, followed by *streptococcus equi subsp. zooepidemicus* infection (30%). Rhinovirus B, *streptococcus equi subsp. equi*, adenovirus 1 and EHV-4 were more rarely detected. Further research is necessary to correctly interpret the importance of gamma herpesviruses in horses, for example by screening a healthy control population. National surveillance of respiratory viruses in horses by PCR analysis on nasal swabs might be a useful, early-warning system for viral epidemics.

SAMENVATTING

Infectieuze aandoeningen zijn een belangrijke oorzaak van ademhalingsproblemen bij paarden. Ze kunnen aanleiding geven tot een verstoorde longfunctie, verminderde prestaties en soms ernstige klinische ziekte. Hoewel meestal bacteriële infecties vermoed worden, zijn virussen een onderschatte oorzaak van besmettelijke ademhalingsinfecties bij paarden. In deze studie werden neusswabs genomen bij 103 paarden met symptomen van acute ademhalingsinfectie en gescreend op de aanwezigheid van 13 verschillende equine ademhalingspathogenen. Gammaherpesvirussen waren, met 60% positieve stalen, de meest gedetecteerde pathogenen, gevolgd door *streptococcus equi subsp. zooepidemicus* infecties (30%). Rhinovirus B, *streptococcus equi subsp. equi*, adenovirus 1 en EHV-4 werden minder frequent gevonden. Verder onderzoek is nodig om het belang van gammaherpesvirussen bij het paard correct te interpreteren. Nationale surveillance van ademhalingsvirussen bij paarden door middel van PCR-analyse op neusswabs zou een nuttig waarschuwingssysteem voor dreigende virale epidemieën kunnen zijn.

INTRODUCTION

Respiratory problems are among the most important disorders limiting the athletic performance of the horse. Consequently, early detection and adequate treatment are essential to maximize the chances of recovery and to reduce economic and performance losses (Van Erck-Westergren et al., 2013). Infectious diseases are frequently involved in clinical or sub-clinical respiratory disorders. Field studies on viral antigens in the respiratory tract are limited in horses, and hence, the prevalence of respiratory pathogens is unknown in many countries, including Belgium. Identification of etiologic agents requires laboratory analysis on samples from the respiratory tract. Whereas sampling of the lower airways is not always straightforward in first-line clinical practice, the use of nasal swabs offers a more achievable alternative, especially for viruses, as recently documented in a national surveillance program for respiratory viruses in cattle in Ireland (O'Neill et al., 2014). The objective of the present survey was to determine the nasal prevalence of infectious respiratory agents in horses with acute respiratory disease in Belgium.

MATERIALS AND METHODS

Belgian equine veterinarians were requested to sample horses showing clinical signs suggestive of an acute respiratory disease. Inclusion criteria for the study were acute (<3 days) onset of fever (rectal temperature >38.5°C) and at least one of the following other criteria: nasal discharge, cough, lymphadenopathy or an obvious contagious character of the occurring disease (> two horses affected). No more than two horses within the same premises were sampled. Dry nasal cotton swabs were advanced deep (>30cm) into the ventral nasal conchae. The swabs were placed in a viral transport medium and kept cooled at 8°C during transport and prior to analysis. Samples were analyzed for 13 different respiratory pathogens (equine influenza virus (EIV), equine herpesvirus (EHV) 1, 2, 4 and 5, equine arteritis virus (EAV), adenovirus 1 and 2, coronavirus, equine rhinitis virus A (ERAV) and B (ERBV), *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* and *Streptococcus equi subsp. equi*). Briefly, nucleic acid was extracted from 140µL of fluids with the QIAamp RNA minikit (Qiagen, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions. The final elution was 50µL. The different PCRs were performed after development and validation as described previously (Hue et al., 2014). All the qPCRs used were characterized (limit of detection method, limit of quantification method, limit of detection PCR limit of quantification PCR) and validated for the use in horses according to the French AFNOR norm U47-600 and as described for EHV2 by Hue et al. (2015).

RESULTS

Between January and September 2014, a total of 103 horses in 95 suspected outbreaks of acute contagious respiratory disease were sampled. Other clinical signs in addition to fever, were nasal discharge (60/103, 58%), cough (33/103, 32%) and lymphadenopathy (24/103, 23%). An overview of the PCR results is shown in Table 1. In 71% of cases, a positive result was obtained. EHV2 and EHV5 were the most commonly detected pathogens with 60% of the horses positive for EHV2, EHV5 or both (62/103). Mixed infections were present in 45% of the horses (46/103), mostly involving EHV2 and EHV5.

DISCUSSION

The objective of the present study was to determine the prevalence of infectious respiratory agents in horses with acute respiratory disease in Belgium. This type of prevalence studies is biased by the fact that a random sampling is difficult to perform in practice. Furthermore, samples were taken by first-line practitioners, so protocol compliance is difficult to evaluate. Incorrect sample collection and transport may lead to false negative results. Therefore, the results on the convenience sample of the present study should be interpreted as indicative but not representative for the whole Belgian equine population. The use of PCR on nasal swabs provided an accessible diagnostic procedure for first-opinion practice. The envisaged amount of samples was obtained within a reasonable timeframe, which is an essential prerequisite for any surveillance program for respiratory pathogens.

The present study provided interesting results on the relative importance of respiratory viruses and bacteria affecting the upper airways in horses. The most important observation was the abundant presence of equine gamma herpesviruses (EHV2 and EHV5). Serological studies demonstrated that EHV2 is endemic in equine populations worldwide, with approximately 90% of horses being seropositive, but the nasal presence of viral DNA in healthy as well as in diseased horses is scarcely documented (Nordengrahn et al., 2002). Because of the high number of seropositive horses and the lack of serological differences between healthy and diseased horses, opinions vary as to the true pathogenicity of EHV2. Since EHV2 is frequently detected in combination with other respiratory pathogens, which was confirmed in the present study, the suggestion has been made that EHV2 can predispose horses to other viral and bacterial infections (Nordengrahn et al., 1996). However, EHV2 was the sole pathogen found in nine horses in the present study, which might suggest primary pathogenicity of EHV2. For EHV5, seroprevalence studies show conflicting results (Akkutay et al., 2014; Nordengrahn et al.,

Table 1. Respiratory pathogens detected by PCR performed on nasal swabs of 103 horses with acute respiratory disease in Belgium (2014). Data are shown both on herd level (95 different herds) as on horse level (103 individual horses).

Pathogen	Single Infections	Mixed Infections	Total
Negative	/	/	29% (30/103)
EIV	0% (0/103)	0% (0/103)	0% (0/103)
EHV1	0% (0/103)	1% (1/103)	1% (1/103)
EHV4	1% (1/103)	6% (6/103)	7% (7/103)
EHV2	9% (9/103)	39% (40/103)	48% (49/103)
EHV5	11% (11/103)	43% (44/103)	53% (55/103)
EAV	0% (0/103)	0% (0/103)	0% (0/103)
Adenovirus 1	0% (0/103)	4% (4/103)	4% (4/103)
Adenovirus 2	0% (0/103)	0% (0/103)	0% (0/103)
Coronavirus	0% (0/103)	0% (0/103)	0% (0/103)
ERBV	2% (2/103)	13% (13/103)	15% (15/103)
ERAV	0% (0/103)	0% (0/103)	0% (0/103)
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	4% (4/103)	26% (27/103)	30% (31/103)
<i>S. equi subsp. equi</i>	0% (0/103)	13% (13/103)	13% (13/95)

EIV: equine influenza virus; EHV: equine herpesvirus; EAV: equine arteritis virus; ERBV: equine rhinitis virus B; ERAV: equine rhinitis virus A

2002). In the present study, EHV5 was detected in almost half of the horses showing acute respiratory signs and often in combination with EHV2 or other pathogens. However, EHV5 was the sole pathogen in 11 of the included horses. EHV5 has been isolated from healthy horses as well as from horses with a variety of respiratory diseases, making its clinical importance difficult to interpret (Dunowska et al., 1999; Nordengrahn et al., 2002). Recently, EHV5 has often been mentioned in relation to equine multinodular pulmonary disease. None of the horses of the present study developed lesions compatible with this condition. A second interesting finding was the absence of EIV in the studied population. Possible explanations might be the widespread vaccination against EIV in Belgium and the narrow timeframe for virus detection, namely 24 hours after the onset of clinical signs (Gilkerson et al., 2015; Kirkland et al., 2011). For respiratory bacteria, the frequent presence of *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* (30%) is difficult to interpret, since this opportunistic pathogen can be a normal inhabitant of the upper airways (Lindahl et al., 2013). However, the presence of *Streptococcus equi*

subsp. equi is always significant and warrants immediate action to prevent spread to other horses.

Next to the difficulties of random sampling, another important limitation of this study was the lack of a control group for prevalence determination in healthy horses. More studies and serological surveys would be very useful to compare prevalences of this subset of respiratory pathogens in healthy versus ill horses, in order to gain more insight into the true pathogenicity of these agents.

CONCLUSION

The present study indicates that equine gamma herpesviruses are most frequently detected in nasal samples of horses with acute respiratory disease in Belgium. As recommended for bovine respiratory diseases in Belgium and already applied in France and the UK for equine respiratory infections (Legrand et al., 2013; O'Neill et al., 2014; Pardon, 2014; Pardon et al., 2011), national surveillance of respiratory viruses in horses by PCR analysis on nasal swabs might

be a useful, early-warning system for viral epidemics. However, more large scale surveillance studies are needed both in healthy and sick horses, to evaluate the value of nasal swab PCR analysis results in a population of horses for early detection of threatening epidemics. Most probably, longitudinal studies with follow-up in time will be needed for this purpose.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was coordinated by Equi Focus Point Belgium, in cooperation with Dierengezondheidszorg Vlaanderen and Arsia Wallonië. We thank Zoetis Belgium, the Belgian Horse Confederation (BCP-CBC) and the Belgian Equine Practitioner Society (BEPS) for their financial support.

LITERATURE

- Akkutay, A.Z., Osterrieder, N., Damiani, A., Tischer, B.K., Borchers, K., Alkan, F. (2014). Prevalence of equine gammaherpesviruses on breeding farms in Turkey and development of a TaqMan MGB real-time PCR to detect equine herpesvirus 5 (EHV-5). *Archives of Virology* 159, 2989-2995.
- Dunowska, M., Meers, J., Wilks, C.R., 1999. Isolation of equine herpesvirus type 5 in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 47, 44-46.
- Gilkerson, J.R., Bailey, K.E., Diaz-Mendez, A., Hartley, C.A. (2015). Update on viral diseases of the equine respiratory tract. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 31, 91-104.
- Hue, E.S., Fortier, G.D., Fortier, C.I., Leon, A.M., Richard, E.A., Legrand, L.J., Pronost, S.L. (2014). Detection and quantitation of equid gammaherpesviruses (EHV-2, EHV-5) in nasal swabs using an accredited standardised quantitative PCR method. *Journal of Virological Methods* 198, 18-25.
- Hue, E.S., Fortier, C.I., Laurent, A., Quesnelle, Y., Fortier G.D., Legrand L.J., Pronost, S.L. (2015). Development and validation of a quantitative PCR method for equid herpesvirus-2 diagnostics in respiratory fluids. *Journal of Visualized Experiments* 109, 53-67.
- Kirkland, P.D., Davis, R.J., Gu, X., Frost, M. (2011). Application of high-throughput systems for the rapid detection of DNA and RNA viruses during the Australian equine influenza outbreak. *Australian Veterinary Journal* 89, 38-39.
- Legrand, L.J., Pitel, P.H., Marcillaud-Pitel, C.J., Cullinane, A.A., Courouge, A.M., Fortier, G.D., Freymuth, F.L., Pronost, S.L. (2013). Surveillance of equine influenza viruses through the RESPE network in France from November 2005 to October 2010. *Equine Veterinary Journal* 45, 776-783.
- Lindhahl, S.B., Aspan, A., Baverud, V., Paillot, R., Pringle, J., Rash, N.L., Soderlund, R., Waller, A.S. (2013). Outbreak of upper respiratory disease in horses caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ST-24. *Veterinary Microbiology* 166, 281-285.
- Nordengrahn, A., Merza, M., Ros, C., Lindholm, A., Palf, V., Hannant, D., Belak, S. (2002). Prevalence of equine herpesvirus types 2 and 5 in horse populations by using type-specific PCR assays. *Veterinary Research* 33, 251-259.
- Nordengrahn, A., Rusvai, M., Merza, M., Ekstrom, J., Morein, B., Belak, S. (1996). Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: prevention of the bifactorial disease with EHV-2 immunostimulating complexes. *Veterinary Microbiology* 51, 55-68.
- O'Neill, R., Mooney, J., Connaghan, E., Furphy, C., Graham, D.A. (2014). Patterns of detection of respiratory viruses in nasal swabs from calves in Ireland: a retrospective study. *Veterinary Record* 175, 351.
- Pardon, B. (2014). Developing an early warning system for bovine respiratory disease. *Veterinary Record* 175, 349-350.
- Pardon, B., De Bleecker, K., Dewulf, J., Callens, J., Boyen, F., Catry, B., Deprez, P. (2011). Prevalence of respiratory pathogens in diseased, non-vaccinated, routinely medicated veal calves. *Veterinary Record* 169, 278.
- Van Erck-Westergren, E., Franklin, S.H., Bayly, W.M. (2013). Respiratory diseases and their effects on respiratory function and exercise capacity. *Equine Veterinary Journal* 45, 376-387.

Tandheelkunde bij het paard in de 21^e eeuw Deel 2: onderzoek van de paardenmond en diagnostische hulpmiddelen voor detectie van gebitspathologie

*Equine dentistry in the 21st century
Part 2: dental examination of the horse's mouth and diagnostic techniques
for detection of dental disease*

¹E. Pollaris, ²E. Van der Vekens, ²I. Gielen, ²C.P. Crijns, ¹L. Vlamincx

¹Vakgroep Heelkunde en Anesthesie van de Huisdieren

²Vakgroep Medische Beeldvorming van de Huisdieren en Orthopedie van de Kleine Huisdieren
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, België

Elke.pollaris@ugent.be
Lieven.vlaminck@ugent.be

SAMENVATTING

In deel één van deze tweeluik over tandheelkunde bij het paard dat in nummer 4 van dit tijdschrift in 2015 is verschenen, werden de verschillende afwijkingen van het paardengebit toegelicht. In dit tweede deel wordt gefocust op de diagnostiek van gebitspathologie. Centraal hierin staat de uitvoering van een correct mondonderzoek in combinatie met het gebruik van een juiste terminologie/nomenclatuur om de aangetroffen pathologie te noteren op een gebitsfiche. Diagnostische, beeldvormende technieken, zoals dentale endoscopie, radiografie, computertomografie, scintigrafie en MRI leveren complementaire informatie die toelaat het probleem beter te situeren en prognostische en therapeutische conclusies te trekken.

ABSTRACT

In the first part of this series of articles on modern equine dentistry, which was published in the fourth issue of this journal in 2015, different dental pathologies in the horse were reviewed. In this second part, the focus is directed towards how these diseases can be diagnosed. This involves the implementation of a proper oral examination combined with the use of correct terminology/nomenclature to record the encountered pathology on a dental record sheet. Several dental diagnostic imaging techniques, such as oral endoscopy, radiography, computed tomography, scintigraphy and MRI provide complementary information on the identification of the exact disease process, a prerequisite to deduct proper prognostic and therapeutic conclusions.

INLEIDING

Het gebruik van de juiste terminologie en een uniforme nomenclatuur van de aangetroffen gebitspathologie zijn van groot belang om miscommunicatie te voorkomen. Om aan te geven over welke tand(en) gerapporteerd wordt, wordt gebruik gemaakt van het 'gewijzigde triadansysteem' (Pollaris en Vlamincx, 2015). De lokalisatie van letsels op een tand kunnen aangeduid worden met apicaal (naar de apex of tandwortel toe), occlusaal (kauwoppervlak), buccaal (wangzijde), labiaal (de zijde van de lippen), linguaal (de zijde van de tong), palataal (de zijde van het gehemelte), interproximaal (de ruimte tussen twee tanden), mesiaal (voorzijde (maaltand) of mediale

zijde (snijtand)) en distaal (achterzijde (maaltand) of laterale zijde (snijtand)). De aangetroffen pathologie kan zowel grafisch als tekstueel genoteerd worden op speciaal daarvoor gemaakte tandenfiches (Easley en Tremaine, 2011).

Een algemeen klinisch onderzoek van de patiënt blijft aangewezen alvorens het eigenlijke mondonderzoek te starten. Dit houdt ook het afnemen van een uitgebreide anamnese in waarbij er gefocust wordt op onder andere het eetgedrag van het paard (traag eten, propfen maken, kieskeurig zijn, hypersalivatie, etc.), het voorkomen van rijtechnische klachten (bitafweer, in het bit hangen, hoofdschudden, de tong over het bit steken, etc;) en het ontstaan van opvallende bijkomende symptomen in de regio van het hoofd, zoals

halitose, neusvloeï, zwellingen, fistulatie, etc. Na het verzamelen van de klinische basisinformatie betreffende de lichaamstemperatuur, pols- en ademhalingsfrequentie, de kleur slijmvliezen, de capillaire vulingstijd (CVT), long-hart-buikauscultatie, de “body condition score” (BCS) en mogelijke randinformatie (inspectie van de stal op bijvoorbeeld proppen, mestcontrole op lange vezels), wordt finaal de brede regio van hoofd en hals aan nader onderzoek onderworpen (Easley en Tremaine, 2011).

DIAGNOSE VAN GEBITSPROBLEMEN

Het specifiek klinisch onderzoek start met een grondige palpatie van deze regio. Er wordt naar de symmetrie van het hoofd gekeken alsook naar het voorkomen van abnormaliteiten, zoals zwellingen, neusvloeï, fistels, etc. Er wordt een palpatie uitgevoerd van de kauwspieren (m. masseter en m. temporalis), het temporomandibulair gewricht, de regionale lymfeknopen (Inn. Parotidei, Inn. mandibulares en Inn. retropharyngei) en de aflijning van de mandibula (zwellingen, eruptiecyten) (Easley en Tremaine, 2011). In geval klachten zich vooral manifesteren tijdens het rijden kan een grondige inspectie van het hoofdstel en bit eveneens een nuttige bijdrage leveren in het zoeken naar de etiologie en het aanreiken van een oplossing (Bennett, 2011).

Het mondonderzoek

Het eigenlijke onderzoek gebeurt steeds bij het geseedeerd dier. Vaak wordt hiervoor een combinatie van een alfa2-agonist en een opioïde gebruikt, bijvoorbeeld detomidine (0,01-0,02 mg/kg) en butorphanol (0,02-0,05 mg/kg). De functionaliteit van het gebit wordt gecontroleerd door de rostrocaudale en laterale beweging van de onderkaak ten opzichte van de bovenkaak te beoordelen. Afwijkingen hierop kunnen een aanwijzing zijn voor een abnormaal oclusiepatroon ter hoogte van de maaltanden (Rucker, 2004). Alvorens een speculum in de mond aan te brengen, worden de snijtanden aan een grondige inspectie onderworpen, zowel op het vlak van oclusie en slijtage, als op hun klinische conditie (intactheid van de klinische kroon, aansluiting van het tandvlees, tandsteen, etc.). Het slijtagepatroon van het kauwoppervlak van de mandibulaire snijtanden en de eruptie van de maaltanden kunnen gebruikt worden om een leeftijdsschatting uit te voeren. In Tabel 1 worden de verschillende betrouwbare parameters geïllustreerd die hiervoor gebruikt worden. Wanneer de geschatte leeftijd sterk afwijkend is van de eigenlijke leeftijd van het paard heeft het gebit mogelijk een abnormale slijtage ondergaan. De leeftijdsschatting uitgevoerd bij een paard met een duidelijk abnormale slijtage van de snijtanden, bijvoorbeeld bij een kribbebijter en bij overbeet, is uiterst onbetrouwbaar (Muylle et al., 1996).

Bij het mondonderzoek wordt gestart met het grondig spoelen van de mondholte voor evacuatie van voedselresten, alvorens het speculum ingebracht wordt en geopend. Een goede lichtbron en het ondersteunen van het hoofd met een staander of een ophangstelsysteem zijn een noodzaak. In een oogopslag kan een eerste indruk opgedaan worden van de algemene toestand van het gebit. In een gezond gebit staan alle tanden perfect achter elkaar, hebben de klinische kronen dezelfde hoogte en blijven er geen voedselresten achter in de mond. Vervolgens wordt de hele mond systematisch en grondig onderzocht. Ter hoogte van de mandibulaire lagen kunnen verwondingen aanwezig zijn, veroorzaakt door het bit. Door de duimen erover te laten glijden, kan men voelen naar onregelmatigheden en de reactie van het paard bij druk hierop observeren. Ditzelfde wordt eveneens gedaan ter hoogte van de maxillaire lagen, waardoor meer frequent onder andere de aanwezigheid van (blinde) wolfskiezen kan vastgesteld worden. Inspectie van tong en wangen kunnen slijmvliesverwondingen aan het licht brengen (acuut tot chronisch). Deze zijn een duidelijke aanwijzing voor het voorkomen van scherpe emailpunten. Door het aftasten van de maaltandenrijen (buccale zijde bovenaan en linguale zijde onderaan) kunnen de exacte lokalisatie en uitgebreidheid van deze punten in kaart gebracht worden. Tijdens verdere inspectie en palpatie van de mond wordt aandacht besteed aan asymmetrieën, kroonhoogte, intactheid van de kroon, diastemata tussen tanden en de mobiliteit van de individuele elementen (Easley en Tremaine, 2001; Tremaine, 2005). Parodontitis wordt veroorzaakt door de opstapeling van rottend voedsel tussen de tanden en wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van een typische geur die opvalt bij het spoelen van de mond of aan de vingers blijft hangen na palpatie van diastemata (Gieche en Moyer, 2010).

Door het tellen van de tanden kan men gemakkelijk een diagnose van hypo- of polydontie stellen. Te veel tanden kan wijzen op een echte polydontie maar kan ook te wijten zijn aan het persisteren van een melktand. Een persisterende melksnijtand wordt regelmatig vastgesteld en kan gemakkelijk gedifferentieerd worden van een definitieve tand op basis van macroscopische kenmerken. Terwijl een melksnijtand kleiner, witter en kelkvormig is, zal een definitieve tand meer balkvormig zijn en bruin verkleurd door impregnatie van donkere pigmenten uit plantaardig voedsel. Ook vertoont de labiale zijde van de klinische kroon één (onderkaak) of twee (bovenkaak) longitudinale groeven (Muylle, 2011) (Figuur 1). De persisterende melktand is vaak labiaal gepositioneerd ten opzichte van de permanente tand of kan zich tussen twee permanente tanden in bevinden. Bij twijfel kan een correcte differentiatie gebeuren aan de hand van een radiografisch onderzoek (Dixon et al., 1999; Dixon, 2011). Het identificeren van persisterende melkmaaltanden (doppen) is veelal ook door eenvoudige visuele inspectie mogelijk in combinatie met een goede kennis van het tijdstip van het wisselen van de

Tabel 1. Parameters voor de leeftijdsbepaling bij het paard. Onderstaande tabel is van toepassing op dravers. Afhankelijk van het paardenras kunnen hier kleine verschillen op bestaan (Muylle et al., 1996). (weken = w; maanden = m; jaar = j).

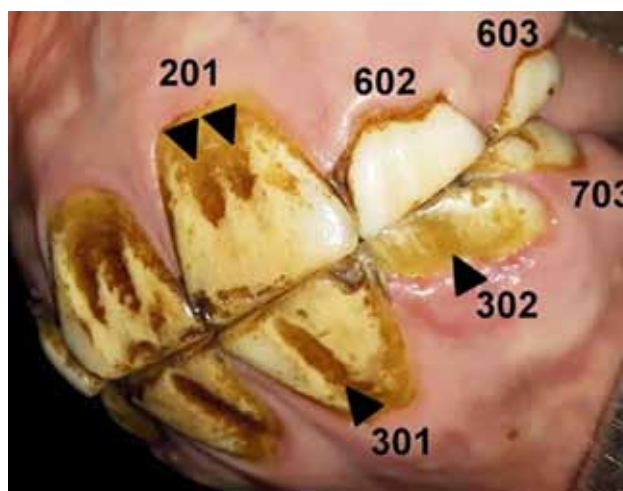
Snijtanden	'01	'02	'03
Eruptie melksnijtanden	Enkele dagen	3-6w	6m
Eruptie definitieve snijtanden	3j	4j	5j
Verschuiven tandster	5j	6j	7j-8j
Witte zone in de tandster	7j-8j	9j-11j	11j-13j
Verdwijnen kroonholtebodemp	18j	19j-20j	19j-20j
Premolaren	'06	'07	'08
Eruptie definitieve premolaren	2,5	3	4
Molaren	'09	'10	'11
Eruptie	1	2	3,5

premolaren (Tabel 1). Vaak wordt een scherpe aflijning gezien tussen de resterende dunne 'dop' en de daaronder erupterende kies (Figuur 2A). Bovendien is een verhoogde mobiliteit van de dop voelbaar. Bij afwezigheid van deze duidelijke kenmerken kan differentiatie uitgevoerd worden op basis van het uitzicht van het kauwoppervlak. De kroon van een recent gewisselde premolaar is korter dan deze van de omliggende tanden. Het kauwoppervlak is meer afgerond en wordt in de bovenkaak gekenmerkt door diepe infundibulae als gevolg van de afwezigheid van slijtage (Figuur 2B). Bij twijfel kan ook hier een radiografisch onderzoek een definitieve diagnose mogelijk maken (Dixon en Dacre, 2005).

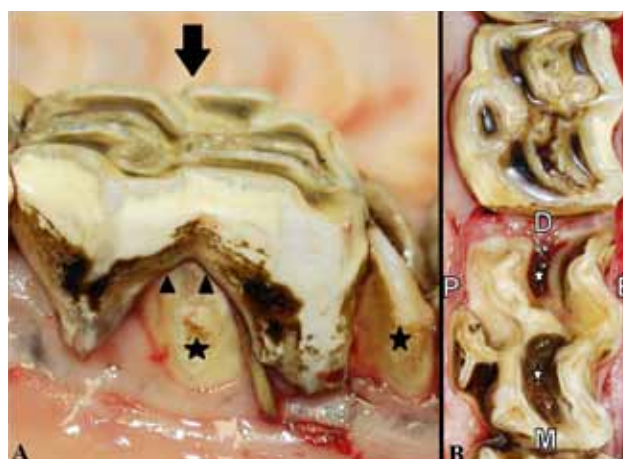
Het gebruik van een tandspiegel en/of orale endoscopie

Om elke individuele tandkroon en het omliggende tandvlees goed te kunnen beoordelen, is het gebruik van een spiegeltje of een orale endoscoop vereist aangezien de paardenmond slechts in beperkte mate geopend kan worden en het zicht op de tanden gehinderd wordt door de volumineuze tong. Dit probleem stelt zich vooral bij de meest caudale elementen. Een tandspiegel is makkelijker te gebruiken in praktijkomstandigheden, alhoewel de markt van orale endoscopen de laatste jaren sterk geëvolueerd is naar gebruiksvriendelijke toestellen voorzien van een geïntegreerde lichtbron en draadloos gestreamd beeld naar een laptop of tablet. Meestal wordt gebruik gemaakt van een 40-50 cm rigide scoop met een beeldhoek van 70-90°. Een flexibele endoscoop kan eveneens gebruikt worden maar houdt aanzienlijk meer risico's in op beschadiging van de kwetsbare buitenzijde van de endoscoop. Het uitvoeren van orale endoscopie vergt een nog diepere sedatie om voortdurende kauw- en tongbewegingen te voorkomen. Tijdens het onderzoek wordt elke tand systematisch bekeken, zowel op het kauwoppervlak als langs de buccale en palatale/linguale zijde (Tremaine, 2005; Simhofer et al., 2008).

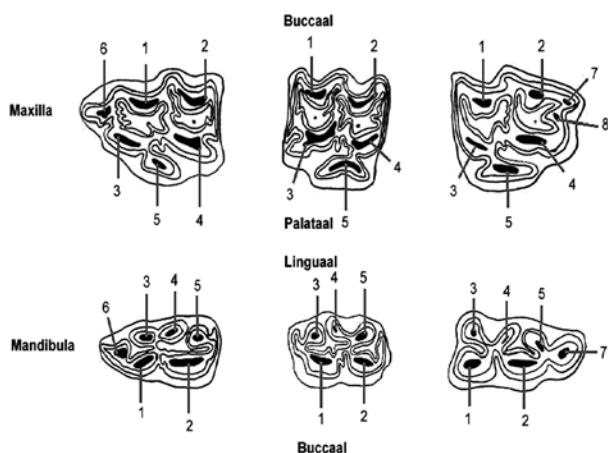
De vitaliteit van een individueel element kan deels beoordeeld worden door een goede inspectie en het aftasten van de tandsterren met een scherp instrument. Het poreuze secundair dentine waaruit ze gevormd



Figuur 1. Het onderscheid tussen een melksnijtand en een definitieve snijtand. Elementen 201, 301 en 302 zijn gewisseld. Deze definitieve tanden zijn balkvormig en bezitten één labiale groeve (pijlpunt) in de onderkaak en twee in de bovenkaak. Melkelementen 602, 603 en 703 zijn nog aanwezig. Deze melksnijtanden zijn witter, kleiner en kelkvormig.



Figuur 2. Het onderscheid tussen een melkpremolaa (dop) en een definitieve kies. A. De aflijning tussen de melktand (pijl) en de definitieve maaltand (ster) is duidelijk zichtbaar (pijlpunt). B. De recent gewisselde (maxillaire) maaltand ligt lager dan het occlusievlak van de overige tanden. Het kauwvlak is nog niet in slijtage en vertoont daarom diepe infundibulae (ster). P: palataal, B: buccaal, D: distaal, M: mesiaal.



Figuur 3. Nummeringssysteem tandsterren volgens du Toit et al. (2008). Ter hoogte van elementen '07 tot en met '10 zijn er vijf tandsterren zichtbaar. Het kauwvlak van de '06 elementen en de mandibulaire '11n vertonen er zes en de maxillaire '11 elementen tellen er zeven.



Figuur 4. Open pulpakanaal. Pulpa 1 van element 206 is geëxposeerd. Het secundaire dentine is zwart gekleurd en er is voedsel aanwezig. De scherpe punt van een "dental explorer" verdwijnt diep in deze tandster, wat bij een intacte tandster niet mogelijk is.

worden, beschermt de onderliggende uitlopers van het pulpasysteem (de pulpahoorns) van direct contact met de bacteriële flora in de mond. Elke maaltand heeft een specifiek tandsterpatroon, waarvoor een nummeringssysteem werd ontwikkeld (du Toit et al., 2008) (Figuur 3). Een snijtand heeft slechts één tandster, een haaktand heeft er geen (ondervindt geen slijtage). Wanneer de pulpa afsterft, bijvoorbeeld ten gevolge van een primaire pulpitis (hematogene infectie), wordt er geen secundair dentine meer gevormd, wat onder invloed van de voortdurende slijtage van de tand na verloop van tijd aanleiding geeft tot het ontstaan van een verbinding tussen het pulpakanaal en het kauwvlak. Tijdens het kauwproces wordt daarop voedsel tot diep in het pulpakanaal geduwd, wat de ontwikkeling van een ernstige tandwortelinfectie verder in de hand kan werken. Een dergelijk 'open pulpakanaal' kan men herkennen door een uitgesproken



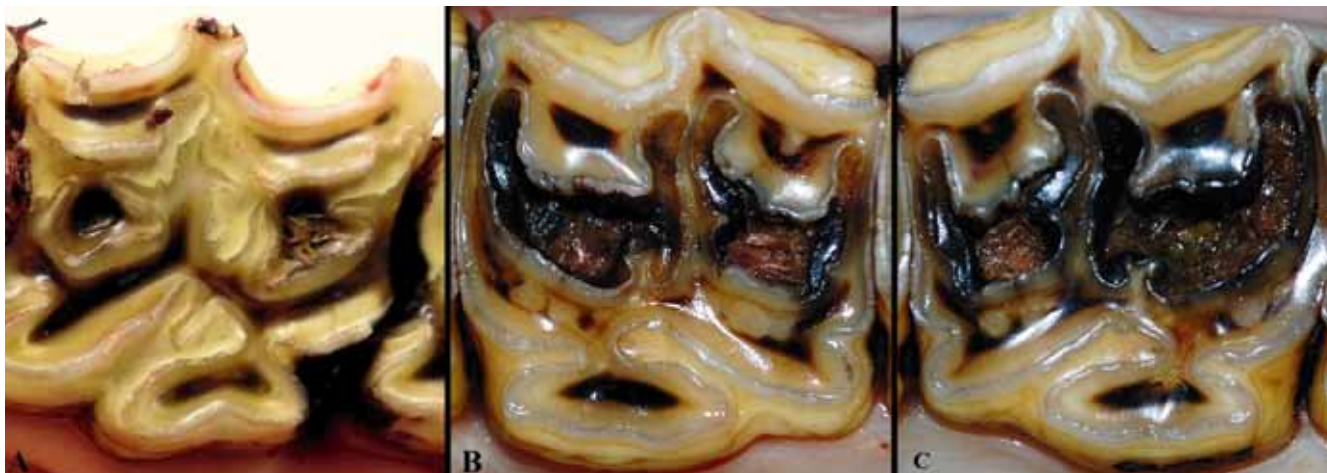
Figuur 5. Kroonfractuur van een mandibulaire maaltand. Met behulp van een orale endoscoop kan een fractuur van een maaltand in beeld gebracht worden. Aan de distolinguale zijde van deze mandibulaire maaltand (409) is er een fragment afgebroken met expositie van pulpa 5 (rode pijl). Onder invloed van de resulterende pulpitis en slijtage van het kauwvlak is ook pulpa 2 geëxposeerd geraakt (witte pijl). Het secundaire dentine is zwart gekleurd en centraal in de tandster is er necrotisch materiaal aanwezig.



Figuur 6. Tandfissuur. Het kauwvlak van deze mandibulaire maaltand bevat twee fissuren. Vaak vertrekken deze fissuren vanuit een tandster (zwarte pijl), wat echter niet altijd het geval is (witte pijl).

donkere (bruin-zwarte) verkleuring van de tandster op het kauwoppervlak en de centrale aanwezigheid van voedselresten. Deze diagnose kan bijkomend bevestigd worden door het aftasten van het kauwoppervlak met een scherp instrument ("dental explorer"). De tip van het instrument kan daarbij in het centrum van een aangetaste tandster vasthaken (Figuur 4). Dergelijke bevindingen laten in aanwezigheid van duidelijke externe tekenen van een tandwortelinfectie (lokale zwelling, fistulatie) de identificatie van het mogelijk betrokken element reeds toe, alvorens aanvullend radiografisch onderzoek dit bevestigt (Casey en Tremaine, 2010; van den Enden en Dixon, 2008).

In aanwezigheid van een apicale infectie identificeerde Ramzan (2009) allerlei subtiele symptomen die door orale scopie kunnen opgepikt worden. De meest voorkomende zijn, naast het open pulpakanaal, retractie van het tandvlees, afzetting van tandsteen op



Figuur 7. Infundibulumnecrose. Afhankelijk van de uitgebreidheid van dit cariësproces kan men een graad toekennen van 1 tot 3 waarbij in oplopende graad enkel het cement (A) aangetast is, bijkomend het email (B) en tot slot ook het dentine (C) betrokken is. Graad 4 wordt toegekend wanneer de tand sagittaal gebroken is, apicaal geïnfecteerd is, of wanneer beide infundibulae met elkaar versmolten zijn.

de klinische kroon ter hoogte van de gingivale rand en kleine fistels in het tandvlees. Bij beperkte fracturen van de klinische kroon, bijvoorbeeld een buccale chipfractuur van een maxillaire kies, kan orale scopie de betrokkenheid van tandsterren en dus expositie van pulpaweefsel detecteren (Figuur 5). Occasioneel worden fissuren in het kauwoppervlak van maaltanden gevonden, waarvan het belang alsnog onduidelijk is (Dixon et al., 2006; Ramzan, 2009) (Figuur 6). Cariës van de maxillaire infundibulae of infundibulumnecrose kan gegradeerd worden op basis van de uitgebreidheid van de aantasting (Dacre, 2005; Erridge et al., 2012; Gere en Dixon, 2010) (Figuur 7). De ernst van deze cariës bepaalt het risico op het ontwikkelen van een pathologische fractuur en/of een apicale infectie, wat de beslissing beïnvloedt om over te gaan tot een infundibulaire restauratie (Pearce, 2012). Orale scopie maakt het finaal mogelijk om de ernst van parodontale problemen te beoordelen en te scoren na het reinigen en verwijderen van voedsel uit interproximale subgingivale pockets (Figuur 8). Het laat ook toe de genezingsevolutie op te volgen na behandeling van deze problematiek (Ramzan, 2009).

Aanvullend kunnen de bovenste luchtwegen beoordeeld worden door een klassieke endoscopie wanneer patiënten aangeboden worden met een vermoeden van secundaire sinusitis door tandpathologie (stinkende unilaterale neusvloeï). Een bijkomende sinusscopie laat toe de inwendige structuren van de paranasale sinussen te visualiseren en het betrokken sinuscompartiment te identificeren (Barakzai, 2011; Perkins en Schumacher, 2011).

Beeldvormingstechnieken voor de diagnose van gebitspathologie

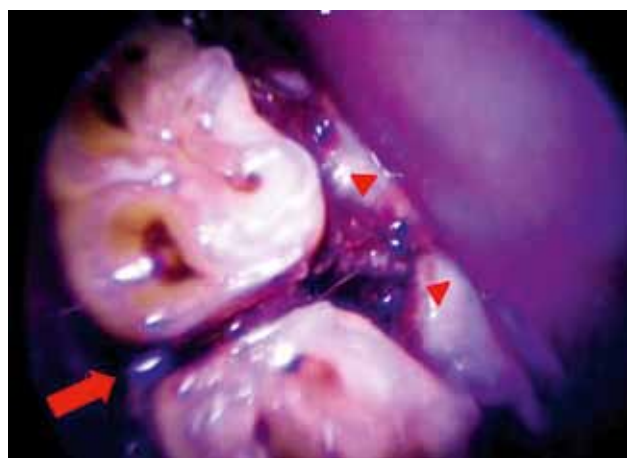
Het radiografisch onderzoek van het paardengebit

Radiografische opnamen van het paardenhoofd zijn een onmisbare aanvulling in de diagnostiek van

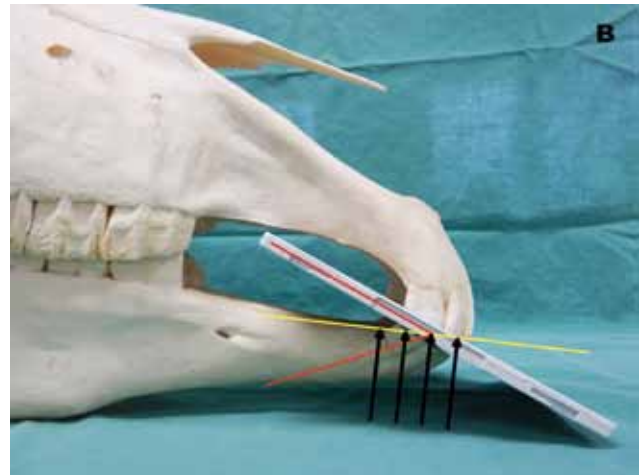
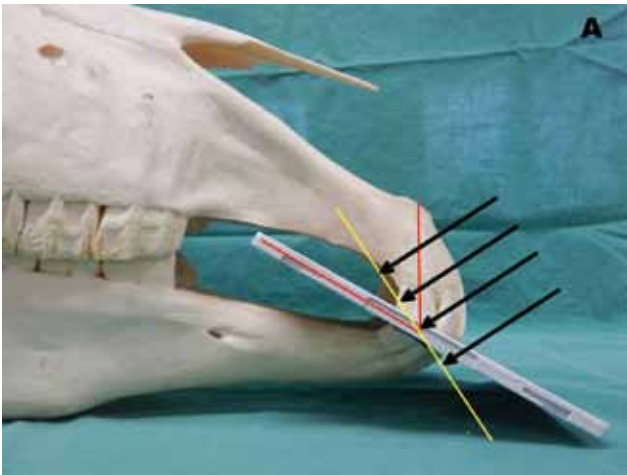
gebitspathologie. Het vergt echter enige oefening om de specifieke regio's van het gebit correct in beeld te brengen en de opnames vervolgens correct te interpreteren. Halsters met metalen sluitingen of ringen moeten vermeden worden, aangezien superimpositie een onderliggende pathologie kan maskeren. Het hoofd wordt bij voorkeur ondersteund met een staander, wat het stabiel positioneren en het bepalen van de juiste projectiehoek vergemakkelijkt (Barakzai, 2011; Baratt, 2013; Easley, 2002; Tremaine, 2012).

Snijtanden en haaktanden

De snijtanden (en haaktanden) worden radiografisch in beeld gebracht door een intraorale opname. Een kleine cassette, bijvoorbeeld 21x27 cm; met beschermhuls, wordt zo ver mogelijk caudaal in de mond ingebracht. De röntgenbuis wordt niet loodrecht



Figuur 8. Parodontitis. De graad van ontsteking van het tandvlees kan goed beoordeeld worden na het verwijderen van het voedsel. Voedselopstapeling in het diastema (rode pijl) heeft een ontsteking en retractie van het tandvlees veroorzaakt waardoor er een diepe parodontale pocket (pijlpunten) ontstaan is.



Figuur 9. De radiografische projectierichting voor een intraorale opname van de snijtanden (en haaktanden). De “bisecting angle”-techniek wordt hier gebruikt om de maxillaire (A) en mandibulaire (B) snijtanden in beeld te brengen. Hiervoor wordt een hoek gemaakt van 90° (zwarte pijlen) ten opzichte van de lijn die de hoek tussen snijtanden en cassette in gelijke helften verdeelt (gele lijn).



Figuur 10. Latero-laterale radiografische opname van snijtanden en lagen. Op het niveau van de gingivale aansluiting met de tand is er een fractuur zichtbaar van de kroon van de snijtanden (rode pijl) met een minimale verplaatsing van de fragmenten naar palataal.



Figuur 11. Links 15° ventraal-rechts dorsale, schuine radiografische opname. Er is een rudimentaire haaktand aanwezig in de linkerlaag van de mandibula (rode pijl) en in de rechterlaag van de maxilla (groene pijl).

op de cassette gericht, maar 90° op het vlak tussen de cassette en de snijtanden (“bisecting angle”-techniek) (Figuur 9). Om de centrale snijtanden (‘01n en ‘02n) in beeld te brengen, wordt recht op deze tanden gecentreerd. Deze opname kan aangevuld worden met een meer laterale, intraorale projectie om de buitenste snijtanden (‘03n) afzonderlijk in beeld te brengen (Barakzai, 2011; Baratt, 2013). Een standaard latero-laterale (LL) opname vervolledigt de projecties van deze regio (Figuur 10). Om de lagen (en eventuele wolfskiezen) in beeld te brengen, is een laterale, schuine projectie aangewezen. De projectierichting is loodrecht op de lengteas van het hoofd zoals voor een LL-opname maar met een kleine dorsoventrale hoek van 15-20° (Barakzai, 2011) (Figuur 11).

Maaltanden

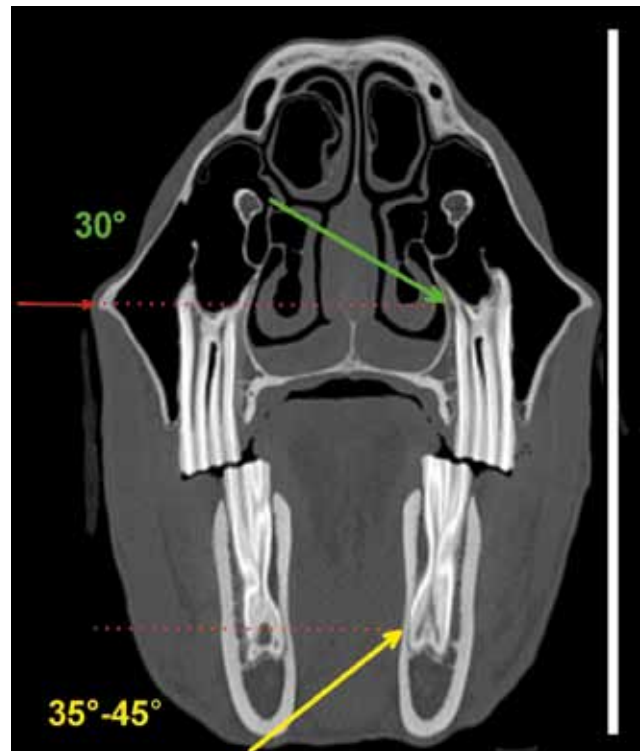
De standaardprojecties om de maaltanden in beeld te brengen zijn de latero-laterale, latero30° dorsaal-lateroventrale, schuine, latero35-45° ventraal-latero-dorsale, schuine en dorsoventrale projectie (Barakzai, 2011; Baratt, 2013; Tremaine, 2012). De projectierichting verloopt loodrecht op de lengteas van het hoofd. De cassette wordt parallel tegenover deze lengteas gepositioneerd aan de te onderzoeken zijde van het hoofd. Een goede collimatie is belangrijk om een gedetailleerd beeld te verkrijgen.

De laterolaterale projectierichting is horizontaal en loodrecht op de lengteas van het hoofd en gecentreerd net dorsaal van de punt van de crista facialis.

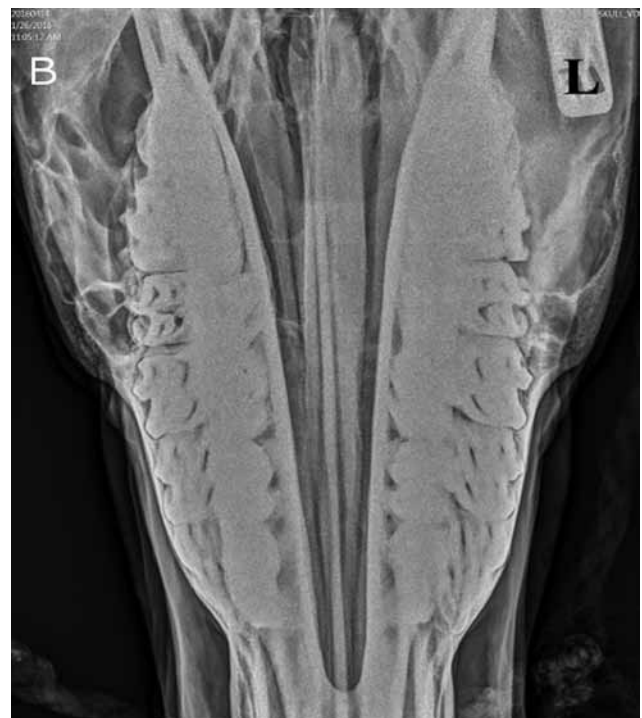
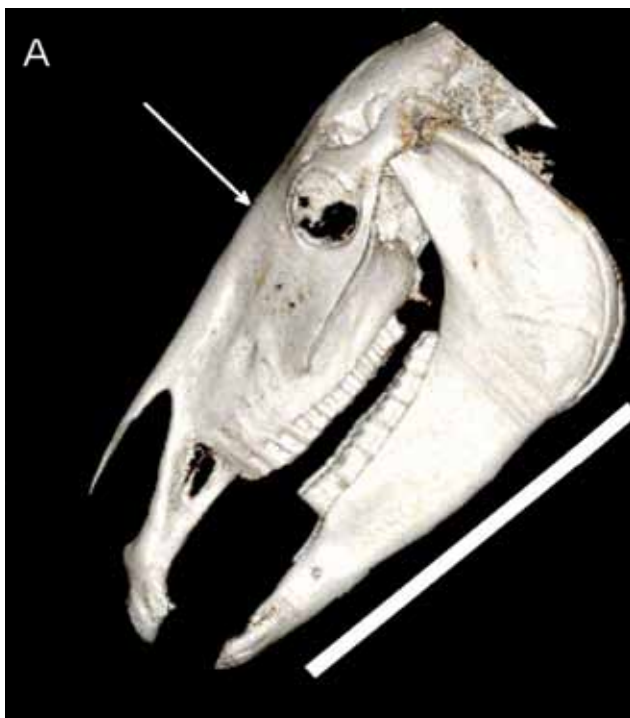
(Figuur 12, 19). Deze opname levert vooral informatie op over de sinusholten, i. e. vloeistoflijn, wekedelendensiteit, etc., maar laat geen differentiatie toe tussen de linker- en rechterhelft van het hoofd. Daarom is deze projectie niet geschikt voor de beoordeling van de apicale zones van de maaltanden (Barakzai, 2011; Baratt, 2013).

De latero30°dorsaal-lateroventrale, schuine en latero35-45°ventraal-laterodorsale, schuine projecties worden genomen om de tandwortels van de respectievelijk maxillaire en mandibulaire maaltanden te beoordelen. Voor de maxillaire maaltanden wordt enkele centimeters dorsaal van het rostrale aspect van de crista facialis gecentreerd (Figuur 12, 18). Een licht caudo-craniaal verschoven projectierichting tegenover de lengteas van het hoofd kan de meer caudaal gelegen tanden beter in beeld brengen. Voor de onderkaak wordt gecentreerd op de regio waarin men geïnteresseerd is, bijvoorbeeld waar de zwelling zich bevindt (Barakzai, 2011; Tremaine, 2012) (Figuur 12, 16, 17).

De röntgenbuis wordt bij de dorsoventrale projectie niet loodrecht op het voorhoofd gericht, maar loodrecht op de ventrale rand van de mandibula waarbij er in de middellijn gecentreerd wordt op het niveau van de mediale ooghoeken. De cassette wordt parallel gehouden met beide zijden van de mandibula en zo ver mogelijk naar caudaal (Figuur 13A). Het is belangrijk dat het hoofd kaarsrecht gehouden wordt om een beeld bruikbaar voor interpretatie te bekomen (Barakzai, 2011). Deze opname laat toe afwijkingen ter hoogte van de ventrale conchale sinus, de neusgangen, het neusseptum en de maxillaire sinuscomplexen te beoordelen (Figuur 13B). Ondanks het feit dat de mandibulaire en maxillaire maaltanden elkaar



Figuur 12. Verschillende radiografische projectierichtingen voor onderzoek van de maaltanden op een transversaal CT-beeld. De cassette (witte rechthoek) bevindt zich aan de aangetaste zijde, parallel met de lengteas van het hoofd. Een latero-laterale projectie (rode pijl) wordt gecentreerd net dorsaal van de punt van de crista facialis. Voor de maxillaire maaltanden (groene pijl) wordt nog iets meer dorsaal van dit punt gecentreerd onder een hoek van 30° van dorsaal naar ventraal. Een mandibulaire projectie (gele pijl) centreert zich op de regio die men in beeld wil brengen, onder een hoek van 35-45° van ventraal naar dorsaal.



Figuur 13. Dorsoventrale radiografische opname. A. De positionering van de cassette en de projectierichting voor een dorsoventrale radiografische opname. B. Het linkersinuscomplex (L) heeft een veralgemeende verhoogde radiopaciteit ten opzichte van het rechtersinuscomplex.

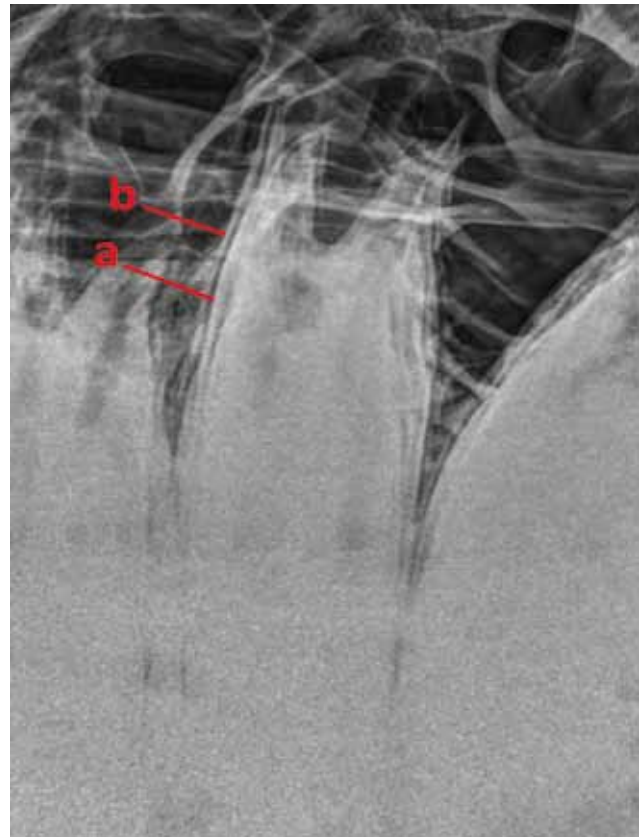
grotendeels overlappen, kan men toch de mediale cortex van de mandibula en het laterale aspect van de maxilla beoordelen. Ook in gevallen van kaakfracturen, verplaatste tanden of zwellingen bij periapicale infecties kan deze opname een goede aanvulling zijn om het onderzoek te vervolledigen (Barakzai, 2011; Baratt, 2013).

Minder courant gebruikte opnames zijn onder andere een dorsoventrale projectie met offset mandibula, schuine opnamen met open mond en intraorale opnames van maaltanden, waarbij een flexibele cassette in de mond wordt aangebracht (Barakzai, 2011; Baratt, 2013; Easley, 2002).

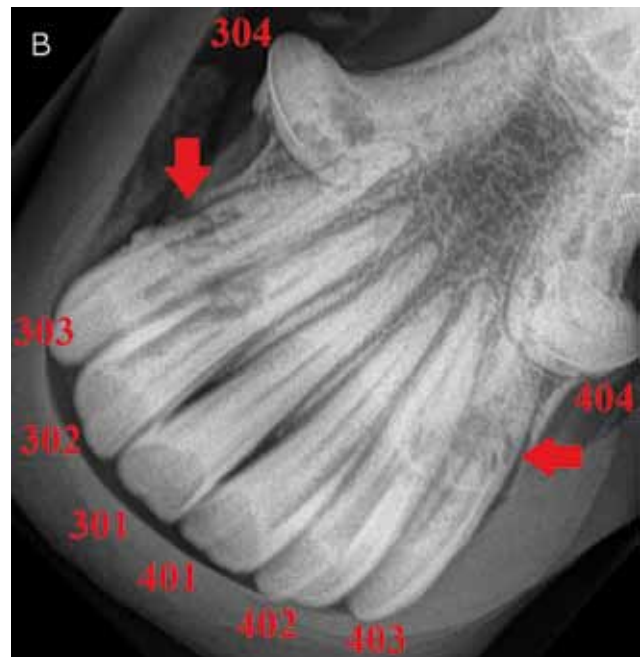
Normale radiografische anatomie

Een tand is een zeer radiodense structuur die gemakkelijk te identificeren is op radiografische opnames. De dunne, radiolucente lijn die de wortel en reservekroon van de paardentand omgeeft, is de parodontale ruimte. Deze wordt op haar beurt afgelijnd door een radiodense lijn, namelijk de lamina dura, of het alveolaire botweefsel (Figuur 14).

De klinische kroon van de snijtanden is bedekt met cement, wat radiografisch zichtbaar is als een radiodense aflijning. Afhankelijk van de leeftijd van het paard is er ter hoogte van de snijtanden al of niet een duidelijk afgelijnde wortel aanwezig die bij jonge dieren een duidelijk open apicaal foramen vertoont. Het wortelkanaal (pulpakanaal) is zichtbaar als een radiolucent lint centraal in de snijtand. Ook het infundibulum van de snijtanden is zichtbaar. Het is kegelvormig



Figuur 14. Normale radiografische anatomie van een maaltand. De apicale zones van de maaltanden worden op een schuine opname beoordeeld. Deze maxillaire maaltand wordt afgelijnd door een dunne radiolucente zone (a) die op haar beurt omringd wordt door een radiodense lijn (lamina dura) (b).



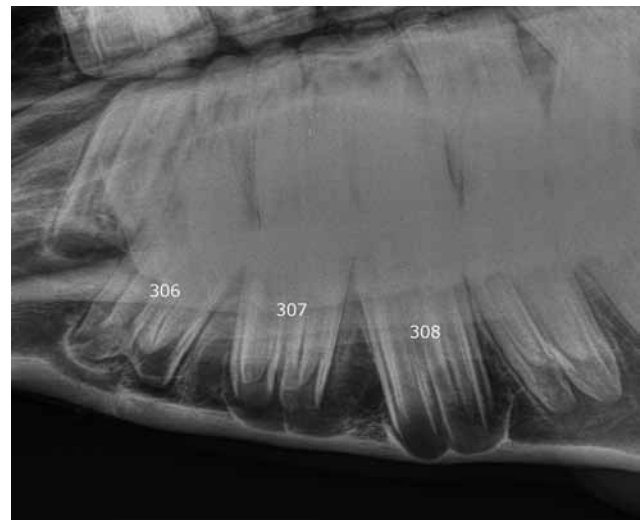
Figuur 15. A. Intra-orale radiografische opname van maxillaire snijtanden. De centrale snijtanden worden goed uitprojecteerd. Zowel het infundibulum (rode pijlpunten) als het pulpakanaal (gele pijlpunten) kunnen geïdentificeerd worden. B. Intra-orale radiografische opname van mandibulaire snij- en haaktanden. De centrale snijtanden ('01) zijn radiografisch normaal. Er is een duidelijk afgelijnde wortel, maar het infundibulum kan niet geïdentificeerd worden waaruit afgeleid kan worden dat het een ouder paard is. Het wortelkanaal (pulpakanaal) is over de hele lengte centraal in de snijtand zichtbaar als een radiolucente lijn. De '03 elementen vertonen duidelijke tekenen van EOTRH. Er is kroonresorptie (rode pijlen) van het middelste derde van de tanden. Ook de haaktand 304 is aangetast.

en afgelijnd door email, waardoor deze structuur opaker is ten opzichte van de rest van de tand (Barakzai, 2011; Baratt, 2013) (Figuur 15).

De apicale zone van een maaltand varieert sterk in functie van de leeftijd van het dier. Bij jonge dieren wordt deze gekenmerkt door een afronding zonder onderscheid van individuele wortels. Naarmate het dier ouder wordt, ontwikkelen deze wortels zich verder. Tijdens het wisselingsproces (2-4 jaar) wordt het radiografisch beeld van vooral mandibulaire premolaren gekenmerkt door een uitgesproken apicale radiolucentie, de afwezigheid van de apicale lamina dura, en het sterk verdunnen tot zelfs onderbroken lijken van de ventrale mandibulaire cortex. Dit is een normaal fysiologisch verschijnsel en wordt aangeduid met de term eruptiecyste (Barakzai, 2011; Tremaine, 2012) (Figuur 16).

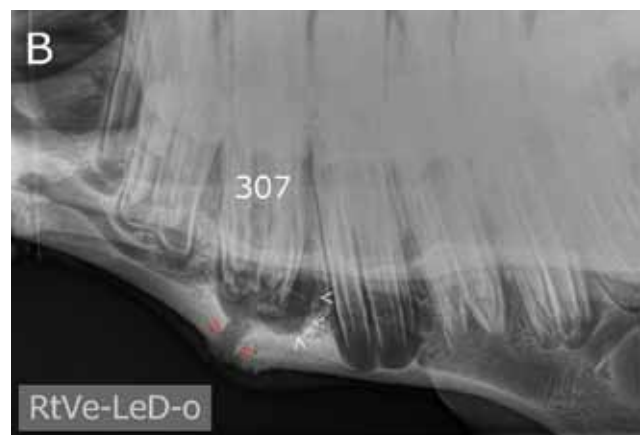
Radiografische veranderingen in aanwezigheid van een apicale infectie

Radiografische veranderingen in een vroeg stadium van periapicale infecties worden gekenmerkt door een verbreding van de parodontale ruimte en het verlies of grillig verloop van de lamina dura (Figuur 17A). Na verloop van tijd ronden de tandwortels af en ondergaat het alveolaire bot lytische veranderingen, waardoor een toegenomen apicale radiolucentie ontstaat (apicale halo). In een chronisch stadium ontwikkelt zich hierrond sclerose door nieuwbeenvorming rond de betrokken alveole (Figuur 17B, Figuur 18). Ook kan zich extra cement (hypercementosis) vormen ter hoogte van de apex van de tandwortel (Baker, 1971; Baratt, 2013, Dacre et al., 2008a; Dacre et al., 2008b; Gibbs en Lane, 1987; Townsend et al., 2009). Correcte identificatie van een geïnfecteerde tand in aanwezigheid van een drainerende fistel kan door het aanbrengen van een metalen probe (Dacre et al., 2008a; Dacre et al., 2008b).

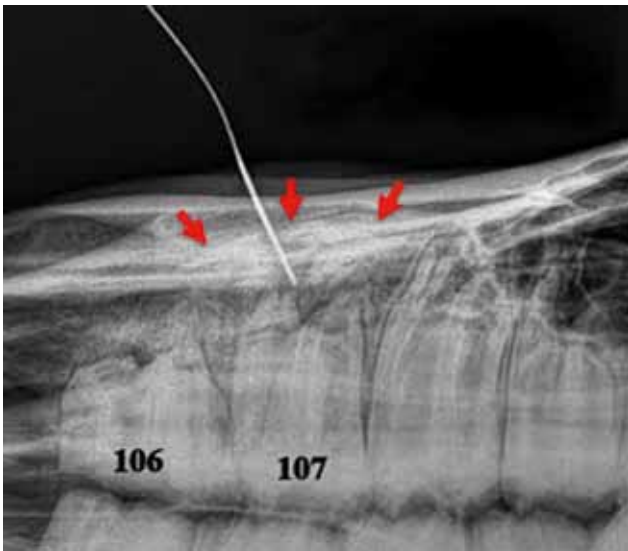


Figuur 16. Rechts35°ventraal-links dorsale, schuine radiografische opname van de premolaren in de linkeronderkaak. De apicale regio van element 308 is uitgesproken radiolucent. De onderliggende cortex is sterk verdund. Dit is typisch voor een zich ontwikkelende tand en wordt een eruptiecyste genoemd.

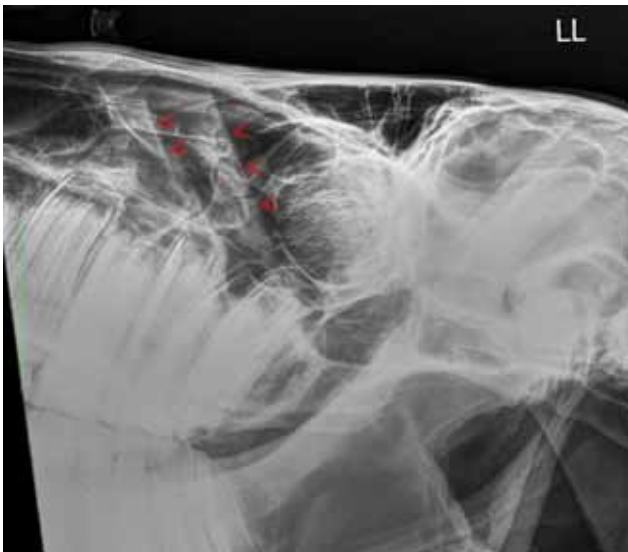
In een studie van Townsend et al. (2009) werden een zeer hoge specificiteit en een matige sensitiviteit voor radiografie bij de diagnose van apicale infecties ter hoogte van de maaltanden aangetoond. Hierbij waren de meest consequente en samenhangende radiografische veranderingen die die enkel zichtbaar zijn in het chronisch stadium, namelijk periapicale sclerose, halovorming (lucentie) en het afronden van de wortels. De veranderingen in het vroege stadium, zoals het verwijden van de parodontale ruimte en het verlies van de lamina dura, werden als minder betrouwbaar bevonden. Er zijn dus niet in elk geval duidelijke radiografische veranderingen zichtbaar, wat het belang van een goed uitgevoerd mondonderzoek onderbouwt en het gebruik van bijkomende beeldvormingstechnieken stimuleert.



Figuur 17. Verschillende stadia van apicale infectie ter hoogte van element 307. In beide gevallen is er fistulatie doorheen de mandibulaire cortex zichtbaar (rode pijlpunten). A. Recenter stadium van apicale infectie. De parodontale ruimte ter hoogte van de distale wortel is verbreed (witte pijlpunten), de ventrale mandibulaire cortex is sclerotisch en verdikt. Rond de apices van element 308 is er eveneens een apicale radiolucentie aanwezig, maar deze eruptiecyste mag niet geïnterpreteerd worden als een apicale infectie. B. Chronisch stadium van apicale infectie: een sterk verbrede parodontale ruimte omgeeft onregelmatig afgelijnde worteltoppen.



Figuur 18. Rechts30°ventraal-linksdorsale, schuine radiografische opname. Een metalen probe werd in een fistelgang ingebracht die uitmondt ter hoogte van de mesiale wortel van element 107. Beide tandwortels zijn ingekort (“blunting”). De periodontale ruimte rond de apices is verwijd, de lamina dura is onregelmatig en er is sclerose (rode pijlen) aanwezig. Er is ook “blunting” van de mesiale wortel van element 106. De periodontale ruimte is ter hoogte van deze zone verwijd en onregelmatig afgelijnd.



Figuur 19. Latero-laterale radiografische opname. De aanwezigheid van een dubbele vloeïstoflijn (rode pijlpunten) duidt op de aanwezigheid van vloeïstof in de sinus en is indicatief voor sinusitis.

In de bovenkaak kan een apicale infectie van elementen ('08)'09 – '11 aanleiding geven tot de ontwikkeling van sinusitis aangezien de wortels van deze tanden zich in de bodem van de sinus bevinden. Het identificeren van een vloeïstoflijn op een latero-laterale radiografische opname is pathognomonisch voor het bestaan van een actieve sinusitis (Figuur 19). In sommige gevallen manifesteert sinusitis zich eerder als een veralgemeende, verhoogde radiopaciteit over

het volledige oppervlak of delen van de aangetaste sinuscompartimenten (Baratt, 2013).

Radiografische veranderingen in aanwezigheid van “equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis” (EOTRH)

Deze progressieve, destructieve aandoening van de snijtanden (en haaktanden) is op basis van verschillende klinische parameters duidelijk te diagnosticeren. Radiografische opnames zijn echter onontbeerlijk om de ernst van de aantasting duidelijk te maken (Baratt, 2013; Earley en Rawlinson, 2013) (Figuur 15B).

Computertomografie

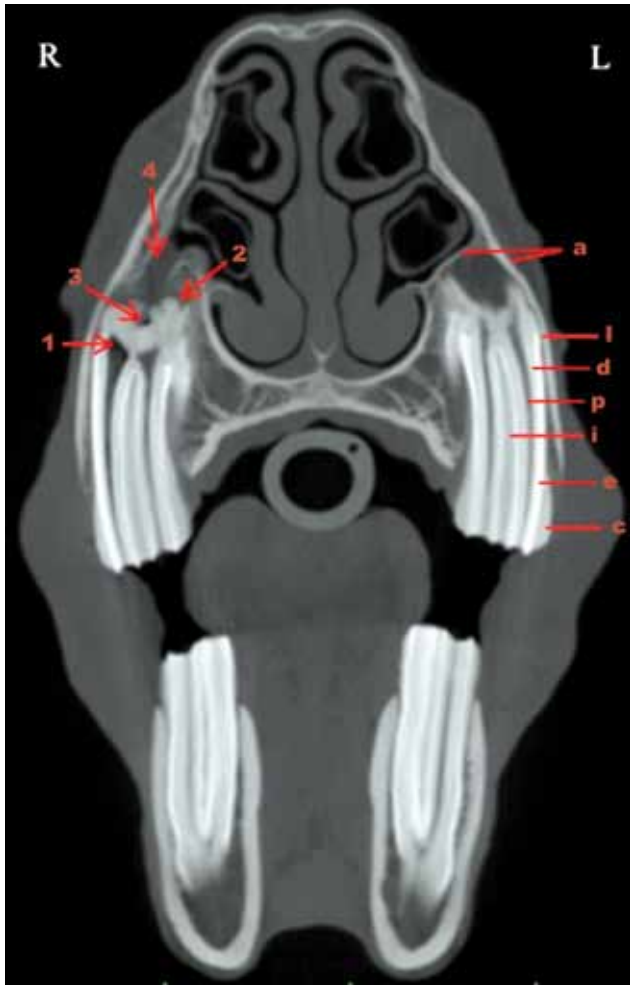
Door de superpositie van verschillende structuren op een tweedimensionaal beeld kan de interpretatie van radiografische opnames van het hoofd sterk bemoeilijkt worden. Om de structuren beter te kunnen beoordelen, kan er daarom in selectieve gevallen een CT-scan van het hoofd gemaakt worden. Hoewel hiervoor meestal een algemene anesthesie noodzakelijk is, zijn er tegenwoordig ook toestellen beschikbaar die toelaten om de scan uit te voeren op het staande, gesedeerde dier. Deze nieuwe mogelijkheid vormt een grote vooruitgang (Townsend et al., 2009). De studies leveren zeer gedetailleerde beelden op waarbij de verschillende structuren in en rond de tand zonder superpositie beoordeeld kunnen worden. CT heeft hierdoor een hogere sensitiviteit en specificiteit voor de diagnose van een apicale infectie dan conventionele radiografie (Baratt, 2013; Solano en Brawer, 2004; Tietje et al., 1996; Windley et al., 2009a).

De kenmerken van een apicale infectie op CT-beelden zijn de aanwezigheid van een hypodense pulpakanaal (Figuur 20), een verhoogde botdichtheid van het pulpakanaal, verbreding van de parodontale ruimte en fragmentatie van de tandwortel. Tandfracturen zijn eenvoudig waar te nemen op een CT-scan waarbij de eventuele betrokkenheid van pulpakanalen kan aangetoond worden. Bij infundibulumnecrose is er een hypodense zone aanwezig in het infundibulum. Dit kan echter ook bij normale tanden gevonden worden (hypoplasie van het infundibulaire cement) en mag dus niet altijd aanzien worden als een pathologie. Een CT-scan is bovendien van grote waarde voor de diagnostiek rond de betrokkenheid van het sinuscomplex in een bestaande infectie. Sinusitis kan zich manifesteren als een verdikking van het sinusvlies alsook door opstapeling van vocht in de verschillende compartimenten (Heninger et al., 2003; Solano en Brawer, 2004; Windley et al., 2009b; Veraa et al., 2010).

Scintigrafie

Infectieuze problemen (apicale infectie) van het gebit kunnen eveneens in beeld gebracht worden door middel van een scintigrafisch onderzoek, waar-

bij hogere concentraties van intraveneus toegediende, radioactieve isotopen zich bevinden ter hoogte van zones met verhoogde bot-turn-over zoals bij inflammatoire processen, bijvoorbeeld bij parodontitis en sinusitis, de zogenaamde “hot spots”. Deze techniek heeft een heel hoge sensitiviteit en een gemiddelde specificiteit (Weller et al. 2001). Op basis van een verhoogde opname kan echter geen diagnose gesteld worden, omdat deze niet specifiek is voor één welbepaalde pathologie. Een bijkomende moeilijkheid om



Figuur 20. Transversaal CT-beeld in botvenster ter hoogte van de 07's. De mandibulaire maaltanden en de linker maxillaire maaltand in deze studie zijn normaal. Alle bouwstenen van de tand hebben een andere densiteit. Van buiten naar binnen worden het hypodense cement (c), het hyperdense email (e) en daaronder het minder dense dentine (d) dat de hypodense pulpakanaalen (p) aflijnt, aangetroffen. In de maxillaire maaltanden kunnen de infundibulae (i) duidelijk afgelijnd worden. Het periodontale ligament (l) is zichtbaar als een dunne lijn die de tand van het alveolaire bot (a) scheidt. De rechter maxillaire maaltand vertoont duidelijk de typische kenmerken van een apicale infectie. Er is een verbreding van het pulpakanaal en er is een lucht opaciteit (1) aanwezig in het pulpakanaal. De worteltoppen zijn afgestompt (2), er is lucht opaciteit (3) aanwezig in de periodontale ruimte en het alveolaire bot is onderbroken (4).

deze beelden te interpreteren is de verhoogde opname in het alveolaire bot naarmate het paard ouder wordt, wat inhoudt dat er leeftijdsgebonden verschillen zijn (Archer et al., 2003; Barakzai et al., 2006). Een nadeel van deze techniek is het uiterst gespecialiseerde materiaal en de specifieke voorzieningen die vereist zijn om met radioactief materiaal te werken (Weller et al., 2001). Toch is deze onderzoeksmethode een goede aanvulling wanneer radiografieën niet afdoend zijn. Weller et al. (2001) beschreven namelijk dat er één week na infectie al veranderingen kunnen waargenomen worden op scintigrafie. Wanneer de resultaten van een scintigrafie vervolgens samengelegd worden met deze van een radiografisch onderzoek, wordt er zowel een hoge sensitiviteit als specificiteit bekomen.

Magnetic Resonance Imaging (MRI)

Deze beeldvormingstechniek maakt gebruik van magneetvelden en radiogolven, die vervolgens omgezet worden in beelden. Er is weinig literatuur voorhanden over MRI in de tandheelkunde aangezien de conventionele MRI voornamelijk geschikt is om de weke delen in beeld te brengen en harde structuren die geen waterstof bevatten, zoals de tand, hypointens of zwart blijven. Hövener et al. (2012) zijn erin geslaagd om de tand en zijn inwendige structuren zeer gedetailleerd in beeld te brengen in een ex-vivostudie. Dit is tot op heden echter niet mogelijk op een volledig paardenhoofd. Het is wel mogelijk om het endodontisch complex te beoordelen met MRI. Een aangetaste pulpa wordt geïdentificeerd als een vergroot pulpakanaal dat onregelmatig afgelijnd is. Bovendien heeft het een lagere intensiteit (Gerlach et al., 2013). MRI zou in de toekomst verdere mogelijkheden kunnen openen voor de diagnostiek van pulpitis en het nut van endodontische behandelingen ondersteunen (Hövener et al., 2012).

LITERATUUR

- Archer, D. C., Blake, C. L., Singer, E. R., Boswell, J. C., Cotton, J. C., Edwards, G. B., Proudman, C. J. (2003). Scintigraphic appearance of selected diseases of the equine head. *Equine Veterinary Education* 15, 305-313.
- Baker G.J. (1971). Some aspects of equine dental radiology. *Equine veterinary journal* 3, 46-51.
- Barakzai S.Z., (2011). Dental imaging. In: Baker G.J., Easley J. (editors). *Equine Dentistry*. 2nd Edition, 99-109.
- Barakzai S., Tremaine H., Dixon P.M., (2006). Use of scintigraphy for diagnosis of equine paranasal sinus disorders. *Veterinary Surgery* 35, 94-101.
- Baratt R. (2013). Advances in equine dental radiology. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 29, 367-395.
- Bennet D.G., (2011). Bits, bridles and accessories. In: Easley J., Dixon P.M., Schumacher J. (editors). *Equine Dentistry*. 3rd Edition, 85-96.
- Casey M.B., Tremaine W.H., (2010). The prevalence of secondary dental lesions in cheek teeth from horses with

- clinical signs of pulpitis compared to controls. *Equine Veterinary Journal* 42, 30–36.
- Dacre I.T., (2005). Equine dental pathology. In: Baker G.J., Easley J., (editors). *Equine Dentistry*. 2nd Edition, 99–109.
- Dacre I.T., Kempson S., Dixon P.M., (2008a). Pathological studies of cheek teeth apical infections in the horse. *The Veterinary Journal* 178, 341–351.
- Dacre I.T., Kempson S., Dixon P.M., (2008b). Pathological studies of cheek teeth apical infections in the horse. *The Veterinary Journal* 178, 352–363.
- Dixon P.M., (2011). Disorders of development and eruption of the teeth and developmental craniofacial abnormalities. In: Easley J., Dixon P.M., Schumacher J. (editors). *Equine Dentistry*. 3rd Edition, 99–113.
- Dixon P.M., Dacre I.T., (2005). A review of equine dental disorders. *The Veterinary Journal* 169, 165–187.
- Dixon P.M., Dacre I., Kempson S., Smith L., (2006). Idiopathic cheek teeth fractures, including practice-based and hospital-based surveys. *American Association of Equine Practitioners, Volume 52*.
- Dixon P.M., Tremaine W.H., Pickles K., Kuhns L., Hawe C., McCann J., McGorum B., Railton D.I., Brammer S., (1999). Equine dental disease. Part 1: a long-term study of 400 cases: disorders of incisor, canine and first premolar teeth. *Equine Veterinary Journal* 31, 369–377.
- Earley E., Rawlinson J.T., (2013). A new understanding of oral and dental disorders of the equine incisor and canine teeth. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 29, 273–300.
- Easley J., (2002). A new look at dental radiography. In: *Proceedings of the 48th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. American Association of Equine Practitioners, 412–420.
- Easley J., Tremaine W.H., (2011). Dental and oral examination. In: Easley J., Dixon P.M., Schumacher J. (editors). *Equine Dentistry*. 3rd Edition, 185–198.
- Erridge M.E., Cox A.L., Dixon P.M., (2012). A histological study of peripheral dental caries of equine cheek teeth. *Journal of Veterinary Dentistry* 29, 150–156.
- Gere I., Dixon P.M., (2010). Post mortem survey of peripheral dental caries in 510 Swedish horses. *Equine Veterinary Journal* 42, 310–315.
- Gerlach, K., Ludewig, E., Brehm, W., Gerhards, H. and Delling, U. (2013) Magnetic Resonance imaging of pulp in normal and diseased equine cheek teeth. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 54, 48–53.
- Gibbs C., Lane J.G. (1987). Radiographic examination of the facial, nasal and paranasal sinus regions of the horse. *Equine Veterinary Journal* 19, 474–482.
- Gieche J.M., Moyer W.A., (2010). How to assess the equine periodontium. *American Association of Equine Practitioners*, 441–449.
- Henninger W., Frame E.M., Willmann M., Simhofer H., Malleczek D., Kneissl S.M., Mayrhofer E., (2003). CT features of alveolitis and sinusitis in horses. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 44, 269–276.
- Hövenner J.B., Zwick S., Leupold J., Eisenbeib A.K., Scheifele C., Schellenberger F., Hennig J., Elverfeldt D., Ludwig U., (2012). Dental MRI: imaging of soft and solid components without ionizing radiation. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 36, 841–846.
- Muylle S., (2011). Aging. In: Easley J., Dixon P.M., Schumacher J. (editors). *Equine Dentistry*. 3rd Edition, 85–96.
- Muylle S., Simoens P., Lauwers H., (1996). Ageing horses by an examination of their incisor teeth: an (im)possible task? *Veterinary Record* 138, 295–301.
- Pearce CJ, (2012). Equine cheek teeth infundibular restorations: long-term follow up results in 223 procedures in 92 horses. *Equine Veterinary Journal Limited*, 103–107.
- Perkins J.D., Schumacher J., (2011). Ancillary diagnostic techniques. In: Easley J., Dixon P.M., Schumacher J. (editors). *Equine Dentistry*. 3rd Edition, 231–237.
- Pollaris E., Vlamincck L., (2015). Tandheelkunde bij het paard in de 21e eeuw - Deel 1. Afwijkingen van het paardengebit. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 84, 223–231.
- Ramzan P.H., (2009). Oral endoscopy as an aid to diagnosis of equine cheek tooth infections in the absence of gross oral pathological changes: 17 cases. *Equine Veterinary Journal* 41, 101–106.
- Rucker B.A., (2004). Equine cheek teeth angle of occlusion: how to calculate and clinical use for incisor shortening. *Equine Veterinary Education* 16, 137–142.
- Simhofer H., Griss R., Zetner K., (2008). The use of oral endoscopy for detection of cheek teeth abnormalities in 300 horses. *The Veterinary Journal* 178, 396–404.
- Solano M., Braver R.S., (2004). CT of the equine head: technical considerations, anatomical guide, and selected diseases. *Clinical Techniques in Equine Practice* 3, 374–388.
- Tietje S., Becker M., Böckenhoff G., (1996). Computed tomographic evaluation of head diseases in the horse: 15 cases. *Equine Veterinary Journal* 28, 98–105.
- Townsend N.B., Barakzai S.Z., Nelson A.H., (2009). An investigation into the sensitivity and specificity of standing computed tomography in the diagnosis of dental associated sinusitis in 27 horses. In: *Proceedings of the 48th BEVA Congress*. *Equine Veterinary Journal Ltd.*, 240.
- Tremaine W. H., (2005). Dental endoscopy in the horse. *Clinical Techniques in Equine Practice* 4, 181–187.
- Tremaine H. (2012). A modern approach to equine dentistry. *In Practice* 34, 114–127.
- Veraa S., Voorhout G., Klein W.R., (2010). Computed tomography of the upper cheek teeth in horses with infundibular changes and apical infection. *Equine Veterinary Journal* 41, 872–876.
- Van den Enden M.S.D., Dixon P.M., (2008). Prevalence of occlusal pulpar exposure in 110 equine cheek teeth with apical infections and idiopathic fractures. *The Veterinary Journal* 178, 364–371.
- Weller R., Livesey L., Maierl J., Nuss K., Bowen I.M., Cauvin E.R., Weaver M., (2001). Comparison of radiography and scintigraphy in the diagnosis of dental disorders in the horse. *Equine Veterinary Journal* 33, 49–58.
- Windley, Z., Weller, R., Tremaine, W. H., Perkins, J. D. (2009a). Two and three dimensional computed tomographic anatomy of the enamel, infundibulae and pulp of 126 equine cheek teeth. Part 1: Findings in teeth without macroscopic occlusal or computed tomographic lesions. *Equine Veterinary Journal* 41, 433–440.
- Windley, Z., Weller, R., Tremaine, W. H., Perkins, J. D. (2009b). Two and three dimensional computed tomographic anatomy of the enamel, infundibulae and pulp of 126 equine cheek teeth. Part 2: Findings in teeth with macroscopic occlusal or computed tomographic lesions. *Equine Veterinary Journal* 41, 441–447.

‘Le jumart’: myth or mystery in animal reproduction?*‘Le jumart’: mythe of mysterie in de dierlijke reproductie?***¹P.E.J. Bols, ²H.F.M. De porte**¹Laboratory For Veterinary Physiology and Biochemistry, Department of Veterinary Sciences, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, Gebouw U, B-2610, Wilrijk, Belgium²Department of Farm Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands

peter.bols@uantwerpen.be

A BSTRACT

There was a time when science still had to ‘hatch’. An era during which man often extrapolated existing knowledge to a level beyond reality. That period is not as far behind us as we would like to believe. Breeding of animals has always stimulated man’s fantasy. Out of this, a very interesting myth - or is it a mystery? - was born: the existence of a hybrid between horse and cow, ‘Le Jumart’.

On top of the very well-known hybrids between horses and donkeys, the French ‘capitaine des haras’ Francois Alexandre de Garsault (1692-1778) describes the procedure of how to create a hybrid between a cow and a horse in his widespread and well known ‘Nouveau Parfait Maréchal’, first published in 1741. In depth research showed that he was far from being the only one who believed in the existence of such a crossover species. Other well-respected contemporary scientists even dedicate chapters in their textbooks on this animal, such as the French naturalist and medical doctor Jean-Pierre Buchoz (1731-1807) in his ‘Traité Economique et Physique de Gros Menu Bétail’ published in 1778. Even opinion leaders Charles Bonnet (1720-1793) and Lazzaro Spallanzani (1729-99) were convinced that these animals really roamed around in France during the 18th century. Finally, even the founder of the first ‘Ecole Vétérinaire’ in the world, Claude Bourgelat (1712-1779) testified in a letter to Bonnet to have admired the product of a stallion and a cow with his own eyes. Fortunately, the debate could count on important disbelievers as well, with Albrecht von Haller taking the lead by publishing a paper in the ‘Supplément à l’Encyclopédie ou Dictionnaire Raisonné des Sciences, des Arts et Métiers’ (1777), in which he calls the existence of the Jumart a ‘fable’. It would take another century for André Suchet (1849-1910) to publish an ‘Extrait des Mémoires de la Société Zoologique de France’ with the title ‘La Fable des Jumarts’ (1889). Extremely interested in hybridization, this 19th century politician and member of several scientific societies, faces the challenge to finally steer the scientific community to a general conclusion on this enigma. This paper describes in a chronological order the rise and fall of one of the most intriguing ‘fabula’ in reproductive medicine and how it took emerging modern science about 200 years to decide on ‘myth’ or ‘mystery’.

SAMENVATTING

Ooit was er een tijd waarin de wetenschap zich nog moest ‘ontpoppen’. Een tijdperk waarin de mens bestaande kennis extrapoleerde tot een niveau dat vaak de werkelijkheid oversteeg. Geloof het of niet, maar deze periode ligt niet zo ver achter ons. Voordat dieren in lactatie kunnen komen, moeten ze zich voortplanten. En de voortplanting van dieren heeft de fantasie van de mens altijd al geprikkeld. Uit deze fantasie ontstond een zeer interessante mythe – of is het een mysterie?: het bestaan van een kruising tussen een paard en een rund, ‘le jumart’.

Naast de alom bekende kruising tussen een paard en een ezel beschreef de Franse ‘capitaine des haras’, Francois Alexandre de Garsault (1692-1778), in zijn wijdverspreide en bekende ‘Nouveau Parfait Maréchal’, dat voor het eerst werd gepubliceerd in 1741, de kruising tussen een paard en een rund. Uit verder onderzoek blijkt dat hij niet de enige was die geloofde in het bestaan van een dergelijke

hybride soort. Andere gerespecteerde ‘moderne’ wetenschappers hebben zelfs volledige hoofdstukken in hun handboeken aan deze diersoort gewijd, zoals de Franse naturalist en arts, Jean-Pierre Buchoz (1731-1807), in zijn ‘Traité Economique et Physique de Gros Menu Bétail’ (1778). Ook de opinie-makers Charles Bonnet (1720-93) en Lazzarro Spallanzani (1729-99) waren ervan overtuigd dat deze dieren de weiden begraasden in het Frankrijk van de 18^e eeuw. Zelfs de oprichter van de eerste ‘Ecole Vétérinaire’ ter wereld, Claude Bourgelat (1712-1779), getuigde in een brief aan Bonnet dat hij een nakomeling van een hengst en een koe met zijn eigen ogen had mogen aanschouwen. Gelukkig kon het debat ook rekenen op belangrijke tegenstanders, met Albrecht von Haller als een van de belangrijkste voortrekkers. Von Haller publiceerde in de ‘Supplément à l’Encyclopédie ou Dictionnaire Raisonné des Sciences, des Arts et Métiers’ (1777) een bijdrage waarin hij het bestaan van de jumart als een fabel afdeed.

Pas een eeuw later publiceerde André Suchetet (1849-1910) een ‘Extrait des Mémoires de la Société Zoologique de France’ met als titel ‘La Fable des Jumarts’ (1889). Deze 19^{de}-eeuwse politicus, die als lid van meerdere wetenschappelijke verenigingen een grote interesse toonde in hybridisatie, aanvaardde de uitdaging om de wetenschappelijke wereld naar een algemene conclusie over dit enigma te leiden.

In deze paper worden in chronologische volgorde de opkomst en val beschreven van een van de meest fascinerende ‘fabula’ in de voortplantingsgeneeskunde en een antwoord geformuleerd waarom de opkomende moderne wetenschap er tweehonderd jaar heeft over gedaan om te bepalen of dit een mythe dan wel een mysterie was.

INTRODUCTION

The debate on the existence of the ‘jumart’, a hybrid between the bovine and equine species, is one of the oldest, most intense but yet less known controversies in animal reproduction and veterinary medicine. Although well known in France, where it seems to be part of the ‘national heritage’, this myth is hardly known by nowadays scientists or veterinarians in the rest of the world. Apart from the major question ‘true or false’, the way the debate is conducted is very intriguing, with roles for the classical believers and non-believers and the extreme importance of the opinion leaders in contemporary science.

This long lasting discussion is held by a broad variety of actors, from the old ‘écuyers’ (riding masters) and ‘maréchaux’ (blacksmiths) over 18th century naturalists, biologists, physiologists, physicians and the founders of veterinary medicine. As can be expected, some information is available on the Internet with a few brief papers. However, hardly any references are made to original books and journals and one of the corner stone documents in this amazing story is completely missing, the dissertation written by André Suchetet in 1889. In the current paper, we will attempt to track down the origin and evolution of this myth - or will it turn out to be a mystery? - by referring to original written sources. While the dissertation of André Suchetet will be our leading thread, we will try to track the myth of the jumart chronologically and comment briefly along the way on the early ‘scientific’ literature in veterinary medicine. We will highlight the role of French écuyer François Alexandre de Garsault as one of the opinion leaders early and throughout the 18th century and mention other sources from mainly French contemporary literature. Further on, the role

of Claude Bourgelat, the founder of the first ‘Ecole Vétérinaire’ in the world seemed to be crucial for the evolution of the scientific opinion on this matter. But even long after his death, it will take the ‘final report’ of Suchetet to draw the ultimate conclusions.

Before to start this interesting discussion, let us define the subject of our study. During the 16th up to 19th century, people in certain geographical regions, mainly in France, adhered to the idea of the existence of a hybrid species that resulted from mating individuals of the bovine species (*Bos Taurus*) to equids (*Equus caballus* and *Equus Asinus*). This way, four different combinations are possible, all of which have been ‘seen’ by the believers: bull x mare, cow x stallion, bull x she-ass and cow x donkey. All these cross products are called ‘jumart, jumard, jourmart, jeremi, etc.’ depending on the region of origin. These are all clearly distinct from the well-known existing hybrids between horses and donkeys being the ‘mule’, as a product from a mare and a donkey (‘mule(t)’ in French, although the animal is sometimes called ‘bardot’ as well) and the ‘hinny’, as a result from the stallion and a she-ass (‘bardot’ in French).

THE JUMART IN THE (VETERINARY) LANDSCAPE IN FRANCE (16TH-18TH CENTURY)

Before going into detail on the specific arguments in favor or against the existence of the jumart, it might be interesting to comment on its position within the early history of the ‘veterinary landscape’. One of the possible approaches we used before (Bols and De porte, 2014a, 2014b) to get an idea of the available veterinary knowledge is to have a closer look into the relevant early French (veterinary) literature. As

wonderfully documented by the recent bibliography ‘Great Books on Horsemanship’ (Dejager J, 2014), the horse has been an important and preferred subject in the long tradition of book printing. Unfortunately, it is impossible to elaborate on this subject within the framework of the current paper.

The 16th century was characterized by an enormous scientific progress and great advances in the field of book printing, democratizing learning and allowing faster propagation of new ideas. In that time, about fifty works were published on ‘veterinary medicine’. Scholars of different backgrounds participated in writing these ‘veterinary’ publications that mainly covered the horse. Philologists, physicians, equerries (‘écuyers’), noblemen, notable and politically important men, everyone started to publish books on ‘equine medicine’. As far as the matter of the substance was concerned, the works were all very much alike. However, in 1543, Andreas Vesalius caused a revolution when publishing an extraordinary tome known as ‘De Humani Corporis Fabrica Libri Septem’. The work was not only a landmark study on human anatomy but also an artistic work of high esthetic quality and would inspire many authors, the most famous of which probably Carlo Ruini (1530-1598), one of the most noted anatomists of the horse of the 16th century. Ruini’s ‘Anatomia del Cavallo’ (1590) was the first book to focus exclusively on the structure of a species other than man and its splendid images would often be plagiarized. In 1599, the French physician Jean Héroard, inspired by Vesalius and Ruini, wrote his ‘Hippostologie’. It was the same Héroard who introduced the term ‘vétérinaire’ in France and was referred to as ‘médecin en l’art vétérinaire de la grande écurie du roy’ himself.

Apparently, it was the Swiss medical doctor, naturalist and writer Conrad Gesner (1516-1565) who first mentioned the jumart in his ‘Conradi Gesneri medici Tigurini Historiae Animalium Lib. I de Quadrupedibus viviparis’ (1551). He studied, travelled and worked in the vicinity of Zurich, Montpellier and Basel and reported on a sort of mule produced in France, born of a she-ass and a bull and called jumart by the French. Additionally, he learned from ‘reliable’ sources that a foal was born from a mare served by a bull in the Swiss Alps close to Mount Spelugi. In the same work, he comments on veterinary knowledge of his time, such as the important position of the horse, its diseases and therapies, e.g. bloodletting, and its use in horse riding and related topics. He specifically devoted a chapter on hybrids, where he mentions the mule and jumart as well as a mythical animal that he called the ‘onocentaure’, a mixture between man and donkey. Gesner might have picked up the jumart story himself from the physician Jakob Ruf (1505-1558) who also used to live in Zurich and who mentioned the same individuals in his ‘De conceptu, et Generatione Hominis’ (1587). Other naturalists who published on the jumart in the 16th century are Scalliger, Cardan and Jean-Baptist Porta. Porta claimed to have

seen with his own eyes a mule-like animal with the head of a cow and signs of horn pits on its head. During the 17th century, additional testimonials in favor of the existence of the jumart appeared. One of the first accounts was published in the ‘Hist. nat. max. Nieremberg’ published in Antwerp in 1635: “a horse born from a bull and a mare ... and a fifth kind of mule is the one born from a she-ass and a bull.” While Zacchias happened to be the second eyewitness in his ‘Questiones Medico-Legales’ (1657), the most important source in this era was the French pastor Jean Léger. All later authors would cite him (on this subject) because of his description of the jumart in his ‘Histoire Générale des Eglises Evangéliques du Piémont’, published in Leiden in 1669. He considered the jumart as an exceptional hybrid between the bull and the mare (called ‘baf’) or the bull and she-ass (called ‘bif’). Both shared the malformation of the muzzle where the lower jaw happened to be much longer than the upper, resulting in an extreme form of prognathism causing severe problems for grazing. Head, with horn pits, and tail resembled those of a cow, while the rest of the animal looked like a horse or donkey. These animals were apparently extremely strong in relation to their height, consumed less food and had no problems in covering long distances. Léger used a jumart as a beast of burden, feeling more comfortable with it as compared to a horse. This positive description of the jumart would inspire many more believers that cited Léger’s experiences over and over again. The credulous doctor John Locke happily subscribed the existence of the jumart by considering it ‘as the mixture of a bull and a mare’ in an essay he had started to write in 1670, but which was only finally published in 1838, ‘An essay concerning human understanding’. From this period, one of the scarce drawings of a mating between a bull and a mare was preserved in the book of G. S. Winter de Adlersflügel (Nuremberg, 1672) (Figure 1).



Figure 1. Unnatural mating of a bull with a horse. From G. S. Winter de Adlersflügel, ‘Tractatio Nova de Re Equaria Complectens Partes Tres’ Nuremberg, 1672. The same volume contains plates of mythical horses and monsters (with human heads, six legs, etc.) (Dejager J., 2014).

The publication of the first ‘veterinary’ handbooks ran parallel with the development of the art of equitation, a phenomenon that started in Italy, where court life began to flourish and noblemen started to qualify in horseback riding, nicely illustrated by an engraving in Antoine de Pluvinels ‘L’Instruction du Roy en l’Exercice de Monter à Cheval’ (1629). During the following two centuries, horses became extremely popular among the upper class, not only as a riding-animal but also as an indispensable member of the foxhunt and as a draught-animal of the most prestigious carriages. Wealthy citizens and noblemen started to found studfarms and riding schools, hence creating an unmistakable need for caregivers for their horses. These ‘écuyers’, most of which were highly educated themselves, gave rise to a new literary genre, the so-called ‘traités’ in hippiatrics. In these books, not only accurate anatomical descriptions, long lists of diseases and their treatments and descriptions of the harnesses could be found, but also instructions on how to breed, trade, handle, harness and ride horses. Another group of equine professionals were the so-called ‘maréchaux’ or blacksmiths. They were responsible for shoeing the horses and often performed first-line treatment of the horses as well. Although more practically minded than the equerries, they enjoyed the highest respect with the horse-loving nobility. Needless to say that this would result in discord between the two groups, the equerries on the one hand and the ‘maréchaux’ on the other hand, the effects of which would be felt until the 20th century.

The most influential hippiaters of the 17th and 18th centuries bequeathed some interesting books (cf. Mennessier de la Lance, 1915-1921 and de Musset-Pathay, 1810). In the first place, there was Jacques de Solleysel (1617-1680). With his ‘Le Parfait Maréchal’, he wrote one of the very first French standard works on hippiatrics. The book covers a wide variety of subjects, ranging from long lists of diseases and their treatments, anatomical descriptions, ageing by dentition, trade, maintenance, shoeing, breeding and harnesses, and would be reprinted dozens of times during the following century. The importance of ‘Le Parfait Maréchal’ is illustrated by the popularity of its successor, ‘Le Nouveau Parfait Maréchal’ written by François-Alexandre de Garsault (1692-1778) (Figure 2). In this book, lists of diseases and their treatments, detailed anatomical descriptions, a chapter on horse riding and a section on different breeds and breeding with the jumart in a prominent place can be found (see below). In 1734, father and son Jean and Gaspard de Saunier published their ‘Le Parfaite Connoissance des Chevaux’. This prestigious work contains over sixty illustrations, most of which were plagiarized, primarily from Carlo Ruini’s ‘Anatomia del Cavallo’.

While until halfway the 18th century, no ‘strict’ veterinary manuals were published with the exception of a few important standard books on horses and horsemanship (as described above), the jumart



Figure 2. Portrait of François Alexandre de Garsault (1692-1778), taken from ‘Le Nouveau Parfait Maréchal’. Second edition, 1746, Leclerc, Paris.

gained a lot of renewed attention from people with a heterogeneous but not always scientific background. The hybrid was described in the first encyclopedia, appeared in dictionaries and stirred up the attention of travelers, adventurers, naturalists, philosophers and veterinary and medical doctors. Authors such as Louis Liger (1658-1717) published some general works on agriculture, in which they devoted some pages to farm animals as well. While the jumart is not mentioned in the 11th edition of his ‘La Maison Rustique’ (1790), other authors, such as the French naturalist, physician and member of the Faculty of the University of Nancy, Pierre-Joseph Buchoz (1731-1807), dedicated an entire chapter to the jumart as clearly indicated in the table of contents of his ‘Traité Economique et Physique du Gros et Menu Bétail’ published in 1778 (Figure 3). Fortunately, the number of skeptics and non-believers increased substantially stressing the apparent need to choose sides in this debate.

In 1750, Claude Bourgelat, wrote his ‘Elemens d’Hippiatrique’. This work is generally considered as the first ‘real’ veterinary handbook and resulted in the fact that he earned the respect of the hippiaters. Although Bourgelat certainly wasn’t the most skilled hippiaters of that time, he was one of the few who understood the need for veterinary education. Indeed, most of the knowledge that had been gained up until

then was based upon empiricism and popular belief. Therefore, Bourgelat's first aim was to re-evaluate the 'pratiques de maréchalerie', some of which he considered to be harmful and even dangerous. Needless to say that he got into conflict with the 'maréchaux' or blacksmiths, with Philippe Etienne Lafosse as his most important opponent. Undoubtedly, the well-documented rivalry between Bourgelat and Lafosse resulted in the publication of Lafosse's absolute masterpiece 'Cours d'Hippiatrique' (1772).

FRANÇOIS ALEXANDRE DE GARSULT, 18TH CENTURY OPINION LEADER

François Alexandre Pierre de Garsault was a French writer, designer and 'capitaine des Haras du Roy' (head of studfarms), born around 1692 and deceased in 1778. In his writings, he addressed the most diverse subjects. He was often sent out on a mission to study horse breeding and the practical organization of the French studfarm network. He thereby reported to the French government on this important branch of the French national economy. Breeding and training horses for military purposes was a constant concern during the 18th and the beginning of the 19th century. His most inspiring work in this context was 'Le Nouveau Parfait Maréchal' first published in Paris in 1741. This publication 'in-4' summarizes on 512 pages all available knowledge on horses in its broadest sense with chapters on the anatomy of the horse, horse breeding, dressage and horseback riding, diseases of horses, surgical interventions, the blacksmith and horse shoeing and finally an extensive list of therapies and available 'pharmaceuticals'. The importance of this work lies in the fact that it has been re-edited at least ten times with the final edition being published in 1843. Although the book is considered as a compilation of earlier knowledge and fragmented publications, it is valued because of its logical structure based on the methodological and meticulous attitude of de Garsault. He illustrated the book with 49 plates most of which he designed himself. Based on the numerous editions, it can be assumed that the book must have had a considerable impact on the contemporary equine literature, and most probably inspired many later authors. Some smaller additions were made along the years but most parts of the original texts were reprinted and distributed in their original form. More specifically, de Garsault explains us how to breed a jumart on pages 82-83 (Figure 4). He starts by explaining that the 'journarts' usually originate from a bull and a mare or a she-ass or a donkey and a cow. The animals are used as beast of burden and known for their extreme force, low food consumption and less vulnerable feet and hooves. The jourmart's head looks like a bull's head with a large front and nose, like a bull without the horns. Journarts are very common in the "Dauphiné". For successful mating, a cow has to be presented to a bull, and immediately before the

coitus, the cow has to be replaced by a mare'. Finally, de Garsault described different characteristics for the different kinds of jumarts, with for example the one originating from the donkey and the cow lacking front teeth in the upper jaw. Given the fact that descriptions like the one above have been widely spread for more than a century in a (veterinary) reference book, it is not surprising that the existence of the jumart was equally widely accepted in circles of animal or horse professionals. However, it would soon become clear that the rapid progress in science and general knowledge would finally outdate the 'Nouveau Parfait Maréchal'.

CLAUDE BOURGELAT, THE ULTIMATE BELIEVER?

As the 18th century continues, the number of non-believers gradually increased. The 'Journal Encyclopédique' (1762) denied the existence of the jumart because of a lack of direct proof. 'L'Encyclopédie de Félice' (1773) considered the hybrid as being a myth based on the dissections reported by cardinal de Lances who described the jumarts as common mules, without horns, being solid-hoofed ungulates, lacking classical ruminant stomachs and having a donkey's

T A B L E	
<i>D E S C H A P I T R E S.</i>	
T O M E P R E M I E R.	
C HAP. I ^{er} . <i>Du Cheval.</i>	pag. 1
C HAP. II. <i>De l'Ane.</i>	506
C HAP. III. <i>Du Mulet.</i>	539
T O M E S E C O N D.	
C HAP. IV. <i>Du Taureau & de la Vache.</i>	1
C HAP. V. <i>Du Jumart.</i>	148
C HAP. VI. <i>Du Bouc & de la Chevre.</i>	153
C HAP. VII. <i>Du Belier & de la Brebis.</i>	205
C HAP. VIII & dernier. <i>Du Cochon.</i>	399

Figure 3. Table of contents of Pierre-Joseph Buchoz's 'Traité Economique et Physique du Gros et Menu Bétail.' published in Paris in 1778. As indicated, a small separate chapter is devoted to the jumart, basically citing most of the 'common' stories on the hybrid.

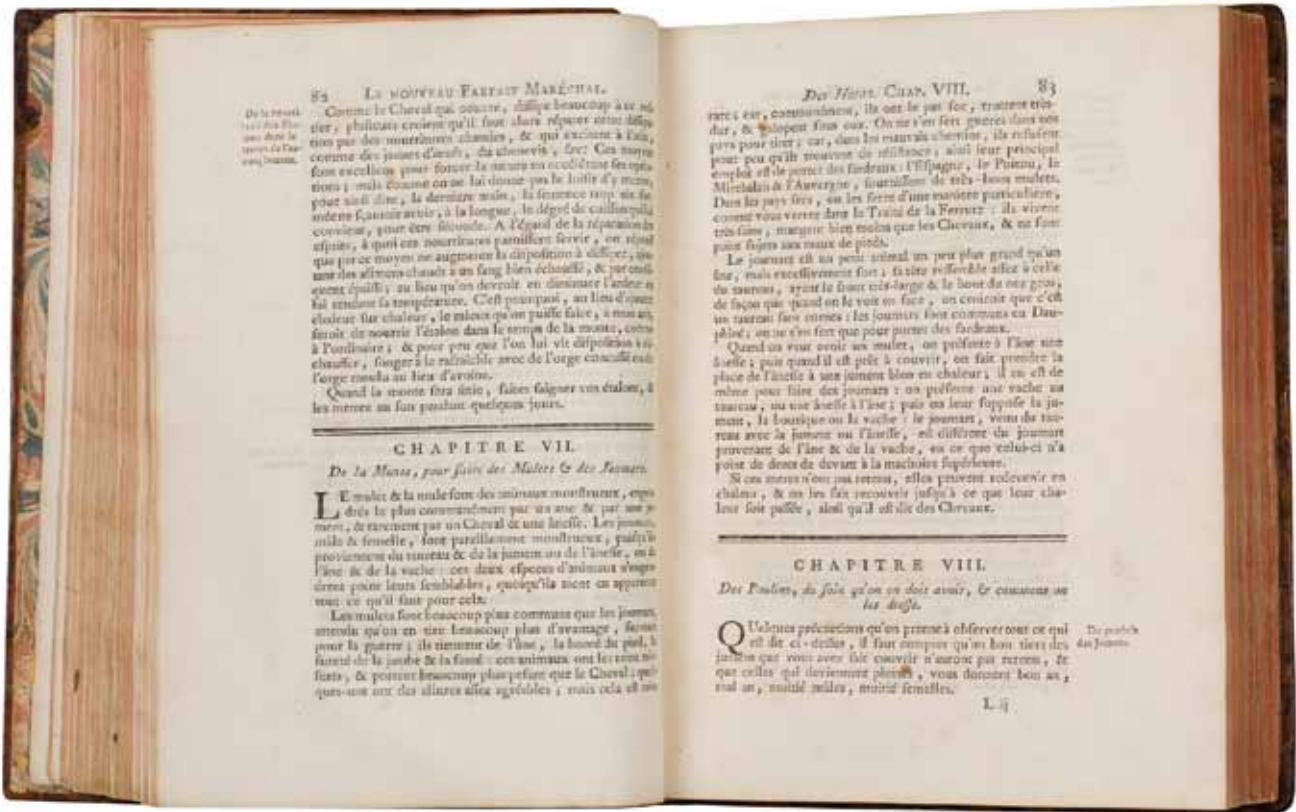


Figure 4. Pages 82-83 of the second edition of François Alexandre de Garsault's 'Le Nouveau Parfait Maréchal' (1746), on which he explains how to breed a jumart.

tail. This opinion was supported in Germany in the 'Commentarii de Rebus in Historia Naturalis et Medicina Gestis' (Leipzig, 1779) and by J.A.A. Meyer in the 'Magazin für Thiergeschichte'. A German visitor to the 'Ecole Vétérinaire' in Alfort near Paris expressed his feelings of disappointment when investigating the jumart. The animal being the purpose of his trip had already died upon his arrival and only the head and larynx were remaining for inspection. While only the mouth looked slightly bigger than the mouth of a horse, the soft tissues and teeth resembled those of an equid. Therefore, he concluded that if this was a jumart, it was nothing more than a horse to which certain bovine traits had been added through a vivid imagination. Also Blumenbach considered the jumart as a normal mule and described the animal as being a fantasy in the 11th edition of his 'Handbuch der Naturgeschichte', published in Goettingen in 1825.

However, once more, the importance of an opinion leader's conviction was illustrated. While several scientists on the European continent kept on proclaiming their believe in the existence of this remarkable hybrid (Voltaire, Réaumur, l'Abbé Prévost, François de Nîmes, Bourget, Bose, Mérolle, Shaw, etc.), it was the correspondence between two heavyweights that fired the believers: Charles Bonnet (1720-1792), a Swiss scientist and one of the most important naturalists of the 18th century, and Claude Bourgelat (1712-

1779), the founder of the first 'Ecole Vétérinaire' in the world (Lyon, 1762). Bonnet was updating one of his publications ('Oeuvres d'Histoire Naturelle et de Philosophie') when he read a paper on the jumart being dissected by Bourgelat in Lyon. To be absolute sure to have first-hand information, he contacted the 'Inspector General of the Ecoles Vétérinaires de France' in person. As stated on their website, a skull of a Jumart is indeed available in the collection of the Musée Fragonard d'Alfort, which is associated with the 'Ecole Vétérinaire' d'Alfort, founded a few years after the 'Ecole Vétérinaire' de Lyon (Figure 5). The skull goes back to an animal that was studied by Bourgelat himself, who described the animal in a correspondence with Bonnet as being very strong, with a forehead, muzzle and lower jaw from a cow but the teeth and internal organs being that of a horse. He even stated that he produced a jumart (that lived only for four months) by coupling a stallion to a cow and that the region of the "Dauphiné" was well known for the production of these animals. Later on, Bonnet (1779) also published his description of the animal based on the findings of Bourgelat. Given the enormous importance of Bourgelat in the early veterinary scene and being the most important professor of the faculty of the two first vet schools worldwide, it is not surprising that the existence of the jumart was broadly supported by the first batches of graduating veterinary

students. This is nicely illustrated by the fact that even the later director of the ‘Ecole Nationale Vétérinaire’ de Lyon, Louis-Furcy Grogner (1774-1837), still believed that jumarts existed, though considering them rare. As a result, the controversy was again stirred up and many more believers cited reports of others without adding real evidence to the subject. Even the famous Italian anatomist and scientist l’Abbé Spallanzani (1729-1799) admitted without hesitation to be a believer, again strengthening Bourgelat’s conviction. Valmont de Bomaire, the first naturalist that published a ‘Dictionnaire d’Histoire Naturelle’ declared that two jumarts, male and female, could be visited in Alfort back in 1767.

Towards the end of the 18th and the beginning of the 19th centuries, again general opinions shifted toward doubt on the existence of the jumart, not in the least because important naturalists did not support the veterinarian’s point of view. The famous Comte de Buffon openly doubted, stating that although copulations between animals of the bovine and equine species are physiologically possible, based on the anatomy of the genital organs, and are often observed in free ranging animals, have never resulted in any offspring. The father of physiology Albrecht von Haller (1708-1777) was of the same opinion as reported in his ‘Elementa Physiologiae’. Again, some others were difficult to convince and kept on believing in the jumart as a crossbred species: Tupputi, Colonel Rottiers (1812), Cardini (1848) who based his opinion on Bourgelat’s, Lucas (1850) who was influenced by Valmont de Bomare, Malte-Brun, and again Grogner, even in his second edition of the ‘Cours de Zoologie Vétérinaire’ published in 1887.

ANDRÉ SUCHETET, THE FINAL REPORT

Finally, the ‘ultimate’ report was published by André Suchetet when he wrote ‘La Fable des Jumarts’ in the ‘Extrait des Mémoires de la Société Zoologique de France pour l’Année 1889’ (Figure 6). Indeed, most of the facts and testimonials described above are summarized in this ‘Extrait’. Suchetet (1849-1910) was a French politician, landowner and mayor of Bréauté (Seine-Maritime) and held several important positions at the local political level. Furthermore, he was a member of numerous scientific societies with a remarkable interest in hybrids and hybridization. He published several books on this subject and tried to finally clarify the myth of the jumart by an in-depth chronological study. In 1872, one of his contacts at the Société de Biologie de Paris, M. Hamy, indicated that ‘... there are still some scientific correspondents who believe there are Jumarts in the Drôme area. Contacts with Mr. Lepic and de Lubac even result in an agreement to send one of the animals to Paris ...’ The latter showed to be prepared to organize an inquiry that finally started in 1886. What follows is a regularly interrupted chain of interviews, eyewitness

reports and testimonies without any physical evidence of the existence of the hybrid. De Lubac noted down an observation of a veterinary surgeon working close to Nyons. He stated that jumarts appeared regularly as a result of the mating among free ranging horses and cows. Other witnesses however, specifically stressed the fact that such interactions never appeared spontaneously and that jumarts needed to be produced deliberately. However, none of the correspondents had ever seen a jumart ‘live’ and stories were always noted down based on second-hand information. In addition, the existence of the jumart was also questioned during the inquiry because many letters were received from people stating that the animals they had been investigating, did not differ from the classical ‘mulet’ or ‘bardot’.

Finally, Suchetet summarized all the information he described in his dissertation in five ‘observations’ in a logical order. Firstly, most correspondents originated from an era during which science was very eager to invent all kinds of fantastic hybrids and speculated on their fertility. In addition, eyewitnesses might have seen copulations between bulls and mares or she-asses, strengthening their conviction on the true existence of the jumart. Secondly, most of the correspondents reported facts that had previously been reported by others, without checking the origin of their sources. Thirdly, many scientists substantiated their own statements by the declaration of others. Opinion leaders strengthened mutual convictions, through which layman finally tended to accept assumptions as bare facts. The opinion of famous scientists proved to be enormously powerful. Fourthly, everybody used citations of opinion leaders without verification. If a leading scientist made a mistake, it was propagated easily through history. Finally, Suchetet stressed the heterogeneity of the information with opposite ideas emerging from small geographical regions. Most of



Figure 5. Picture of a ‘jumard’ skull, part of the collection of the Musée Fragonard d’Alfort, associated to the ‘Ecole Vétérinaire’ d’Alfort’, Paris, France. The skull is assumed to date back to the foundation of the school and was added to the collection started by Bourgelat himself.

the anatomical details collected on so-called jumarts referred to the horse or donkey, which is strange for a hybrid species. Bourgelat seemed to be the only one that ever possessed a jumart himself, a fact difficult to question in the era of this ‘master’. Suchetet wisely concluded that jumarts had never existed. He added to be convinced that hybrids could only be generated by the combination of very closely related species.

CONCLUSION

The discussion on whether or not the jumart has ever existed, might seem irrelevant in an era where assisted reproduction techniques (ART) can nearly literally ‘create’ everything. In vitro embryo production (IVP), intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI), cloning and the quest for methods to assemble artificial chromosomes. We are probably closer to the creation of a jumart than we have ever been.

From a scientific point of view, barriers to hybridization can generally be classified into pre- and postzygotic. Prezygotic obstacles refer to problems that prevent the formation of a zygote and include among others temporal separation, i.e. species mate at different times of year, different mating rituals,

‘hostile’ intrauterine environment and lack of biochemical recognition between the oocyte and sperm cell. Postzygotic barriers on the other hand refer to problems that occur after the formation of the zygote, and are often the result of genetic incompatibilities that affect the development of the embryo. It is a common misunderstanding that chromosome number is a critical factor in the fact whether or not two species can crossbreed. Indeed, when animals are, from a genetic perspective, quite similar, they are likely to be able to produce viable offspring. The classic example of this is the mule, which is the product of a female horse (64 chromosomes) and a male donkey (62 chromosomes). However, if those genes are organized on different numbers of chromosomes, any resulting offspring will most likely be sterile. Taken all this into account, the chance that a jumart – as a combination of the bovine and equine species - has ever existed, is highly unlikely.

Finally, this interesting discussion on ‘true or false’ has been enormously influenced by the conviction of opinion leaders who did not always check their sources. Even opinion leaders make mistakes.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge Mr. P. Delgado and family, écuyer and horse whisperer ‘avant la lettre’ (Monteux, France) for initially introducing them to François Alexandre de Garsault and his work.

FURTHER READING

- Bols P.E.J., De porte H.F.M. (2014a). De handbibliotheek van de eerste studenten diergeneeskunde (Frankrijk, 18^{de} eeuw) - Deel 1: van Vegetius tot de Garsault. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 83, 42-48. (abstract in English).
- Bols P.E.J., De porte H.F.M. (2014b). De handbibliotheek van de eerste studenten diergeneeskunde (Frankrijk, 18^{de} eeuw) - Deel 2: van Bourgelat en Lafosse tot de kennis-explosie aan het begin van de 19^{de} eeuw. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 83, 81-88 (abstract in English).
- de Garsault F.A.P. (1746). *Le Nouveau Parfait Maréchal*. Second edition, Leclerc, Paris.
- De Jager J. (2014). *Great Books on Horsemanship*. Hes and De Graaf Publishers, Leiden, the Netherlands.
- de Musset-Pathay V.D. (1810). *Bibliographie Agronomique ou Dictionnaire Raisoné des Ouvrages sur l'Economie rurale et Domestique et sur l'Art Vétérinaire*. Paris, France.
- Mennessier de la Lance (1915-1921). *Essai de Bibliographie Hippique*. Lucien Dorbon, Parijs. Réimpression 1971.
- Suchetet A. (1889). *La Fable des Jumarts. Extrait des Mémoires de la Société Zoologique de France*. t. II, 1889; 32 pp.

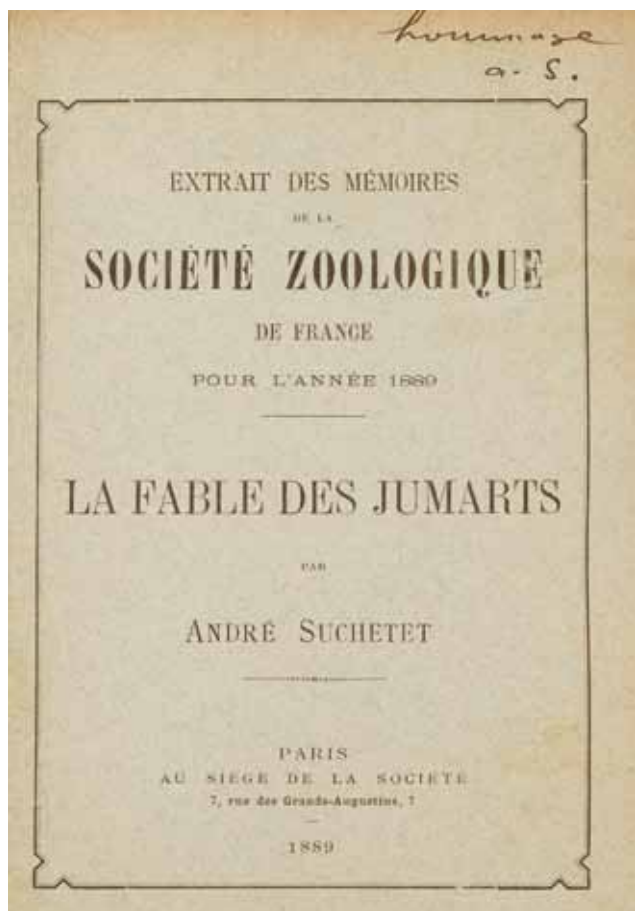


Figure 6. Title page of the report published by André Suchetet ‘La Fable des Jumarts’ as ‘extrait des mémoires de la Société Zoologique de France pour l’année 1889’, Paris, France.

OPROEP

In het kader van een klinische studie naar de nieuwe antikankerstrategie OncoCiDia zijn we vanaf **1 augustus 2016** op zoek naar honden met kwaadaardige tumoren.

Vereisten

- De tumor moet **uitwendig bereikbaar** zijn (dus niet intrathoracaal of -abdominaal)
- De tumor moet een **solide tumor** zijn (dus geen lymfoma of leukemie)
- De hond mag **geen andere pathologie** vertonen (zoals lever-, nier- of hartfalen)

Nieuwe behandelingsmethoden voor kanker

OncoCiDia is een nieuwe behandelingsstrategie die bestaat uit twee stappen. Een eerste inspuiting van CA4P (Combretastatine A4-Fosfaat) vernietigt de bloedvoorziening van de kanker, waardoor het grootste deel van de kanker afsterft. Om overgebleven kankercellen te vernietigen wordt na 24 uur een tweede inspuiting gegeven met ¹³¹I-Hyp (radioactief jodium gebonden aan hypericine). ¹³¹I-Hyp bindt aan de stervende kankercellen en zal daar ter plaatse de overgebleven kankercellen door radiatie vernietigen. Het voordeel van deze behandeling is dat ook uitzaaiingen mee behandeld worden.

Patiënten met een kanker die, vanwege zijn grootte of locatie, niet chirurgisch verwijderd kan worden, kunnen eveneens geholpen worden. Wanneer de kanker gekrompen is, verhoogt de kans dat hij alsnog weggesneden kan worden. Volledige verdwijning van de kanker is mogelijk, maar kan niet in elk geval gegarandeerd worden.

Verloop van de behandeling

De hond wordt at random verdeeld in groep A of B. Aan groep A wordt enkel CA4P intraveneus toegediend; aan groep B worden de twee componenten van het protocol intraveneus toegediend met een tussentijd van 24 uur. De werkzaamheid van de componenten en de evolutie van de tumor worden op regelmatige tijdstippen geëvalueerd aan de hand van klinische onderzoeken, bloedafnamen en medische beeldvormingstechnieken (RX, echo(cardio)grafie, scintigrafie)

De ganse behandeling en nazorg, die **gratis** aangeboden worden, gebeuren in de kliniek en vanwege de radioactiviteit is het wettelijk verplicht om de hond gehospitaliseerd te laten tot wanneer de straling voldoende is afgenomen (= meestal na een aantal dagen). Na de start van de behandeling vinden maandelijks controles plaats gedurende een periode van 6 maanden.

Contactpersoon

Dierenarts Eline Abma – eline.abma@ugent.be
tel: 09-331 3090

Promotoren

Prof. Hilde de Rooster – hilde.derooster@ugent.be
Prof. Sylvie Daminet – sylvie.daminet@ugent.be

Brussel maakt werk van alternatieven voor proeven op dieren



Onderzoek VUB ondersteund door Staatssecretaris voor Dierenwelzijn Bianca Debaets

Brussels Staatssecretaris voor Dierenwelzijn Bianca Debaets steunt voor het tweede jaar op rij het onderzoek van de Vrije Universiteit Brussel (VUB) naar het vermijden van toxiciteitsproeven op levende dieren. Debaets levert zo een bijdrage aan het principe van de 3 V's (Vervanging, Vermindering, Verfijning) dat ernaar streeft om, waar mogelijk, onderzoek dat gebruik maakt van proefdieren te vervangen door alternatieve methodes.

De VUB verricht internationaal erkend onderzoek naar alternatieve onderzoeksmethoden die geen beroep doen op proeven op levende dieren. Het onderzoek spitst zich toe op door geneesmiddelen veroorzaakte levertoxiciteit. Concreet ontwikkelde het team van professor Vera Rogiers een methode waarbij stamcellen van menselijke huid omgezet kunnen worden tot menselijke levercellen. Op die manier kunnen proeven op levende proefdieren worden vermeden. Met de toegekende subsidie van 30.000 euro kan de VUB een extra onderzoeker voor één jaar in dienst nemen om het lopende onderzoeksprogramma verder te verfijnen.

*“Dierenleed moet zoveel mogelijk worden vermeden», stelt **Staatssecretaris Bianca Debaets**. « Tot op vandaag worden nog veel preklinische testen op geneesmiddelen uitgevoerd met behulp van levende proefdieren. Het baanbrekend onderzoek aan de VUB toont aan dat het ook anders kan. Ik hoop dan ook dat de VUB dankzij onze steun dit onderzoek verder kan uitbouwen zodat de testmethode nationaal en internationaal navolging krijgt. In ben blij met deze grote stap vooruit in het dierenwelzijn.»*

Naast de ethische bezwaren en de hoge kosten die verbonden zijn aan studies met levende dieren, is het belangrijk te wijzen op de lage bruikbaarheid van de dierenproeven. Minder dan 60% van de testresultaten bekomen bij dieren zijn van toepassing op de mens.

*“De steun van Bianca Debaets is een belangrijke aanmoediging voor ons stamcelonderzoek dat als algemeen doel heeft om ‘voor de mens relevante alternatieve methoden’ te ontwikkelen en in de praktijk te brengen. Het is ook onze taak om jonge mensen hiervoor op te leiden zodat ze klaar zijn voor een toekomst met minder proefdieren, is onze taak”, aldus leerstoelhouster **Vera Rogiers**. “En als er toch nog dieren dienen gebruikt te worden, dan alleen het strikte minimum en onder humane omstandigheden.”*

De VUB is pionier onder de Belgische instellingen die onderzoek naar *in vitro* modellen verrichten. Op termijn is het de bedoeling dat de 3D celculturen gecommmercialiseerd kunnen worden zodat farmaceutische bedrijven het aantal dierenproeven stapsgewijs kunnen verminderen.

In 2014 ontving de VUB als allereerste niet-Duitse groep de Duitse Bondsprijs voor Dierenwelzijn voor dit onderzoek. De toegekende subsidie zal ertoe bijdragen dat het werk dat de VUB uitvoert ons gewest nationaal en internationaal op de kaart zet als voorbeeldregio op het vlak van wetenschappelijk onderzoek naar alternatieven voor proefdieren.

Woordvoerder Bianca Debaets : Stijn Van Eynde 0490 66 60 28 en Pierre Migisha 0475 72 04 12

Langeafstandvervoer van dieren : staatssecretaris Debaets en ministers Weyts en Di Antonio vragen een evaluatie van de Europese reglementering

25 juli 2016 - De Staatssecretaris en Ministers van Dierenwelzijn, Brussels Staatssecretaris Bianca Debaets, Vlaams Minister Ben Weyts en Waals Minister Carlo Di Antonio, hebben de voorzitter van de Europese Commissie in een gezamenlijke brief **officieel gevraagd om de reglementering over het vervoer van dieren over lange afstanden te laten evalueren.**

Volgens de Europese verordening moet het langeafstandvervoer van dieren zoveel mogelijk beperkt worden. Verder moet het vervoer van dieren zo georganiseerd worden dat ze zich niet kunnen verwonden en niet onnodig lijden.

Maar er is veel verschil in de toepassing van deze verordening in de verschillende landen van de Europese Unie. Daarom dringen de Staatssecretaris en de Ministers erop aan dat de Europese Unie de huidige reglementering evalueert en waar nodig aanpast.

Bij het vervoer van dieren gelden onder andere volgende algemene voorwaarden:

- Het vervoermiddel is aangepast en wordt correct onderhouden en gebruikt zodat de veiligheid van de dieren gegarandeerd is en men vermijdt de dieren te verwonden of aan ander lijden bloot te stellen;
- De dieren krijgen voldoende water, voeder en rust, volgens de behoeften van de betrokken dieren.

Bij vertrek moeten de landbouwhuisdieren (koeien, paarden, varkens...) gecontroleerd worden en de geplande route (met de timing voor rustmomenten) goedgekeurd door de FAVV.

Perscontacten

Kabinet van Staatssecretaris Bianca DEBAETS : Stijn Van Eynde 0490 66 60 28 en Pierre Migisha 0475 72 04 12

Kabinet van Minister Ben WEYTS : Jeroen Tiebout – 0477 99 80 88

Kabinet van Minister Carlo DI ANTONIO : Marie MINET – 0479 88 84 75

Slakken kunnen een ernstige bedreiging betekenen voor honden

De laatste jaren duikt longwormziekte steeds meer op bij honden in België. De aandoening wordt veroorzaakt door een kleine worm, *Angiostrongylus vasorum*, die overgedragen wordt door opname van naakt- en huisjesslakken en waarschijnlijk ook hun slijm.

Op vraag van de Business Unit Animal Health van Bayer deden Prof. Losson en dr. Lempereur van de faculteit Diergeneeskunde aan de Universiteit van Luik, het eerste Belgische onderzoek naar longwormziekte. De onderzoekers testten 979 honden in Wallonië, waarvan er 222 de symptomen van longwormziekte vertoonden. Uiteindelijk bleek 8,6% van de honden met symptomen positief op de parasitaire infectie.

Daarmee bevestigt de studie de uitbreiding van de longwormziekte naar nieuwe regio's. De infectie komt momenteel voor in de meeste Europese landen en sinds 2013 ook in België. Enerzijds stijgt het aantal geïnfecteerde honden in landen waar de parasiet leeft, anderzijds komen er nieuwe regio's bij waar de longworm zich vestigt.

Die heropleving is waarschijnlijk te wijten aan de opwarming van het klimaat en een sterkere resistentie van naakt- en huisjesslakken tegen de klimatologische omstandigheden. Daarnaast verplaatsen honden zich steeds vaker van het ene land naar het andere – ze gaan met hun baasjes mee op reis.

Honden worden meestal geïnfecteerd wanneer ze een slak eten die besmet is met de larven van de parasiet. Vooral jonge honden worden het vaakst geïnfecteerd, net omdat ze zo speels en nieuwsgierig zijn. De symptomen variëren sterk en kunnen makkelijk verward worden met die van andere aandoeningen. Bovendien vertonen sommige honden nauwelijks symptomen, terwijl andere ernstige letsels krijgen die snel tot de dood kunnen leiden. De meeste honden vertonen problemen van de luchtwegen, zoals hoesten en inspanningsintolerantie. Maar ook bloedingen en neurologische symptomen kunnen voorkomen.



Innovatief product Imrestor™ helpt immuunsuppressie voorkomen en reduceert het aantal gevallen van klinische mastitis met 26%

Imrestor™ is het eerste middel dat de eigen weerstand van melkkoeien en vaarzen versterkt en klinische mastitis helpt voorkomen tijdens de eerste 30 dagen van de lactatie. In een Europese studie met 2.465 melkkoeien verlaagde Imrestor™ de incidentie van klinische mastitis met 26% ten opzichte van de controlegroep. Imrestor™ is gebaseerd op een natuurlijk eiwit, een signaalstof van het afweersysteem, en kent geen wachttijd. Vanaf half juni 2016 is Imrestor™ in België verkrijgbaar.

Beter opstarten met Imrestor™

Imrestor™ versterkt het aangeboren immuunsysteem van koeien in de kwetsbare periode rond afkalven. Daardoor starten de dieren soepeler op en zijn ze minder vatbaar voor infecties als mastitis. Dierenarts Angelique Rijpert van Elanco Animal Health: “Vooraf verse koeien zijn erg vatbaar voor infectieziekten. Oorzaak hiervan is de immuunsuppressie die ontstaat in de periode rond afkalven. Dit komt door hormonale veranderingen gerelateerd aan het afkalven, stress, de negatieve energiebalans bij de opstart van de lactatie en een grotere behoefte aan vitamines en mineralen. Mastitis, de meest voorkomende melkveeziekte, treft 1 op de 6 melkkoeien en komt het vaakst voor bij de opstart.”

Minder ziekte en antibioticagebruik en verbeterd dierwelzijn.

Imrestor™ is vanaf half juni 2016 beschikbaar in geprepareerde injectiespuiten voor eenmalig gebruik. Er zijn twee injecties nodig; één zeven dagen voor de verwachte afkalfdatum en één 24 uur na het afkalven. Imrestor™ versterkt de eigen afweer van de koe, maar heeft zelf geen antibacteriële werking. Rijpert: “Koppelpreventie met behulp van Imrestor™ kan bijdragen aan vermindering van het antibioticagebruik, door het verminderen van transitieziekten, zoals mastitis. Imrestor™ kan bij alle koeien die afkalven preventief worden ingezet om de weerstand te versterken.”

Eickemeyer - Subjectieve versus objectieve kreupelheid evaluatie

Kreupelheid is de meest voorkomende klinische aandoening in de paarden praktijk. Het kan uitdagend en tijdrovend zijn een goed grondig kreupelheid onderzoek uit te voeren. De huidige evaluatie wordt gebaseerd op een reeks van bewegings parameters (beweging hoofd, beweging heup, pas lengte, teen slepen etc.). Deze parameters zijn beïnvloedbaar door de bespiering en de anatomie van het paard en resulteren vaak in zowel vals positieven en vals negatieven.

Equinosis heeft de ‘Equinosis Q™ met Lameness Locator® software’ uitgevonden en ontwikkeld op basis van tientallen jaren van onderzoek. Onder leiding van Kevin Keegan, professor aan de Universiteit van Missouri. Het systeem bestaat uit een tablet PC en 3 sensoren. Een versnellingsmetersensor wordt geplaatst op het hoofd, op het bekken en een gyroscoopsensor rechts op het voorbeen. De versnellingsmeters meten de verticale beweging van hoofd en bekken, welke hebben aangetoond de meest gevoelige parameters te zijn voor kreupelheidetectie bij paarden. Dit elimineert het risico van valse negatieven, aangezien alle kreupel paarden asymmetrische verticale beweging van het hoofd en / of bekken hebben. De sensoren meten 20 keer sneller dan het menselijk oog kan registreren. De gegevens worden draadloos gestreamd op de tablet-pc. Na het verzamelen van de gegevens kan de dierenarts direct, in een numeriek en grafisch formaat, de aanwezig- of afwezigheid van kreupelheid, het getroffen ledemaat (of ledematen), ernst van de kreupelheid en het tijdstip van kreupelheid (pushoff vs impact) aflezen.

Equinosis heeft met Eickemeyer de software gelanceerd. Momenteel zijn er al meer dan 200 praktijken en 50 universiteiten welke deze wereldwijd gebruiken. Het systeem interfereert niet met het huidige routine kreupelheid onderzoek. Opeenvolgende evaluaties zullen hiermee ook waardevolle objectieve informatie geven over de reactie op een therapie of verbetering tijdens rehabilitatie. www.eickemeyer.nl/lameness-locator.html

HET ONTWORMEN VAN EZELS EN PAARDENVEULENS

VRAAG

“Wat zijn de principes van wormbestrijding bij ezels?”

ANTWOORD

Ezels zijn gevoelig voor dezelfde wormsoorten als paarden en net als bij paarden zijn er grote individuele verschillen in gevoeligheid voor worminfecties tussen de dieren (Matthews en Burden, 2013).

De principes voor wormbestrijding bij ezels zijn dezelfde als bij paarden. Om problemen met strongylideninfecties te vermijden, moet worden voorkomen dat de ezels veel wormeieren uitscheiden (door de dieren preventief te ontwormen) en moet de mest regelmatig van de wei verwijderd worden om te verhinderen dat uitgescheiden wormeieren zich ontwikkelen tot infectieuze larven en zich verspreiden. Tweemaal per week de mest verwijderen resulteert in een significante daling van weidebesmetting (Corbett et al., 2014). Door de weidebesmetting, en dus ook de opname van infectieuze larven, laag te houden, voorkomt men wormproblemen veroorzaakt door volwassen strongyliden en/of larvaire stadia (wintercyathostominose). Uit studies met eieren van de spoelworm *Parascaris equorum* in mest is gebleken dat de verwijderde mest gedurende minstens één tot drie weken aan een voldoende hoge temperatuur gecomposteerd en regelmatig gekeerd moet worden om te verzekeren dat alle wormeieren gedood worden (Gould et al., 2013; Matthews en Burden, 2013).

Op hoogrisicoweiden (standweide met intensieve beweiding en met jonge dieren) wordt aanbevolen om de ezels preventief te ontwormen. De ontwormingschema's zijn gericht tegen de Cyathostominae, omdat deze het meest voorkomen en de kortste prepatente periode hebben. Bovendien zijn alle anthelminthica die werkzaam zijn tegenover de Cyathostominae, ook effectief tegenover de grote strongyliden, onder andere *Strongylus vulgaris*. Dezelfde anthelminthica als bij paarden kunnen ook gebruikt worden bij ezels aan dezelfde dosering (Matthews en Burden, 2013). Bij weidegang worden de ezels met regelmatige tussentijden ontwormd tot het einde van het weideseizoen. Het interval tussen de opeenvolgende behandelingen is afhankelijk van de “egg reappearance period” (ERP) van het gebruikte anthelminthicum. Dit is de periode tussen de behandeling (met het negatief worden van de ei-uitscheiding) en het terug verschijnen van strongylideneieren in de feces. Over het algemeen is de ERP voor pyrantel vier weken, voor ivermectine zeven tot acht weken en voor moxidectine twaalf tot zestien weken. In Zuid-Afrika werd bij ezels een kortere ERP waargenomen voor moxidectine (Matthee et al., 2002). Op bedrijven waar jaren intensief ontwormd werd met macrocyclische lactonen (ivermectine, moxidectine) werd recent ook bij paarden

in België een verkorting van de ERP voor deze anthelminthica vastgesteld (Geurden et al., 2014), wat kan wijzen op beginnende resistentie. Om resistentie-ontwikkeling tegen te gaan kan in principe afgewisseld worden tussen verschillende klassen van anthelminthica gedurende opeenvolgende jaren. De keuze is echter beperkt. Door de veelvoorkomende resistentie van de kleine strongyliden tegenover benzimidazolonen (Matthews, 2014) kan namelijk enkel afgewisseld worden tussen de macrocyclische lactonen en pyrantel. Afwisselend gebruik van verschillende anthelminthica binnen dezelfde klasse is zinloos, omdat deze anthelminthica hetzelfde werkingsmechanisme delen, waardoor nevenresistentie optreedt. Bij het vermoeden van resistentie kan een “faecal egg count reduction test” uitgevoerd worden, waarbij de wormei-uitscheiding vóór de behandeling en tien tot veertien dagen na de behandeling wordt vergeleken. Een reductie van de gemiddelde ei-uitscheiding van minder dan 90% (benzimidazolonen, pyrantel) of 95% (macrocyclische lactonen) is een indicatie voor mogelijke resistentie (Kaplan en Nielsen, 2010).

De beste manier om resistentie-ontwikkeling te vermijden (of te vertragen) is minder frequent ontwormen.

Op weiden met een lager risico (extensieve beweiding en geen jonge dieren) kan een kleiner aantal behandelingen volstaan. Mestonderzoek op het einde van de ERP kan aangeven of een volgende behandeling zinvol is of niet. Door het aantal ontwormingen te beperken aan de hand van regelmatig mestonderzoek wordt de resistentie-ontwikkeling van de wormpopulatie vertraagd. Bij paarden kunnen hiervoor zowel individuele mestmonsters als groepsmonsters gebruikt worden, maar bij ezels werd het gebruik van mengmonsters nog niet onderzocht.

Voor kwantitatief mestonderzoek naar strongylideneieren kan de Mc Mastermethode of de miniflotacmethode gebruikt worden. Het aantal eieren per gram feces (EPG) geeft een indicatie van de bijdrage van een ezel tot de weidebesmetting. Er wordt aangeraden van dieren die meer dan 200-500 EPG uitscheiden, te behandelen (Matthews en Burden, 2013).

Wanneer nieuwe ezels geïntroduceerd worden, moeten deze behandeld worden vóór ze de wei in gaan of moet fecesonderzoek uitgevoerd worden om te bevestigen dat ze geen wormeieren uitscheiden.

REFERENTIES

- Corbett C.J., Love S., Moore A., Burden F.A., Matthews J.B., Denwood M.J., (2014). The effectiveness of faecal removal methods of pasture management to control the cyathostomin burden of donkeys. *Parasites & Vectors* 7, 48.
- Geurden T., van Doorn D., Claerebout E., Kooyman F., De

- Keersmaecker S., Vercruyse J., Besognet B., Vanimisetti B., Traversa D., (2014). Decreased egg re-appearance period after treatment with ivermectin and moxidectin in horses in Belgium, Italy and the Netherlands. *Veterinary Parasitology* 204 (3-4), 291-296.
- Gould J.C., Rossano M.G., Lawrence L.M., Burk S.V., Ennis R.B., Lyons E.T., (2013). The effects of windrow composting on the viability of *Parascaris equorum* eggs. *Veterinary Parasitology* 191, 73-80.
- Kaplan R.M., Nielsen M.K., (2010). An evidence-based approach to equine parasite control: it ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education* 22, 306-316.

- Matthee S., Krecek R.C., Milne S.A., Boshoff M., Guthrie A.J., (2002). Impact of management interventions on helminth levels, and body and blood measurements in working donkeys in South Africa. *Veterinary Parasitology* 107, 103-113.
- Matthews J.B., (2014). Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 4, 310-315.
- Matthews J.B. en Burden F.A., (2013). Common helminth infections of donkeys and their control in temperate regions. *Equine Veterinary Education* 25, 461-467.

VRAAG

“Wat is het beste schema om veulens te ontwormen en wanneer worden het beste welke producten gebruikt? Vanaf welke leeftijd is het nuttig om een mestonderzoek uit te voeren bij veulens en jonge paarden om te bepalen of ontworming nodig is of niet?”

ANTWOORD

Veulens hoeven niet standaard ontwormd te worden voor ze op de weide gaan. Enkel op bedrijven waar er problemen aangetoond werden met veulenworm (*Strongyloides westeri*) of spoelwormen (*Parascaris* spp.) is het aangeraden van de veulens preventief tegen deze parasieten te ontwormen.

Op bedrijven met *Strongyloides*-problemen kunnen de veulens op de leeftijd van twee weken behandeld worden met ivermectine p.o. De behandeling kan eventueel om de twee weken herhaald worden tot de dieren op de weide gaan.

Op bedrijven met *Parascaris*-problemen kunnen veulens op de leeftijd van twee maanden behandeld

worden. De behandeling kan eventueel om de twee maanden herhaald worden tot de dieren een jaar oud zijn. Hiervoor worden het best benzimidazolonen gebruikt, omdat resistentie van *Parascaris* tegen de macrocyclische lactonen (ivermectine, moxidectine) regelmatig voorkomt.

Mestonderzoek bij veulens op stal kan nuttig zijn als vermoed wordt dat bovenstaande parasieten aanwezig zijn. Vooral *Parascaris* komt vrij veel voor. Hiervoor kan mestonderzoek uitgevoerd worden bij veulens vanaf drie maanden (de prepatente periode is tien tot dertien weken) tot ongeveer een jaar.

Zodra de veulens op de weide grazen, kunnen worminfecties (strongyloiden) opgevolgd worden door regelmatig mestonderzoek (maandelijks of op het einde van de “egg reappearance period” na behandeling), zoals bij oudere paarden.

Prof. dr. E. Claerebout,
Vakgroep Immunologie, Virologie en
Parasitologie,
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent,
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

TROMBOCYTOPENISCHE PURPURA BIJ ZUIGENDE BIGGEN

VRAAG

“Wat zijn de oorzaken van trombocytopenische purpura bij zuigende biggen? Welke behandeling dient ingesteld te worden en hoe kan het onder controle gehouden worden?”

ANTWOORD

Trombocytopenische purpura (TP) is een zeldzame aandoening, waarbij zwaardere, goed zuigende biggen subcutane hemorragieën ontwikkelen tussen drie en twintig dagen na de geboorte. De aangetaste biggen zijn zwak en sterven vaak na één à twee dagen. Castratie en het couperen van de staartjes verhogen het risico op sterfte in aangetaste tomen (Nordstoga, 1965; Saunders en Kinch, 1968; Galletti et al., 2010; Karlsen et al., 2013). Doorgaans zijn slechts enkele biggen van een toom aangetast. Trombocytopenische

purpura kan eventueel ook een terugkerend probleem zijn, waarbij tomen van opeenvolgende rondes aangetast zijn (Nordstoga, 1965; Saunders en Kinch, 1968; Forster, 2007; Galletti et al., 2010; Karlsen et al., 2013). In dergelijke gevallen gaat het meestal om tomen van multipare (vierde pariteit of hoger) zeugen.

De pathogenese van TP is nog niet volledig opgehelderd. Het betreft een allo-immune aandoening, waarbij de zeug antistoffen produceert tegen de fetale trombocytantigenen die geërfd werden van de beer. De buitenste laag van de bloedplaatjes, de glycocalyx, bestaat uit een serie van glycoproteïnen die verschillende polymorfe antigenen tot expressie brengen en die significant kunnen verschillen tussen leden van dezelfde species. Bij TP is de samenstelling van de polymorfe antigenen van de fetale bloedplaatjes verschillend van die van de zeug. Dit resulteert in de productie van antistoffen door de zeug die aan de biggen

doorgegeven worden tijdens de eerste levensdag. De antistoffen vallen de bloedplaatjes van de biggen aan en vernietigen deze uiteindelijk (Davis, 1998; Roth, 1999). Hierdoor faalt het normale bloedstollingsmechanisme en uiteindelijk leidt dit tot hemorragische diathese (Andersen en Nielsen, 1973; Roth, 1999). Sterfte treedt op door bloedingen in één of meerdere organen. De belangrijkste opname van alloantistoffen gebeurt via het colostrum en is beperkt tot de vroege, neonatale periode (tot 36 uur) wanneer de intestinale mucosa de passage toelaat van macromoleculen. Van zodra het aantal trombocyten daalt onder $30\text{-}50 \times 10^9/\text{L}$ bloed, ontwikkelt een big TP (Andersen en Nielsen, 1973; Forster, 2007).

De diagnose van TP wordt vermoed op basis van de anamnese (geen wijziging in medicatie of vaccinatie, het sporadisch voorkomen, slechts deel van to(o)m(en) aangetast) en het klinisch beeld (subcutane hemorragieën ter hoogte van het abdomen en cyanotische verkleuring van de oren) (Figuur 1 en 2). De diagnose wordt bevestigd door het lage aantal bloedplaatjes tijdens het hematologisch onderzoek (in afwezigheid van hemolyse). Bij autopsie van aangetaste biggen wordt een uitgebreide hemorragische diathese vastgesteld van interne organen in combinatie met de afwezigheid van bacteriële isolatie (Jackson en Cockcroft, 2007). Er kunnen ook bloedingen in het hart of het pericard aangetroffen worden en/of ongestold bloed ter hoogte van het intestinale stelsel en ter hoogte van de milt, nieren en longen; desalniettemin kunnen interne organen in sommige gevallen er bleek uitzien en met weinig bloed gevuld zijn (Figuur 3). (Nordstoga, 1965; Saunders en Kinch, 1968; Forster, 2007). Voor de differentiaaldiagnose moet rekening gehouden worden met volgende aandoeningen: 1) virale pathogenen, zoals Afrikaanse of klassieke varkenspest, 2) bacteriële infecties door *Actinobacillus suis*, *Streptococcus suis* of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, 3) intoxicaties, bijvoorbeeld door opname van rattengif (coumarines), 4) Vitamine-K-tekort (Jackson en Cockcroft, 2007).

Er is geen effectieve behandeling voor aangetaste biggen, zelfs niet wanneer TP snel wordt gediagnosticeerd. Doorgaans sterven aangetaste biggen of moeten ze worden geëuthanaseerd (Forster, 2007; Karlens et al., 2013). Men kan er wel voor zorgen dat de incompatibiliteit tussen zeug en fetale trombocytantigen niet bevorderd wordt. Hiervoor moet worden nagegaan of aangetaste tomen telkens van dezelfde zeug afkomstig zijn (Galletti et al., 2010). Zeugen die herhaaldelijk aanleiding geven tot tomen met TP, worden het beste opgeruimd. Als dit niet mogelijk is, moet er gewerkt worden met pleegzeugen voor er colostrum wordt opgenomen. In alle andere gevallen waarbij er geen duidelijke link bestaat met bepaalde zeugen, moet de focus op beerniveau gericht worden (Jackson en Cockcroft, 2007; Galletti et al., 2010). Er moet vermeden worden dat sperma van telkens dezelfde beer in opeenvolgende rondes gebruikt wordt en/of dat er spermadosen aangekocht worden van meerdere beren.



Figuur 1. Big met trombocytopenische purpura. Subcutane hemorragieën ter hoogte van het abdomen en tussen de achterpoten. Foto: Eenheid Gezondheidszorg varken, Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent.



Figuur 2. Big met trombocytopenische purpura. Cyanotische verkleuring van de oren. Foto: Eenheid Gezondheidszorg Varken, Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent.



Figuur 3. Big met trombocytopenische purpura. Bleke interne organen met weinig opeenhoping van bloed. Foto: Eenheid Gezondheidszorg varken, Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent.

Op selectiebedrijven waar een zekere mate van inteelt voorkomt, mogen zeugen met aangetaste tomen niet geïnsemineerd worden met sperma van dezelfde beer tijdens opeenvolgende pariteiten.

REFERENTIES

- Andersen S., Nielsen R. (1973). Pathology of purpura thrombocytopenia in piglets. *Nordisk Veterinaermedicin* 25, 210-219.
- Davis G.L. (1998). Platelet specific alloantigens. *Clinical Laboratory Science* 6, 356-361.
- Forster L.M. (2007). Neonatal alloimmune thrombocytopenia, purpura and anemia in 6 neonatal piglets. *The Canadian Veterinary Journal* 48, 855-857.
- Galletti E., Merialdi G., Antonelli A., Brini E., Fusaro L., Sarli G., Fontana M.C., Martelli P. (2010). Haemorrhagic syndrome in neonatal piglets. *SUIS* 65, 34-37.
- Jackson P.G.G., Cockcroft P.D. (2007). Diseases of the cardiovascular, haemopoietic and lymphatic systems. In: *Handbook of Pig Medicine*. Saunders Elsevier, Philadelphia, p. 143-154.
- Karlsen O.M., Stahl A.C.A., Framstad T. (2013). Thrombo-

cytopenia purpura as the cause of deaths in piglets. In: *Proceedings of the Joint Meeting of the 5th European Symposium of Porcine Health Management and the 50th Anniversary Meeting of the Pig Veterinary Society of Great Britain*. Edinburgh, p. 102.

- Nordstoga K. (1965). Thrombocytopenic purpura in baby pigs caused by maternal isoimmunization. *Veterinary Pathology* 2, 601-610.
- Roth J.A. (1999). The immune system. In: Straw B.E., D'Allaire S., Mengeling W.L., Taylor D.J. (editors). *Diseases of Swine*. John Wiley and Sons Ltd, Iowa, p. 799-820.
- Saunders C.N., Kinch D.A. (1968). Thrombocytopenic purpura of pigs. *Journal of Comparative Pathology* 78, 513-523.

Drs. I.Arsenakis, Drs. K. Vansteenkiste,
Prof. dr. D. Maes
Eenheid Gezondheidszorg Varken,
Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en
Bedrijfsdiergeneeskunde,
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent,
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

Uit het verleden

GENADIGE DOOD VOOR KLORIS, DE KAT

Stamelend bracht hij de klachten naar voor die verhevigd in Kloris waren teruggekeerd en hoe radeloos hij er, na al dat vruchteloos medicineren, aan toe was. Nu moest de dokter niet denken dat, hij had toch zelf ook, vorige zomer al, omdat nu eenmaal, welbeschouwd, alles in aanmerking genomen, juist in het belang van, - even onderbrak hij zich, alvorens aan zijn ultieme suggestie toe te komen, maar dat hoefde al niet meer: gelaten knikkend had dokter Beckers zijn hand op zijn onderarm gelegd, en gezegd; 'U hebt uw besluit genomen. ik geloof dat het een wijs besluit is, temeer daar ik zie hoe moeilijk het u valt'.

Snikkend boog hij zich naar het mandje dat hij straks, misschien al over een half uur, zo leeg mee naar huis zou krijgen ...

Uit: Thomas Roosenboom (2009) *Zoete mond, Querido's*, Amsterdam, p. 45-46: het verhaal van dierenarts Rebert van Buyten in een dorpje aan de Rijn in de jaren zestig - zeventig.

Luc Devriese



advocate®



Preventie en behandeling van longworm (*A. vasorum*) bij honden



Advocate® spot-on oplossing voor honden. (100 mg/ml imidacloprid en 25 mg/ml moxidectine). **Indicaties:** Voor honden die lijden aan, of risico lopen op, gemengde parasitaire infecties: Voor de preventie en behandeling van vlooiënbesmetting (*Ctenocephalides felis*), voor de behandeling van bijtende luizen (*Trichodectes canis*), van oormijtinfestatie (*Otodectes cynotis*), schurft (*Sarcoptes scabiei* var. *Canis*), demodicosis veroorzaakt door *Demodex canis*, voor de preventie van hartworm (L3 en L4 larven van *Dirofilaria immitis*), voor de preventie van *Angiostrongylus vasorum* (Angiostrongylosis) (L4 larven en onvolgroeide stadia), voor de behandeling van *Angiostrongylus vasorum* (angiostrongylosis), de behandeling van *Crenosoma vulpis*, voor de behandeling van circulerende microfilariae (*Dirofilaria immitis*), voor de preventie van cutane dirofilariosis (L3 larven van *Dirofilaria repens*), voor de behandeling van cutane dirofilariosis (volwassen stadia van *Dirofilaria repens*), voor de vermindering van circulerende microfilariae (*Dirofilaria repens*), voor de preventie van spirocercosis (*Spirocerca lupi*) en voor de behandeling van infecties met gastro-intestinale nematoden (L4 larven, onvolgroeide en volwassen stadia van *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* en *Uncinaria stenocephala*, volwassen *Toxascaris leonina* en *Trichuris vulpis*). Het product kan gebruikt worden als onderdeel van een behandelingsstrategie tegen door vlooiën veroorzaakte allergische dermatitis (FAD). **Contra-indicaties:** Niet gebruiken bij puppies jonger dan 7 weken. Niet gebruiken bij overgevoeligheid voor één van de bestanddelen van dit product. Niet gebruiken bij honden geclassificeerd als klasse 4 voor hartworm want de veiligheid van het product werd niet onderzocht bij deze diergroep. Bij katten moet het corresponderende product 'Advocate voor katten' gebruikt worden, dat 100 mg/ml imidacloprid en 10 mg/ml moxidectine bevat. Bij fretten: Advocate voor honden niet gebruiken. Enkel 'Advocate voor kleine katten en fretten' (0,4 ml) mag gebruikt worden. **Bijwerkingen:** Het gebruik van het product bij honden kan gepaard gaan met een voorbijgaande jeuk. In zeldzame gevallen kunnen vetig haar, erythema en braken voorkomen. Deze symptomen verdwijnen zonder verdere behandeling. In zeldzame gevallen kan het product een lokale overgevoelighedsreactie veroorzaken. Wanneer het dier na de behandeling op de plaats van toediening ligt, kunnen in zeer zeldzame gevallen neurologische symptomen (waarvan de meeste van voorbijgaande aard) waargenomen worden. Het product smaakt bitter en spekselen kan voorkomen wanneer het dier de plaats van toediening likt onmiddellijk na behandeling. Dit is geen symptoom van intoxicatie en verdwijnt na enige minuten zonder behandeling. Correct gebruik minimaliseert de mogelijkheid voor het dier de toedieningsplaatsen te likken. In zeer zeldzame gevallen kan het product ter hoogte van de toedieningsplaats een sensatie veroorzaken, resulterend in voorbijgaande gedragsveranderingen zoals sloomheid, agitatie of gebrek aan eetlust. Een veld studie heeft aangetoond dat honden positief voor hartworm met microfilaraemia risico lopen op ernstige respiratoire symptomen (hoesten, tachypneu en dyspneu) die snelle veterinaire behandeling kan vereisen. In de studie werden deze bijwerkingen waargenomen bij 2 van 106 behandelde honden. Ook gastro-intestinale symptomen (braken, diarree, gebrek aan eetlust) en lethargie zijn mogelijke bijwerkingen na de behandeling. **Dosering: Doseringsschema:** De aanbevolen minimumdosis bedraagt 10 mg/kg lichaamsgewicht imidacloprid en 2,5 mg/kg lichaamsgewicht moxidectine, equivalent aan 0,1 ml/kg lichaamsgewicht Advocate voor honden. Het behandelingschema dient gebaseerd te worden op de lokale epidemiologische situatie.



12 WEKEN
BESCHERMING

NIEUW: BRAVECTO® SPOT-ON VOOR DE KAT

BRAVECTO®
EXPECT THE EXTRAORDINARY

Spot-on voor katten
Beschermt 12 weken
Tegen vlooien en teken
Innovatieve applicator: Twist and Use
Uitsluitend op diergeneeskundig voorschrift

Bravecto 112,5 mg spot-on oplossing voor kleine katten (1,2 - 2,8 kg), **Bravecto 250 mg** spot-on oplossing voor middelgrote katten (>2,8 - 6,25 kg), **Bravecto 500 mg** spot-on oplossing voor grote katten (>6,25 - 12,5 kg). **Indicaties:** Voor de behandeling van teken- en vlooieninfestaties bij katten. Dit diergeneesmiddel is een systemisch insecticide en acaricide met onmiddellijke en aanhoudende vlooien- (*Ctenocephalides felis*) en teken- (*Ixodes ricinus*) dodende werking gedurende 12 weken. Vlooien en teken moeten gehecht zijn aan de gastheer en beginnen met voeden om blootgesteld te worden aan het werkzame bestanddeel. Het product kan gebruikt worden als onderdeel van een behandelingsstrategie tegen vlooienallergiedermatitis (VAD). **Contra-indicaties:** Niet gebruiken bij overgevoeligheid voor het werkzame bestanddeel of één van de hulpstoffen. **Bijwerkingen:** Vaak voorkomende bijwerkingen in klinische studies waren milde en voorbijgaande huidreacties op de toedieningsplek (2,2% van de behandelde katten), zoals roodheid, jeuk of kaalheid. Overige symptomen die kort na toediening werden waargenomen zijn: apathie/trillen/gebrek aan eetlust (0,9% van de behandelde katten) of braken/speekselen (0,4% van de behandelde katten). De frequentie van bijwerkingen is als volgt gedefinieerd: zeer vaak (meer dan 1 op de 10 dieren vertonen bijwerkingen) gedurende de duur van één behandeling), vaak (meer dan 1 maar minder dan 10 van de 100 dieren), soms (meer dan 1 maar minder dan 10 van de 1.000 dieren), zelden (meer dan 1 maar minder dan 10 van de 10.000 dieren), zeer zelden (minder dan 1 van de 10.000 dieren, inclusief geïsoleerde meldingen). **Dosering:** Voor spot-on gebruik. Bravecto dient toegediend te worden volgens onderstaande tabel (overeenstemmend met een dosering van 40-94 mg fluralaner/kg lichaamsgewicht): Gewicht van de kat (kg) / Sterkte en aantal van de toe te dienen pipetten: 1,2 - 2,8 kg: 1x Bravecto 112,5 mg, >2,8 - 6,25kg: 1x Bravecto 250 mg, >6,25 - 12,5kg: 1x Bravecto 500 mg. Voor katten boven 12,5 kg lichaamsgewicht dient een combinatie van twee pipetten te worden gebruikt die het beste bij het lichaamsgewicht past. Toedieningswijze: Stap 1: Onmiddellijk voor gebruik het sachet openen en de pipet eruit halen. De pipet dient bij de basis of bij het harde bovenste deel onder de dop rechtop vastgehouden te worden (punt naar boven) om deze te openen. De draai-en-gebruik dop dient met de klok mee of tegen de klok in één keer rondgedraaid te worden. De dop zal op de pipet blijven; het is niet mogelijk deze te verwijderen. De pipet is open en klaar voor gebruik als het breken van de verzegeling wordt gevoeld. Stap 2: De kat dient te staan of liggen met de rug horizontaal voor een gemakkelijke toediening. Plaats de pipetpunt aan de schedelbasis van de kat. Stap 3: Knijp zachtjes in de pipet en breng de gehele inhoud direct op de huid van de kat aan. Het product dient bij katten tot 6,25 kg lichaamsgewicht aangebracht te worden op één plek aan de schedelbasis en bij katten met meer dan 6,25 kg lichaamsgewicht op 2 plekken. **Behandelschema:** Voor optimale controle van een teken- en vlooieninfestatie dient het diergeneesmiddel met een interval van 12 weken te worden toegediend. EU/2/13/158/018-019, EU/2/13/158/022-023, EU/2/13/158/026-027