



## Histopathological and Immunohistochemical Evaluation of Acute Hepatitis Cysticercosa in a Lamb

Serkan YILDIRIM<sup>1</sup> Fatma İLHAN<sup>1</sup> Özlem ORUNÇ KILINÇ<sup>2</sup>  
Pınar TANRITANIR EKİCİ<sup>3</sup> Yusuf GÜL<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Van, Turkey

<sup>2</sup> Yuzuncu Yil University, Ozalp College, Van, Turkey

<sup>3</sup> Yuzuncu Yil University, Van Health College, Van, Turkey

Received: 26.10.2014

Accepted: 13.01.2015

### SUMMARY

In this study the cause of death of a 40 days old male lamb which brought to Pathology Department of Veterinary Faculty, Yüzüncü Yıl University was investigated. As a result of necropsy, the tissue samples of the lamb were analysed parasitologically, histopathologically and immunohistochemically, and it was determined that the lamb had died of acute hepatitis cysticercosa. Besides, in this specific case immunohistochemical analysis of S 100 and INOS immunoreactivity was performed. While in histopathological examination, severe necrotic hemorrhagic hepatitis was observed, in immunohistochemical inspection, particularly in parts where inflammation was severe, S 100 protein expression was seen in neutrophil leukocytes, and INOS expression was detected in macrophages. Though *Cysticercus tenuicollis* is seen widely throughout the world, recordings concerning acute hepatitis cysticercosa and related deaths are few. Emphasizing that acute hepatitis cysticercosa can be very pathogenic on new born lambs and mustn't be overlooked by clinicians, we believe that it would be appropriate to present this case study.

**Key Words:** Acute Hepatitis Cysticercosa, Histopathology, Immunohistochemistry, S 100, INOS

### ÖZET

## Bir Kuzuda Akut Hepatitis Sistiserkoza Vakasının Histopatolojik ve İmmunhistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı'na ölü olarak getirilen 40 günlük erkek kuzunun ölüm nedeni araştırıldı. Nekropsi sonucunda kuzunun doku örnekleri parazitolojik, histopatolojik ve immunhistokimyasal olarak incelenmiş ve ölüm sebebi olarak akut hepatitis sistiserkoza tanısı konulmuştur. Ayrıca bu vakada immunhistokimyasal olarak S 100 ve İNOS immunreaktivitesine bakılmıştır. Yapılan histopatolojik incelemede şiddetli nekrotik hemorajik hepatitis görülürken, immunhistokimyasal incelemede ise özellikle yangının şiddetli olduğu bölgelerde, çok miktarda nötrofil lökositlerde, az miktarda da makrofajlarda S 100 protein ekspresyonu görülürken, İNOS ekspresyonu ise makrofajlarda tespit edilmiştir. *Cysticercus tenuicollis*, dünya üzerinde yaygın görülmesine karşın akut hepatitis sistiserkoza ve buna bağlı ölüm vakalarına ilişkin kayıtlara az rastlanmıştır. Akut hepatitis sistiserkozanın yeni doğan kuzularda çok patojen olabileceği ve klinisyenlerin göz ardı etmemesi gerektiği düşünülerek bu olgunun sunulması uygun görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Akut Hepatitis Sistiserkoza, Histopatoloji, İmmunhistokimya, S 100, İNOS

### GİRİŞ

*Taenia hydatigena* köpek, tilki, çakal, kurt gibi karnivorların ince bağırsaklarında yaşayan bir parazit olup, larva formu (*Cysticercus tenuicollis*) ise ruminant ve domuzların omentum, mesenterium, periton ve karaciğerinin visseral yüzünde bulunmaktadır. Köpek dışkıyla doğaya çıkan *T. hydatigena*'nın yumurtaları ara konaklar tarafından alındıktan sonra ince bağırsakta yumurtayı terk edip, kan yoluyla (onkosfer) karaciğere

ulaşarak, parankimada yaklaşık 4 hafta bulunmaktadır. Bu süre sonunda organı terk eden larvalar karın boşluğuna yerleşmektedir (Soulsby 1982).

Köpeklerde çok patojen olmayan *T. hydatigena*'nın larva formunun özellikle koyunlarda akut ve kronik olmak üzere iki klinik form şekillendirdiği rapor edilmiştir (Livesey ve ark. 1981). Kronik sistiserkozis en sık görülen form olup, az sayıda yumurtanın alınması sonucunda ara konakta herhangi bir klinik semptom göstermeden periton boşluğunda geliştiği, kesimi takiben mezbahalarda

omentum, mesenterium, peritoneum ve karaciğerin visseral yüzünde rastlandığı bildirilmektedir (Soulsby 1982; Şenlik 2008).

Nadiren görülen akut form ara konağın çok sayıda *T. hydatigena* yumurtasını alması sonucu şekillenmektedir. Bu yumurtaların alınmasında sonra konağın barsaklarında serbest kalan onkosferler portal dolaşım yolu ile karaciğere ulaşır. Karaciğerde geçirdiği göçe bağlı olarak hemorajilere, fibrotik kanalların oluşmasına ve ayrıca serofibrotik peritonitise neden olmaktadır (Soulsby 1982; Jubb ve ark. 1993; Nourani ve ark. 2013). Sistiserkerin karaciğerdeki göçleri *C. tenuicollis*'in karaciğerde oluşturduğu hastalık tablosu hepatitis sistiserkoza olarak adlandırılmakta olup, ağır enfeksiyonlarda genç hayvanlarda, özellikle de kuzularda ölüme neden olmaktadır (Soulsby 1982; Yıldırım ve ark. 2006; Nourani ve ark. 2013). Şiddetli enfestasyonlarda karaciğerde 4000-5000 aktif sistiserk göçünün görülebileceği bildirilmiştir (Jubb ve ark. 1993). Şiddetli enfestasyonlar aynı zamanda, enfeksiyöz nekrotik hepatitis ve basiller hemoglobini gibi hastalıklara predispozisyon oluşturduğu bildirilmektedir (Jubb ve ark. 1993).

Nitrik oksit (NO), kalsiyumdan bağımsız bir enzimdir. Enzim bu özelliğinden dolayı indüklenebilir veya kalsiyumdan bağımsız NOS olarak adlandırılır. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimi normal şartlarda bulunmaz. Tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin 1 (IL-1), interlökin 2 (IL-2), IFN gibi sitokinler, interferon ve endotoksinler (lipopolisakkaritler) gibi yangısal mediatörlerin varlığında, yangı ve yara iyileşmesi gibi bazı patolojik durumlarda makrofajlar, damar endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, kalp kası hücreleri, mikroglial hücreleri, nötrofil lökositler ve monositlerden sentezlenir (Atalık ve Doğan, 1997). Makrofajlarda NO sentezlenmesi, bakteriyel enfeksiyonlara ilk yanıtıdır. Bakteri endotoksinleri, virus, protozoa ve parazit antijenleri ile uyarılan makrofajlarda üretilerek bakteri, tümör ve virüs hücreleri üzerine öldürücü sitotoksik etki yaptığı, yani NO spesifik olmayan immünitede rol oynadığı belirtilmektedir. Bu sitotoksik etkisini bakteri, parazit gibi birçok patojenin ve tümör hücrelerinin ATP üreten oksidatif fosforilasyonun (ubikinon redüktaz'ı), glikolizi (gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz'ı), TCA siklusunun (Cis-akonitaz'ı) Fe içeren bazı enzimlerini inhibe ederek gerçekleştirmektedir (Lepoivre ve ark. 1991).

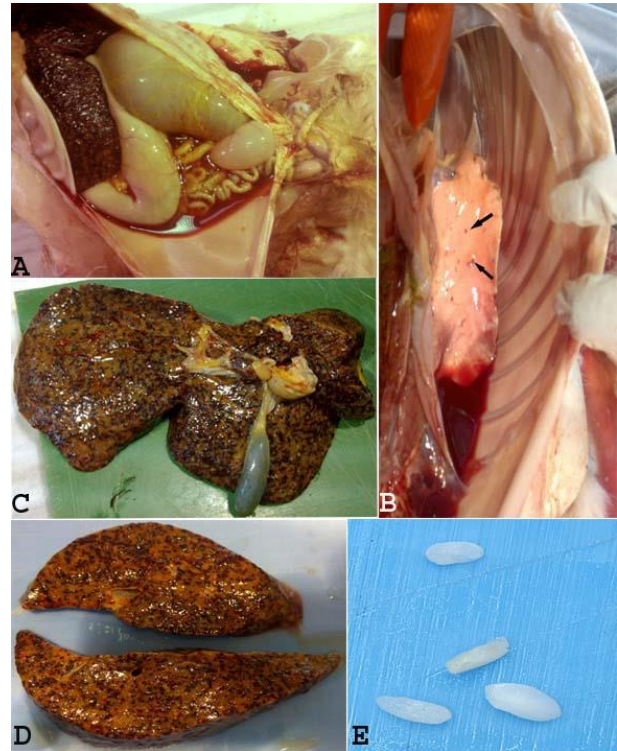
S100 protein ailesi omurgalılarda bulunan kalsiyum-modüle proteinlerden olup, EF-el tipi multijenik özelliktedir. S100 protein ailesi işlevsel olarak üç ana alt gruba ayrılan 24 üyeden oluşmakta olup, intraselüler ve ekstraselüler özellikte birçok fonksiyonu bulunmaktadır. S100 proteinleri monositlerde, makrofajlarda, mikroglia hücrelerinde, nötrofillerde, lenfositlerde, mast hücrelerinde, endotel hücrelerde, vasküler düz kas hücrelerinde, nöronlarda, astrositlerde, Schwann hücrelerinde, epitel hücrelerde ve kardiyomiyositlerde bulunmaktadır. S 100 proteinleri, hücre farklılaşma ve proliferasyonunda,  $Ca^{+2}$  homeostasis, protein fosforilasyonu ve bazı enzim aktiviteleri gibi intraselüler olayların düzenlenmesinden sorumludur. Protein fosforilasyonunun parazitlerin gelişmesi ve farklılaşmasının önemli bir indikatörü olduğu ifade edilmektedir (Donato 1999; Beyaz ve ark. 2009).

*T. hydatigena*'nın bir larva formu olan *Cysticercus tenuicollis* tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup, bazı ülkelerde koyun popülasyonlarında prevalansının %85'in üzerinde olduğu bildirilmektedir (Soulsby 1982). Bununla birlikte akut hepatitis sistiserkoza ve buna bağlı

ölüm vakalarına ilişkin kayıtların çok az olduğu görülmektedir (Soulsby 1982; Yıldırım ve ark. 2006; Nourani ve ark. 2013). *C. tenuicollis*'e bağlı ölüm vakalarına ilişkin çalışmaların az olmasından dolayı vakanın bildirilmesi, ayrıca akut hepatitis sistiserkoza'da S-100 protein ve İNOS reaktivitesinin saptanması amaçlanmıştır.

## OLGU SUNUMU

Olgunun materyalini, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı'na getirilen 40 günlük erkek bir kuzu oluşturdu. Anamnez bilgisine göre sürüde bulunan kuzularda ani ölümler görüldüğü, nekropsi için getirilen kuzunun ölen dördüncü kuzu olduğu ifade edildi. Nekropside makroskopik olarak kuzunun karın ve göğüs boşluğunda kanlı bir eksudat biriktiği (Şekil 1A), akciğerlerde hafif, karaciğerde ise yoğun *T. hydatigena*'nın larvasının enfestasyonu görüldü (Şekil 1B-C). Karaciğer serozası ve parankimasında çok şiddetli koyu kırmızı kahverengi hemorajik göç izleri olduğu saptandı (Şekil 1D). Karaciğere yapılan kesitlerde çok sayıda pirinç tanesi şeklinde ve büyüklüğünde paraziter yapılara rastlandı (Şekil 1E). Bu yapıların karaciğere yapılan basınçla kesit yüzeyinden dışarı çıktığı görüldü. Karaciğer parenkiminin yoğun enfestasyon nedeniyle aşırı derecede tahrip olduğu belirlendi. Bu parazitlere akciğerde özellikle de kaudal loplarda ve serozaya yakın olarak rastlandı ancak bu parazitler karaciğere kıyasla oldukça az sayıda olduğu tespit edildi.



**Şekil 1.** Karın ve göğüs boşluğunda kanlı bir eksudat (A), Akciğer parankiminde hemorajik göç izleri (B), Karaciğer parankiminde hemorajik göç izleri (C), Karaciğerin kesit yüzünde hemorajik göç izleri (D), Olgunlaşmamış *C.tenuicollis*'ler (E)

**Figure 1.** A bloody exudate in the abdomen and chest cavity (A), Traces of hemorrhagic migration over lung parenchyma (B), Traces of hemorrhagic migration over liver parenchyma (C), Hemorrhagic migration marks over section of the liver (D), Immature *C.tenuicollis* cysts (E)

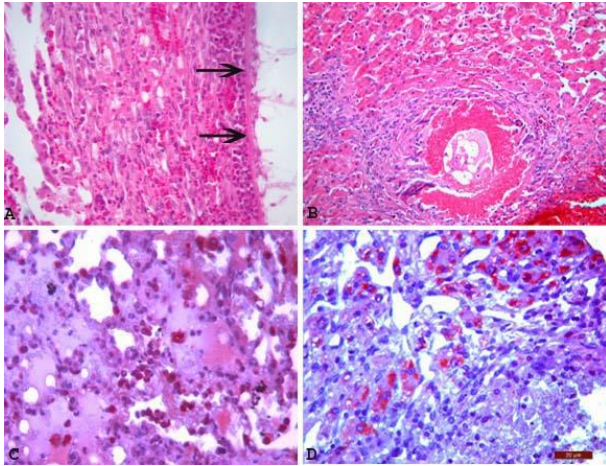


Yapılan nekropsi sonucu lezyonların bulunduğu karaciğer ve akciğer dokusunun bir kısmı parazitolojik muayene için %70'lik alkol içerisinde alındı. Söz konusu bu dokuların bir kısmı ise histopatolojik inceleme için %10'luk tamponlu formalin'de tespit edildikten sonra rutin doku takibi yapılarak parafin bloklara gömüldü. Her blokta 4 µm kalınlığında kesitler alınıp Hematoksin-Eozin (HE) boyandı. Immunhistokimyasal inceleme için adezivli lamlara alınan kesitler Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) yöntemiyle boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

Parazitolojik inceleme sonucunda karaciğer ve akciğer parenkiminden toplanan kistlerin 0.4-0.8 cm olduğu, henüz skoleks ve rostalar çekmenlerinin şekillenmemiş *C. tenuicollis*'e ait minyatür kistler olduğu tespit edilmiştir.

Mikroskobik olarak akciğer ve karaciğer kesitlerinde bu minyatür kistlere rastlandı (Şekil 2A). Bu minyatür kistlerin karaciğer parenkiminde oluşturduğu göç yollarında şiddetli kanama, yağlı dejenerasyon ve nekroz tespit edildi. Akciğerde lezyonlar çok hafif olmasına rağmen parazitin göç yollarında kırmızı kahverengi fokal odaklar, alveol lümeninde seropurulent bir eksudat ve hafif bir intersitisyel pnömoni tespit edildi. Karaciğer ve akciğerde ortada nekrotik kitle etrafında yabancı cisim dev hücre, makrofajlar, nötrofil lökosit ve eozinofil lökosit olmak üzere bir yangı kuşağı ile çevrili granülomlara rastlandı (Şekil 2B).

İmmunohistokimyasal incelemede hem akciğerde hemde karaciğerde S100 immunoreaktivitesi parazit granülomunun yangı kuşağında özellikle de nötrofil lökositlerde belirlenirken (Şekil 2C), İNOS immunoreaktivitesi ise en yoğun olarak parazitlere yakın makrofajlarda, nötrofil lökositlerde ve dev hücrelerinde gözlemlendi (Şekil 2D). Sonuç olarak parazitolojik ve histopatolojik inceleme sonunda akut hepatitis sistiserkoza tanısı konmuştur.



**Şekil 2.** Akciğerde kist duvarı (Oklar) ve etrafında mononükleer hücre infiltrasyonu (A), Karaciğerde Paraziter granülom H&E (B), Akciğerde Nötrofil lökositlerde S100 pozitif, Peroxidase (C), Karaciğerde makrofajlarda İNOS pozitif, Peroxidase, Bar:20 µm (D)

**Figure 2.** Wall (arrow) of lung cyst and around mononuclear cell infiltration (A), Parasitic granuloma in the liver, H & E (B) S100 in the lung positive in neutrophils leukocytes, Peroxidase (C), INOS in the liver positive in macrophages, peroxidase, Bar: 20 mm (D)

## TARTIŞMA ve SONUÇ

*Cysticercus tenuicollis*'in kronik formunun prevalansının tüm dünyada çok yaygın olduğu bilinmektedir (Soulsby 1982). Türkiye'de ruminantlarda *C. tenuicollis*'in %31.8-72.89 oranında değiştiği bildirilmiştir (Değer ve ark. 2001; Şenlik 2008). Buna karşın, akut hepatitis sistiserkoza ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır (Yıldırım ve ark. 2006). Rapor edilen çalışmalarda (Yıldırım ve ark. 2006; Koutsoumpas ve ark. 2013) hem karaciğer hem de akciğerde *C. tenuicollis* yoğun şekilde gözlenirken, bu çalışmada karaciğer lezyonları diğer vakalara göre daha şiddetli iken, akciğer lezyonlarının oldukça az olduğu gözlemlendi. Ayrıca kuzuda karın ve göğüs boşluğunda diğer çalışmalarda karşılaşılmayan kanlı bir eksudatın varlığı gözlemlendi.

Sistiserkozis'in gelişimini aydınlatmak için deneysel olarak yapılan çalışmalarda; etken verildikten sonraki 10-12. günlerde şiddetli karaciğer lezyonlarının olduğu, akciğer lezyonlarının ise ancak 15-20. günlerde meydana geldiği ve 30. günden sonra karaciğerde fibröz dokunun geliştiği bildirilmektedir (Pathak ve ark. 1982; Blazek ve ark. 1985). Yapılan farklı bir çalışmada (Nourani ve ark. 2010), hayvana etkenin verilmesinden 5-9 gün sonra ölmesi nedeniyle, akciğerde lezyona rastlanmadığı rapor edilmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, mevcut vakada, akciğer lezyonlarının diğer çalışmalardaki lezyonlara göre daha az olmasının ve karaciğerde bulunan lezyonların daha şiddetli olduğu göz önüne alınarak mevcut vakanın 14-15 lük bir enfestasyona bağlı olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda S100 proteininin parazit enfestasyonlarında, parazitin gelişmesine bağlı olarak kalsiyum bağlayıcı molekül olarak görev yaptığı ifade edilmektedir (Donato 1999; Beyaz ve ark. 2009). Bu çalışmada da makrofajlarda ve nötrofillerde S100 reaktivitesinin pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Beyaz ve ark. (2009) oluşturdukları deneysel *Eimeria tenella* enfestasyon çalışmasında, oositlerin etrafındaki makrofajlarda S100 reaktivitesi belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise az miktarda parazitlerin etrafında bulunan makrofajlarda daha yoğun olarak ise nötrofil lökositlerde S100 proteinleri tespit edildi.

İNOS immunoreaktivitesinin paraziter enfestasyonlarda arttığı bildirilmektedir (Lepoivre ve ark. 1991). *Malaria*, *Anaplasma* (Ergönül ve Aşkar, 2009), *Trichinosis* ve *Leishmaniasis*, *Theileria annulata* (Ayerdem ve ark. 2006), *D. filaria*, *Protostrongylus* spp., *M. capillaris* ve *C. ocreatus* akciğer kıl kurtlarının sebep olduğu verminöz pnömoni koyun akciğerlerinde konakçının savunma reaksiyonundan dolayı iNOS miktarının arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada da parazite ait kistlerin bulunduğu bölgelerdeki makrofajlarda İNOS immunoreaktivitesinin arttığı tespit edilmiştir.

Şenlik ve ark. (2008), Akut hepatitis sistiserkoza'nın en yoğun olarak 2 yaşındaki hayvanlarda görüldüğünü, 3 yaş ve üzeri hayvanlarda az sayıda alınan yumurtalara karşı sonradan kazanılan bağışıklık ile ilişkili olarak azaldığını, 0-1 yaşındaki hayvanlarda ise akut hepatitis sistiserkoza'nın görülmemesinin ya da çok az görülmesinin nedeninin maternal bağışıklık olabileceğini bildirmişlerdir. Edinilen literatür bilgisine (Pathak ve ark. 1982; Blazek ve ark. 1985; Şenlik ve ark. 2008; Nourani ve ark. 2010) göre 40 günlük bir kuzunun akut hepatitis sistiserkoza olması için çok sayıda etkeni alması gerekmektedir. Mevcut çalışmada da yapılan araştırmaları doğrular nitelikte çok akut bir enfestasyonun olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma ile tespit edilen akut hepatitis sistiserkoza olgusu sık karşılaşılan bir durum olmaması ve sadece nekropsi ile teşhis edildiğinden dolayı, bu durum dikkate alınmalı ve ayrıca akut hepatitis sistiserkoza'nın özellikle yeni doğan kuzularda çok patojen olabileceğini ve klinisyenlerin göz ardı etmemesi gerektiğini düşünülerek sunulması uygun görülmüştür.

## KAYNAKLAR

- Atalık KE, Doğan N (1997).** Nitrik oksit ve fizyolojik etkileri. *Genel Tip Derg*, 7 (3), 167-169.
- Ayerdem B, İnci A, Uyanık F, İca A, Çakmak A, Yıldırım A (2006).** Sığırlarda doğal *Theileria annulata* infeksiyonlarında monosit nitrik oksit düzeyleri. *Erciyes Univ Sağlık Bil Derg*, 15 (2), 116-121.
- Beyaz L, Atasaver A, Beyaz F, İca A (2009).** Immunohistochemical studies on S100 reactivity in chicks experimentally infected with *Eimeria tenella* 1: The Localization of S100 Protein and Its Subunits  $\alpha$  and  $\beta$  in Stages of *Eimeria tenella*. *Turk J Vet Anim Sci*. 33(2), 121-129
- Blazek K, Schramlova J, Hulinska D (1985).** Pathology of the migration phase of *Taenia hydatigena* (Palas, 1766) larvae. *Folia Parasit (Praha)*, 32, 127-137.
- Borak M (2013)** Verminöz pnömonili koyunlarda indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) protein ekspresyonunun immunhistokimyasal olarak belirlenmesi, *YYÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Van*.
- Değer S, Bicek K, Gul A, Eraslan E (2001).** Van yöresinde koyun keçi ve sığırlarda, *Cysticercus tenuicollis*'in yaygınlığı. *YYU Sağ Bil Ens Derg*, 7, 95-97.
- Donato R (1999).** Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta*, 1450, 191-231.
- Ergönül S, Aşkar TK (2009).** Anaplasmosisli sığırlarda ısı şok protein (HSP), Malondialdehit (MDA), Nitrik Oksit (NO) ve İnterlökin (IL-6, IL-10) düzeylerinin araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, (4), 575-579.
- John G Matthews (2009).** Diseases of the Goat, 3 rd. Edition, Blacwell publishing ltd. USA.
- Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (1993).** Pathology of Domesticated Animals, 4th Edition, Academic Press Limited, London.
- Koutsoumpas A, Psychas V, Papadopoulos E, Panousis N, Karatzias H, Giadinis ND (2013).** Acute visceral cysticercosis in feed-lot lambs. *Revue Méd Vét*, 164 (8-9), 425-428
- Lepoivre M, Feischi F, Coves J, Thelander L, Fontecave M (1991).** Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 179, 442-448.
- Livesey CT, Herbert IV, Willis JM, Evans WT (1981).** Acute cysticercosis in housed sheep. *Vet Rec*, 109, 217.
- Nourani H, Piralı Kheirabadi KH, Rajabi H, Banitalebi A (2010).** An unusual migration of *Taenia hydatigena* larvae in a lamb. *Trop Biomed*, 27, 651-656.
- Pathak K M, Gaur S N (1982).** The incidence of adult and larval stage *Taenia hydatigena* in Pradesh (India). *Vet Parasitol*, 10, 91-95.
- Payan-Carreira R, Silva F, Rodrigues M, Anjos Pires M (2008).** *Cysticercus tenuicollis* ve sicle in fetal structures: Report of a case. *Reprod Dom Anim*, 43, 764-766.
- Radfar MH, Tajalli S, Jalalzadeh M (2005).** Prevalence and morphological characterization of *Cysticercus tenuicollis* (*Taenia hydatigena* cysticerci) from heepand goats in Iran. *Vet Arhiv*, 75 (6), 469-476.
- Soulsby EJJ (1982).** Helminths, Arthropods and Protozoa of domesticated animals, 7th Edition, Bailliere Tindall, London.
- Şenlik B (2008).** Influence of hostbreed, sexandage on the prevalence and intensity of *Cysticercus tenuicollis* in sheep. *J Anim Vet Adv*, 7 (5), 548-551.
- Yıldırım A, İca A, Beyaz L, Atasaver A (2006).** Acute hepatitis cysticercosa and pneumonitis cysticercosa in a lamb: casereport. *Acta Parasitol Turc*, 30, 108- 111.