



Köpeklerin Kronik Endometritislerinde Syndecan- 1 (CD138)'in Diagnostik Önemi*

Serkan YILDIRIM^{1a}, Fatma İLHAN^{2b}, Muhammet Bahaeddin DÖRTBUDAK^{3c}, Nebi ÇETİN^{4d}

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
2. Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, TÜRKİYE.
3. Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Bingöl, TÜRKİYE.
4. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0003-2457-3367^a, 0000-0003-0363-6285^b, 0000-0001-6073-4215^c, 0000-0001-5777-964X^d

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
08.08.2021	22.11.2021	30.12.2021

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Yıldırım S, İlhan F, Dörtbudak MB, Çetin N: Köpeklerin Kronik Endometritislerinde Syndecan- 1 (CD138)'in Diagnostik Önemi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 16(3): 306-312, 2021. DOI: 10.17094/ataunivbd.985597

Öz: Bu çalışmada köpekler için önemli bir sağlık problemi olan ve çoğunlukla infertiliteye yol açan kronik endometritislerin tanısında Syndecan-1'in rolü araştırılmıştır. Ayrıca Syndecan-1 ve hematoksil-eozin (HE) boyama yöntemlerinin kronik endometritislerin tanısındaki karşılaştırmaları yapılmıştır. Genellikle herhangi bir klinik semptom gözlenemeyen kronik endometritislerde tanı güç olduğundan prognoz iyi değildir. Bunun için endometritislerin kronik formlarında güvenilir bir yöntemle yapılan erken tanı oldukça önemlidir. Endometritislerin çeşitli tanı yöntemlerinden biri olan histopatolojik muayenede plazmositlerin varlığı yangı karakterinin kronik formu için ayırıcı bir özelliktir. Histopatolojik boyama yöntemleriyle belirlenebilen plazmositler, aynı zamanda plazmositlere spesifik Syndecan-1 reseptörünün immünohistokimyasal boyama yöntemiyle de saptanabilir. Bu çalışma için Van ili ve çevresinde 67 adet dişi köpek uterusu temin edildi. Uterus dokularının histopatoloji için hematoksil-eozin (HE) ve immünohistokimyasal inceleme için Syndecan-1 boyamaları gerçekleştirildi. Yapılan incelemelerde 57 adet endometritisli uterus örneklerinden HE boyamayla 18'ine; Syndecan-1 ile 21'ine kronik endometritis tanısı konuldu. Çalışma sonucunda; HE'nin aksine Syndecan-1 boyama ile plazmositlerin daha kolay ve net bir şekilde seçilebildiği görüldü. Ayrıca köpeklerde ilk defa yapılan bu çalışmayla kronik endometritislerin tanısında Syndecan-1'in güvenilir ve pratik bir yöntem olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Hematoksil-Eozin, Köpek, Kronik endometritis, Syndecan-1.

Diagnostic Importance of Syndecan-1(CD138) in Chronic Endometritis of Dogs

Abstract: In this study, the role of Syndecan-1 in the diagnosis of chronic endometritis, which is an important health problem for dogs and mostly causes infertility, was investigated. In addition, comparisons of Syndecan-1 and HE staining methods in the diagnosis of chronic endometritis were made. Generally, the prognosis is not good because the diagnosis is difficult in chronic endometritis, where no clinical symptoms can be observed. For this, early diagnosis with a reliable method in chronic forms of endometritis is very important. The presence of plasmocytes in the histopathological examination, which is one of the various diagnostic methods of endometritis, is a distinctive feature for the chronic form of the inflammatory character. Plasmocytes, which can be detected by histopathological staining methods can also be detected by immunohistochemical staining of the Syndecan-1 receptors that specific to plasmocytes at the same time. For this study, a sufficient number of female dog uterus was obtained in and around Van province. Hematoxylin-eosin (HE) staining of uterine tissues for histopathology and Syndecan-1 staining for immunohistochemical examination were performed. In the examinations made, 18 of 57 uterus samples with HE staining; With Syndecan-1, 21 of them were diagnosed with chronic endometritis. In the result of working; With Syndecan-1 staining, it was observed that plasmocytes could be selected more easily and clearly than HE. In addition, it was determined that Syndecan-1 is a reliable and practical method in the diagnosis of chronic endometritis with this study, which was performed for the first time in dogs.

Keywords: Chronic endometritis, Dog, Hematoxylin-Eosin, Syndecan-1.

✉ Muhammet Bahaeddin Dörtbudak

Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Bingöl, TÜRKİYE.

e-posta: mbdortbudak@gmail.com

*Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından bağımsız proje olarak (Proje No: YYÜ-BAPB-2014-HIZ-VF040) desteklenmiştir.



GİRİŞ

Genellikle uterus mukozasının yangısı olarak tanımlanan endometritis köpeklerde sıklıkla karşılaşılan bir sorundur (1,2). Endometritisler klinik seyrine göre akut ya da kronik olabilir. Akut endometritislerde çeşitli içerikte vaginal akıntılar ilk göze çarpan bulgudur. Kronik endometritislerde çoğunlukla gözle görülür bir klinik semptomata rastlanmaz. Bu durum hastalığın tanısını ve dolayısıyla tedavisini zorlaştırmaktadır. Erken tanı konulamayan kronik endometritislerde prognoz iyi olmayıp, infertilite kaçınılmaz olmaktadır (3-5).

Endometritislerin tanısında; klinik muayene, vaginal muayene, vaginal sitoloji/histopatoloji, endometriyal sitoloji/histopatoloji, ultrasonografik muayene, bakteriyolojik muayene, kan biyokimyasal ve hematolojik parametreleri ile bazı pirojenik testlerden istifade edilmektedir (6,7). Bu tanı yöntemlerinden histopatolojik incelemeyle akut ve kronik endometritislerin tanısı rahatlıkla konulmakta ve hastalığın prognozu hakkında bilgi edinilmektedir. Histopatolojik incelemede yangı bölgesine göç eden hücre tipi, hastalığın klinik formu hakkında bilgi verir. B lenfositlerden gelişim gösteren ve antikor sentezi yapan, plazmositler genellikle dokuların kronik yangılarında artış gösterir (8-10). Plazma hücreleri HE (Hematoxylin&Eosin), MGP(Methyl Green Pyronin), immünohistokimya (IgG, Syndecan) ve in situ hibridizasyon (κ ve λ hafif zincirlere bağlanma) yöntemleriyle tanımlanabilir. Plazmositlerin gösterilmesinde kullanılan bu yöntemlerden Syndecan antikorları kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama altın standart olarak kabul edilmektedir (11-13).

SDC1 geni tarafından kodlanan Syndecan-1 proteini, hücre yüzey proteoglikanların bir üyesi olup, hücre-hücre-matriks etkileşimleri, hücre proliferasyonu ve infiltrasyonu gibi hücre organizasyonu ve yangı reaksiyonunun yönlendirilmesinde rolü bulunmaktadır. Günümüzde gerek flow sitometride ve gerekse parafinize edilmiş doku kesitlerinde plazmositlerin gösterilmesinde

Syndecan-1 güvenilir sonuç vermektedir (14-15). Kronik endometritis varlığına işaret eden plazmositler uterus dokudaki proliferatif ve mitotik stroma/mukoza epitel hücreleri, plazmositler dışındaki mononükleer yangı hücreleri, desidual ve stromal plazmositoid hücrelere benzemekte ve mikroskopik incelemede sıklıkla bu hücrelerle karıştırılabilmektedir (12,16).

Bu çalışmada kronik endometritislerin göstergesi olan plazmositlerin hem histopatolojik hem de immünohistokimyasal olarak gösterilmesi amaçlandı. Ayrıca bu çalışmayla köpeklerin uterus dokularında Syndecan-1'in bu türlerdeki kronik endometritislerin saptanmasındaki etkisi ve aynı zamanda HE boyamayla da karşılaştırması ilk defa yapıldı.

MATERYAL ve METOT

Çalışma materyalleri 2015-2016 yıllarında Van ili ve çevresindeki özel veteriner klinikleri ile hayvan hastanesinde ovariohisterektomi ile kısırlaştırılan dişi köpek uteruslarından oluşmaktadır. Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 25.06.2015 tarih ve 2015/08 sayılı kararı ile gerçekleştirilmiştir. Farklı ırk, yaş ve seksüel siklus dönemlerinde bulunan 67 adet uterus örneği toplandı ve incelenen uterus örnekleri patolojik incelemeler için %10'luk tamponlu formalin solüsyonuna alındı.

Tespit solüsyonunda 48 saat süreyle fikzasyonu sağlanan dokular, dereceli alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek rutin doku takip işlemleri yapıldı. Daha sonra parafin blok haline getirilen örneklerden rotary mikrotomla (Leica RM 2135) 5 μ kalınlığında kesitler hem normal hem de adhesivli lamlara alındı. Normal lamlara alınan kesitlerin HE boyamaları yapıldı. HE boyalı preparatlar ışık mikroskobu (Leica DM 2500) altında incelendi ve ilgili alanlardan görüntü alındı. Ayrıca örneklerin x400'lük büyütmedeki incelemelerinde birim alandaki plazmositler sayılarak

kronik endometritisler hafif(10-20), orta(20-30) ve şiddetli(≥ 31) şeklinde değerlendirildi.

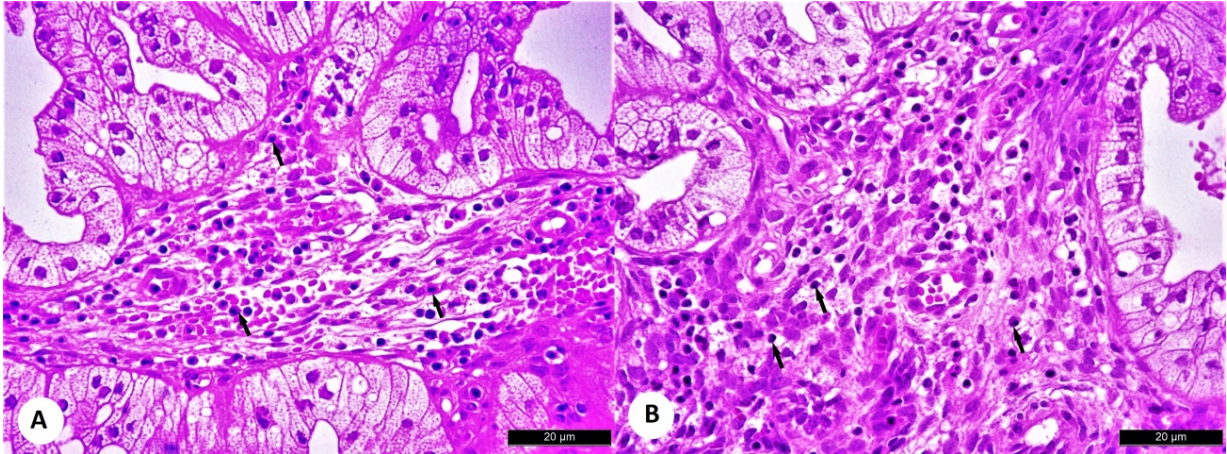
İmmünohistokimyasal boyama için adhesivli lamlara alınan doku kesitleri 1 saat kadar etüvde bekletildikten sonra ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemleri yapıldı. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için kesitler %3'lük H_2O_2 'de 10 dk bekletildi. Fosfat buffer solüsyonuyla (PBS) ile yıkanan kesitlerde antijen varlığını açığa çıkarmak için antijen retrieval solüsyonuyla (Sitrat buffer, ph 6.1) mikrodalgada 3x5 dk 600 watt'ta kaynama işlemi uygulandı. Oda ısısına soğutulan dokuların non-spesifik antijen bağlanmalarını önlemek için protein blok solüsyonuyla 10 dk. boyunca karanlık ve nemli kamarada inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Sonra yıkama yapılmaksızın dokulara 1/50 oranında primer antikor (Bioss Anti-CD138/Syndecan-1 Polyclonal, Catalog # BS-1309R.) damlatıldı. Primer antikorla 1 saat süreyle 37°C'de inkübe edilen dokuların PBS ile yıkamalarının ardından biotinize sekonder antikorla inkübasyonları sağlandı. Daha sonra tekrar PBS ile yıkanan dokular streptavidin-peroksidaz konjugatı ile inkübe edildi. Bu uygulamadan sonra son kez PBS ile yıkanan dokularda antikor bağlanmalarını göstermek için lamlara 3-3' Diaminobenzidine (DAB) kromojeni eklendi ve istenen renk gradyanı elde edildikten sonra dokular distile suyla yıkandı. Son olarak Mayer's hematoksilenle arka zemin boyaması yapılan dokular alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan damlatılarak lamelle kapatıldı. İmmünohistokimyasal boyaması yapılan preparatlar ışık mikroskop altında incelendi ve ilgili alanlardan görüntü alındı. HE incelemede olduğu gibi örneklerin x400'lük büyütmedeki birim alanda immünreaksiyon veren plazmositler sayılarak kronik endometritislerin hafif, orta ve şiddetli şeklinde değerlendirmeleri yapıldı.

BULGULAR

Endometritisli uterus örneklerin histopatolojik incelemelerine göre yangı tipleri (akut/kronik)

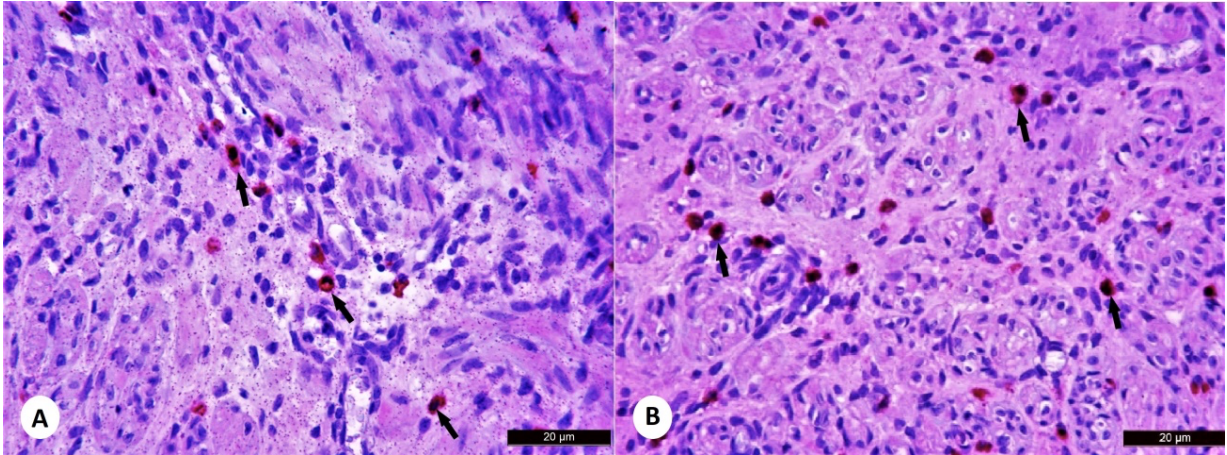
belirlendi. Akut endometritislerde; mukoza epiteli ve glandüler hücrelerde dejenerasyon ve deskuamasyon, lamina propriyada hiperemi, ödem ve çoğunluk nötrofil, az sayıda da mononükleer lökositlerden oluşan yangı hücre infiltrasyonları görüldü. Bazı olgularda lümende akut yangı hücreleri ve doku artıklarını içeren purulent eksudat varlığı gözlemlendi. Bu yangı tipinde eksudatif olaylar baskın durumdaydı. Kronik endometritislerde; lamina propriyada çoğunluğu lenfosit ve plazmositlerden oluşan kısmen makrofajların da bulunduğu mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü (Şekil 1. A,B). Ayrıca ileri kronik olgularda stromada fibröz bağ doku artışı ve bezlerin sayılarının azalıp, polipoid hiperplastik değişikliklere uğradıkları gözlemlendi.

Yapılan histopatolojik incelemede x400'lük büyütmenin birim alanında akut olguların az sayıda plazmosit içerdiği görüldü. Birim alanda 10'nun altında plazmosit bulunduran örnekler akut; 10-20 arasında hafif; 20-30 arası orta; 30 üzerinde plazmosit taşıyan örnekler şiddetli kronik endometritis olarak değerlendirildi. Buna göre HE boyama ile 18 olgunun kronik endometritisli olduğu belirlendi. Aynı şekilde immünohistokimyasal boyama ile plazmositleri işaretleyen Syndecan-1 pozitifliklerin birim alandaki sayılarına göre 21 olgunun kronik endometritisli oldukları tespit edildi (Şekil 2. A,B). HE boyamada kronik endometritis tanısı konulan örneklerin tümünün IHC boyamada da kronik yangılı oldukları belirlendi. Ancak HE boyamada akut endometritis şüpheli 3 olgunun Syndecan-1 ile kronik endometritisli oldukları saptandı. İmmünohistokimyasal boyama ile plazmositlerin daha seçici olduğu ve bu yöntemle daha net ve kolay bir şekilde kronik endometritislerin tanılarının yapıldığı görüldü. HE ve IHC boyalı örneklerin plazmosit yoğunluğuna göre kronik endometritislerin şiddeti tablo halinde verildi (Tablo 1).



Şekil 1. Endometriyumda plazmosit infiltrasyonu (ok), HE, 20µ (A,B).

Figure 1. Plasmocyt infiltration in the endometrium (arrow), HE, 20µ (A,B).



Şekil 2. Endometriyumda Syndecan-1 immünreaktivitesi (ok), IHC, 20µ (A,B).

Figure 2. Syndecan-1 immunoreactivity in the endometrium (arrow), IHC, 20µ (A,B).

Tablo 1. Boyama yöntemlerine göre kronik endometritlerin şiddeti.

Table 1. The severity of chronic endometritis according to staining methods.

Boyama Yöntemi	Toplam KE	10-20 Plazmosit (Hafif KE)	21-30 Plazmosit (Orta KE)	≥31 Plazmosit (Şiddetli KE)
HE	18	8	5	5
IHC	21	10	6	5

KE; Kronik Endometritis HE; Hematoxylin&Eosin, IHC; Immunohistochemistry

TARTIŞMA ve SONUÇ

Endometritler diğer türlerde olduğu gibi köpeklerde yaşam kalitesini olumsuz etkilemektedir (1,17). Çeşitli sebeplere bağlı olarak endometritler akut ve ya kronik seyirli olabilir. Akut endometritlerde hastalık kısa sürede şiddetlenebilse de gözlenen klinik semptomlar ile erken tanı ve tedavi olanağı vardır. Ancak kronik endometritlerde durum böyle olmayıp, uzun süreli bir enfeksiyon periyodu ve yangısal reaksiyon söz konudur. Dahası bu yangısal değişiklerin klinik ve

makroskobik bulguları pek seçilemediğinden gerekli uygulamaların zamanında yapılması pek mümkün olmamakta ve geri dönüşsüz sonuçlarla karşı karşıya kalınmaktadır. Bunun için kronik endometritlerin güvenilir bir yöntemle erken tanısı oldukça önemlidir (4,18,19).

Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de köpek endometritlerinin akut/kronik formları üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Amerika'da yapılan bir çalışmada dişi köpeklerin genital sistem muayenelerinde endometritli örneklerin;

%52.4'nün kronik; %17.6'sının akut ve %30'nun subakut formda olduğu bildirilmiştir (20). Mısır'da endometritisli köpek uterusları üzerine yapılan bir çalışmada endometritisli olguların %50'sinde kronik; %12.5'inde akut endometritis ve %37.5'inde uterus neoplazmalarına rastlandığı rapor edilmiştir (21). Türkiye'de endometritisli köpek uterusları üzerine yapılan çalışmada; %66.6'sında akut endometritis ve %33.4'ünde kronik endometritis rastlandığı belirtilmiştir (22). Yapılan bu çalışmada akut formun daha yaygın olduğu görülmüştür.

Yangı karakterinin akut ya da kronik olduğunun tespitinde plazmositler önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir. Kronik yangılarda sayıları artan plazmositlerin varlığını ortaya koymak için HE, MGP, IHC(Syndecan, IgG) ve in situ hybridizasyon yöntemlerinden istifade edilebilir (11,13). Bu yöntemlerden en yaygın kullanılanı HE boyamadır. Ancak HE boyamada plazmositler gibi diğer hücrelerde boyanır ve plazmositler uterus dokusundaki stroma ve mukoza hücreleri, plazmositler dışındaki mononükleer yangı hücreleri, fibroblastlar, desidual hücreler ve stromal plazmasitoid gibi hücrelerle karışabilir. Bu karışıklığın önüne geçmek ve daha güvenilir bir sonuç elde edebilmek için plazmositlere spesifik olan Syndecan-1 boyama tercih edilebilir (12,16).

Köpeklerde kronik endometrislerin tanısında Syndecan'ların kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak beşeri hekimlikte yapılan bazı çalışmalarda; kadınların kronik endometrislerin tanısında Syndecan-1'in etkili bir marker olduğu görülmüştür. Chen YQ. ve ark. (23) kadın hastalıkları üzerine yaptıkları bir çalışmada kronik endometrislerin tanısında Syndecan-1'in duyarlılığının, HE boyamadan daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Hanif A. ve ark. (24) kadınların kronik endometrislerin tanısında Syndecan-1'in HE boyamaya göre daha net bir şekilde plazmositlerin gözlenme ve sayılabilme imkanı sunduğunu rapor etmişlerdir. Kronik yangı tanımlanmasında bir kıstas olan plazmositlerin varlığını göstermede Miguel ve ark. (25) IHC'yi altın standart olarak göstermişlerdir.

MGP'de sırayla %75 duyarlılık ve %65 özgüllük bulunduğunu ve aynı zamanda HE ve MGP'nin Syndecan'a göre plazmositleri göstermede daha düşük performansla sahip oluklarını belirtmişlerdir. Sunulan bu çalışmada da beşeri hekimlikte yapılan çalışmalarla uyumlu olarak Syndecan boyama ile HE boyamaya göre daha başarılı bir şekilde kronik endometrislerin tanısı yapılabilmektedir. HE boyamada kronik endometritis tanısı konulan örneklerin tümünün immünohistokimyasal boyamada da kronik yangılı oldukları tespit edildi. Ancak HE boyamada akut endometritis şüpheli 3 olgunun Syndecan-1 ile kronik endometritisli oldukları saptandı.

Sonuç olarak, ilk defa köpeklerin kronik endometritis tanısında Syndecan-1'in rolünün incelendiği bu çalışmada Syndecan-1 ile plazmositlerin varlığının daha iyi seçilebildiği ve Syndecan-1'in HE boyamaya göre kronik endometrislerin tanısında daha etkili ve güvenilir olduğu görüldü.

Teşekkür

Desteklerinden dolayı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı ve personeline teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Kumar D., Satish SK., Purohit GN., 2019. Endometritis in bitch: An review. *Pharma Innov J*, 8, 279-282.
2. Singh G., Dutt R., Kumar S., Kumari S., Chandolia, RK., 2019. Gynaecological problems in she dogs. *Haryana Vet*, 58, 8-15.
3. Ahuja AK., Honparkhe M., Sethi GS., Singh N., Jan F., Chauhan P., 2019. Association of canine pyometra with systemic inflammatory response syndrome. *J Entomol Zool Stud*, 7, 1409-1412.
4. Rosa-Filho RRD., Brito MM., Faustino TG., Almeida LLD., Gardes TP., Leite RF., Vannucchi Cl., 2020. Clinical changes and uterine

- hemodynamic in pyometra medically treated Bitches Animals, 10, 2011.
5. Zubair M., Rehman U., Sajid SM., 2014. Causes of infertility in bitch. *Adv Anim Vet Sci*, 2, 565-573.
 6. Hagman R., 2014. Diagnostic and prognostic markers for uterine diseases in dogs. *Reprod Dom Anim*, 49, 16-20.
 7. Fontaine E., Levy X., Grellet A., Luc A., Bernex F., Boulouis HJ., Fontbonne A., 2009. Diagnosis of endometritis in the bitch: a new approach. *Reprod Dom Anim*, 44, 196-199.
 8. Maya-Pulgarin D., Gonzalez-Dominguez MS., Aranzazu-Taborda D., Mendoza N., Maldonado-Estrada JG., 2017. Histopathologic findings in uteri and ovaries collected from clinically healthy dogs at elective ovariohysterectomy: a cross-sectional study. *J Vet Sci*, 18, 407-414.
 9. Oruç E., Kısadere İ., Jumakanova Z., Kadyralieva N., Keskin A., 2018. Bişkek bölgesinde barındırılan köpeklerde genital hastalıkların jinekolojik ve patolojik yönden araştırılması. *Manas J Agr Vet Life Sci*, 8, 9-18.
 10. Coggan JA., Melville PA., Oliveira CMD., Faustino M., Moreno AM., Benites NR., 2008. Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. *Braz J Microbiol*, 39, 477-483.
 11. Alcigir ME., Vural SA., 2011. Pathomorphological and immunohistochemical findings in an extramedullary plasma cell tumour in dog's rectum. *BJVM*, 14, 184-187.
 12. Kannar V., Lingaiah HKM., Sunita V., 2012. Evaluation of endometrium for chronic endometritis by using Syndecan-1 in abnormal uterine bleeding. *J Lab Physicians*, 4, 069-073.
 13. Shi Y., Solomides C., Gong G., Wang Z., Uppal G., Ly V., Peiper SC., Herbut P., Bajaj R., 2015. Fluorescence in situ hybridization on enriched CD138-positive cells in plasma cell myeloma. *Acta Med Int*, 2, 168.
 14. Teng Y., Aquino RS., Park PW., 2012. Molecular functions of Syndecan-1 in disease. *Matrix Bio*, 31, 3-16.
 15. Gharbaran R., 2015. Advances in the molecular functions of Syndecan-1 (SDC1/CD138) in the pathogenesis of malignancies. *Critical Rev in Onc/hem*, 94, 1-17.
 16. Bayer-Garner IB., Nickell JA., Korourian S., 2004. Routine Syndecan-1 immunohistochemistry aids in the diagnosis of chronic endometritis. *Arch Pathol Lab Med*, 128, 1000-1003.
 17. Rautela R., Katiyar R., 2019. Review on canine pyometra, oxidative stress and current trends in diagnostics. *Asian Pac J Reprod*, 8, 45.
 18. Lopes CE., De Carli S., Riboldi CI., De Lorenzo C., Panziero W., Driemeier D., Siqueira FM., 2021. Pet pyometra: correlating bacteria pathogenicity to endometrial histological changes. *Pathogens*, 10, 833.
 19. Maharathi SP., Dalai N., Mohapatra S., Mishra SR., Mahapatra APK., Kundu AK., Nath I., Dash S., 2020. Haemato-biochemical alterations in pyometra affected bitch. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 9, 1242-1245.
 20. Gifford AT., Scarlett JM., Schlafer DH., 2014. Histopathologic findings in uterine biopsy samples from subfertile bitches: 399 cases (1990–2005). *JAVMA*, 244, 180-186.
 21. Tawfik MF., Oda SS., El-Neweshy MS., El-Manakhly ESM., 2015. Pathological study on female reproductive affections in dogs and cats at Alexandria Province, Egypt. *AJVS*, 46, 74.
 22. Demirel MA., Vural SA., Vural R., Kutsal O., Günen Z., Küplülü Ş., 2018. Clinical, bacteriological, and histopathological aspects of endotoxic pyometra in bitches. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 24, 663-671.
 23. Chen YQ., Fang RL., Luo YN., Luo CQ., 2016. Analysis of the diagnostic value of CD138 for chronic endometritis, the risk factors for the pathogenesis of chronic endometritis and the effect of chronic endometritis on pregnancy: a cohort study. *BMC; women's health*, 16, 1-7.
 24. Hanif A., Sarfraz T., Tariq H., Khan SA., Jaffar SR., Akhtar, F., 2019. Evaluation of endometrial biopsies for chronic endometritis by using syndecan-1 (cd138) in abnormal uterine

- bleeding. PAFMJ, 69, 1341-1345.
25. Miguel RDV., Chivukula M., Krishnamurti U., Amortegui AJ., Kant JA., Sweet RL., Wiesenfeld HC., Phillips JM., Cherpes TL., 2011. Limitations of the criteria used to diagnose histologic endometritis in epidemiologic pelvic inflammatory disease research. Path-Res and Pract, 207, 680-685.