

Kuzu ve Oğlaklarda Kriptosporidioziste Patolojik ve İmmunohistokimyasal Bulgular

Özlem ÖZMEN¹, Nilay SERPİN¹, Keivan JAMSHIDI²

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Burdur

²Islamic Azad University, Gamsar, Branch, Tehran, Iran

Geliş Tarihi: 29-03-2016 Kabul Tarihi: 01-04-2016

Makale Kodu: 5000183453

ÖZET

Kriptosporidiozis *Cryptosporidium spp.* tarafından oluşturulan zoonotik bir protozoon hastalığıdır. Neonatal dönemdeki ruminantlarda ishal ve yüksek morbidite ile seyreder. Bu çalışmanın materyalini ishal, iştahsızlık, depresyon, gelişim geriliği ve ölüm şikayetiyle getirilen ve yaşları 1-14 gün arasında değişim gösteren 10 kuzu ile 17 oğlak, toplam 27 hayvan oluşturdu. Bu çalışmada kriptosporidiozis saptanan kuzu ve oğlaklardaki makro ve mikro patolojik lezyonlar ile immunohistokimyasal bulgular değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Kuzu, Kriptosporidiozis, oğlak, patoloji.

PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FINDINGS IN LAMBS AND KIDS WITH CRYPTOSPORIDIOSIS

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a zoonotic disease caused by the protozoan parasite *Cryptosporidium spp.* In newborn ruminants, cryptosporidiosis is characterized by diarrhea and high morbidity. Materials of this study consisted of 17 kids and 10 lambs totally 27 animals with diarrhea, anorexia, depression, growth retardation and death in 1-14 days old. In this study macroscopical and microscopical pathological lesions and immunohistochemical findings in lambs and kids with Cryptosporidiosis were evaluated.

Keywords: Cryptosporidiosis, kid, lamb, pathology.



İletişim / Correspondence

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstiklal Yerleşkesi, TR 15030
Burdur TÜRKİYE



0248 213 21 70



ozlemozmen@mehmetakif.edu.tr

GİRİŞ

Neonatal dönemdeki küçük ruminantların ölüm sebeplerinin başında ishal ve buna bağlı hastalıklar gelir ve bu dönemdeki hastalık tablosu 'Neonatal Diyare Sendromu' olarak isimlendirilir. Kriptosporidiozisin kuzu ve oğlakların neonatal diyare sendromu etiolojisinde önemli bir ajan olarak rol aldığı bilinmektedir (1-3). *Cryptosporidium spp.*, insan ve hayvan hekimliğinde önemli olan ve omurgalı türlerde gastroenteritise sebebiyet veren apikompleks protozoon bir parazittir ve küçük ruminantlarda yüksek prevalansa sahiptir (4-6). Kriptosporidiosis; birçok evcil ve yabani hayvanın yanı sıra insan, balık, kuş ve sürüngenlerde enfeksiyona sebep olur (7,8). Bu hastalık özellikle AIDS hastalarında ve immün sistemi deprese kişilerde ciddi morbidite ve hatta mortaliteye neden olabilir (9-11). Memelilerde mide-bağırsak kanalının yanı sıra solunum sistemi yüzey epitelinde de yerleşim gösterebilir (12,13). Hücre içi bir protozoon olan *Cryptosporidium* ilk kez 1907 yılında tanımlanmıştır (14). *Cryptosporidium*'un en az 22 türü olduğu bilinmesine rağmen, konak predileksiyonu, parazit morfolojisi veya enfeksiyon yerine göre isimlendirilmiş sadece 13 türü kabul edilmektedir (15). *Cryptosporidium parvum* insanlar da dahil tüm memeli hayvanlarda en çok bildirilen türdür (16,17). Etkenler konakçıda 2-6 μm ve çapında hücre membranıyla çevrili vakuoller içinde gözlenir (12).

Zoonoz bir enfeksiyon olan kriptosporidiosis, hayvanlarla teması olan insanlara doğrudan bulaşabildiği gibi kontamine yiyecek, içecek ve su tüketimiyle de bulaşabilir (9). Kriptosporidiosis dünya çapında yaygın bir hastalıktır (18-20).

Bu çalışmada 1-14 günlük kuzu ve oğlaklarda saptanan kriptosporidiosis olgularında patolojik ve immünistokimyasal bulguların incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın materyalini ishal, iştahsızlık, depresyon, gelişim geriliği ve ölüm şikayetiyle Anabilim Dalımıza getirilen ve yaşları 1-14 gün arasında değişen 10 adet kuzu ile 17 adet oğlak toplam 27 hayvan oluşturdu. Hastalıkların kesin tanısının konulabilmesi için hayvanların tümünün nekropsi ve histopatolojik yoklamaları yapıldı.

Nekropsi sırasında tüm hayvanların bağırsak içerikleri alınarak *Cryptosporidium spp.* etkenlerinin varlığı için Karbol fuksin ile boyanarak 100x objektif altında immersiyon yağı damlatılarak incelendi. Tüm organlardan ve özellikle bağırsaklardan alınan doku örnekleri %10'luk formaldehid içerisinde tespit edildi. Rutin Patoloji prosedüründen geçirilen dokular parafine bloklandı. Bloklardan rotary mikrotom ile 5 μm kalınlığında alınan kesitler, hematoksilin-eozinle (HE) boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

İmmunohistokimyasal incelemeler için parafin bloklardan 5 μm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara çekilerek 1 gece kurumaya bırakıldı. Deparafinize ve rehidrete edilen kesitler nonspesifik zemin boyamasını önlemek için % 0,5'lik hidrojen peroksit-metilen solüsyonunda 10 dakika inkübe edildi. Ardından 0.01M (pH 6.0) sitrat tampon solüsyonunda 5'er dakikadan iki kez toplam 10 dakika mikrodalga fırında kaynatıldı. Daha sonra normal serum ile 10 dakika inkübe edildi. Fazla serum uzaklaştırıldıktan sonra kesitler kriptosporidium etkenleri için *Cryptosporidium* [Novo Castra (NCL-Crypto), Newcastle- UK] primer serumu ile 25°C'de 60 dakika inkübe edildi. PBS ile iki kez yıkandıktan sonra biotinli sekonder antikor ile 10 dakika inkübe edildikten sonra PBS ile iki kez yıkandı ve streptoavidin biotin peroksidaz ile 10 dakika inkübe edildi. Ardından kromojen olarak DAB (3,3'-diaminobenzidine) ile ve sonrasında Mayer's

hematoksilen ile boyandı. Dehidrate edilen kesitler lamel ile kapatılarak mikroskop altında incelendi.

BULGULAR

Mortalite oranı % 30-50 arasında değişiyordu ve birden fazla etkenin bulunduğu olaylarda oran yüksek olarak saptandı. Hijyen ve yönetim morbidite ve mortalite oranları üzerinde oldukça önemli faktörlerdi. Kriptosporidiumlar en erken üç günlük yavrularda saptandı. Hasta sahipleri ishalleri kuzu

gözlendi. Abdominal şişkinlik sık gözlenen bulgulardandı. Karın boşluğu açıldığında bağırsakların sarımsı renkli sulu bir içerik ve gaz ile şişkinleştiği dikkati çekti (Resim 1). Mezenteriyel damarlar hiperemikti. Özellikle yeyunum ve ileum serozalarında ödem gözlendi. Mezenteriyel lenf düğümlerinin büyümüş ve kesit yüzleri ödemliydi. Bazı hayvanlarda dışkı sindirilmemiş süt ve mukus ile bağırsak mukozasında kanamalar dikkati çekti. Kanamalara birçok hayvanda abomazumda da rastlandı.



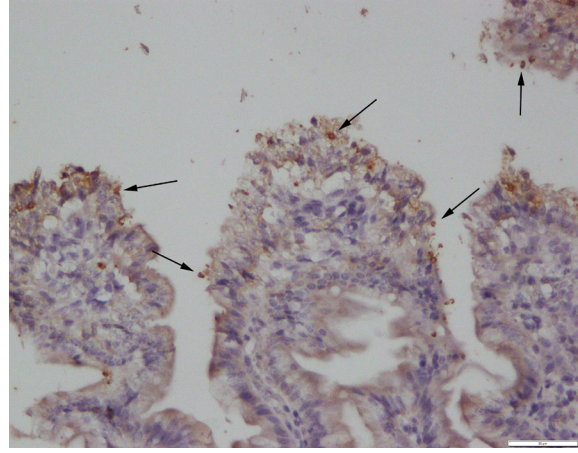
ve oğlakların hastalıkları süresince depresif ve emmede isteksiz olduklarını ifade ettiler. En belirgin klinik semptomlar dehidrasyon, tenesmus, karın şişkinliği, hipotermi ve ölümdü. Kriptosporidiozis olaylarında sulu ve sarımsı -yeşil bir ishal en belirgin bulguydu. Nekropsi sırasında hayvanların dehidre olduğu ve anüs bölgesinin sarımsı renkli ve sulu kıvamlı bir dışkı ile kirlenmiş olduğu

Resim 1: Kriptosporidiozisli bir oğlağın bağırsaklarının nekropsideki görünümü.

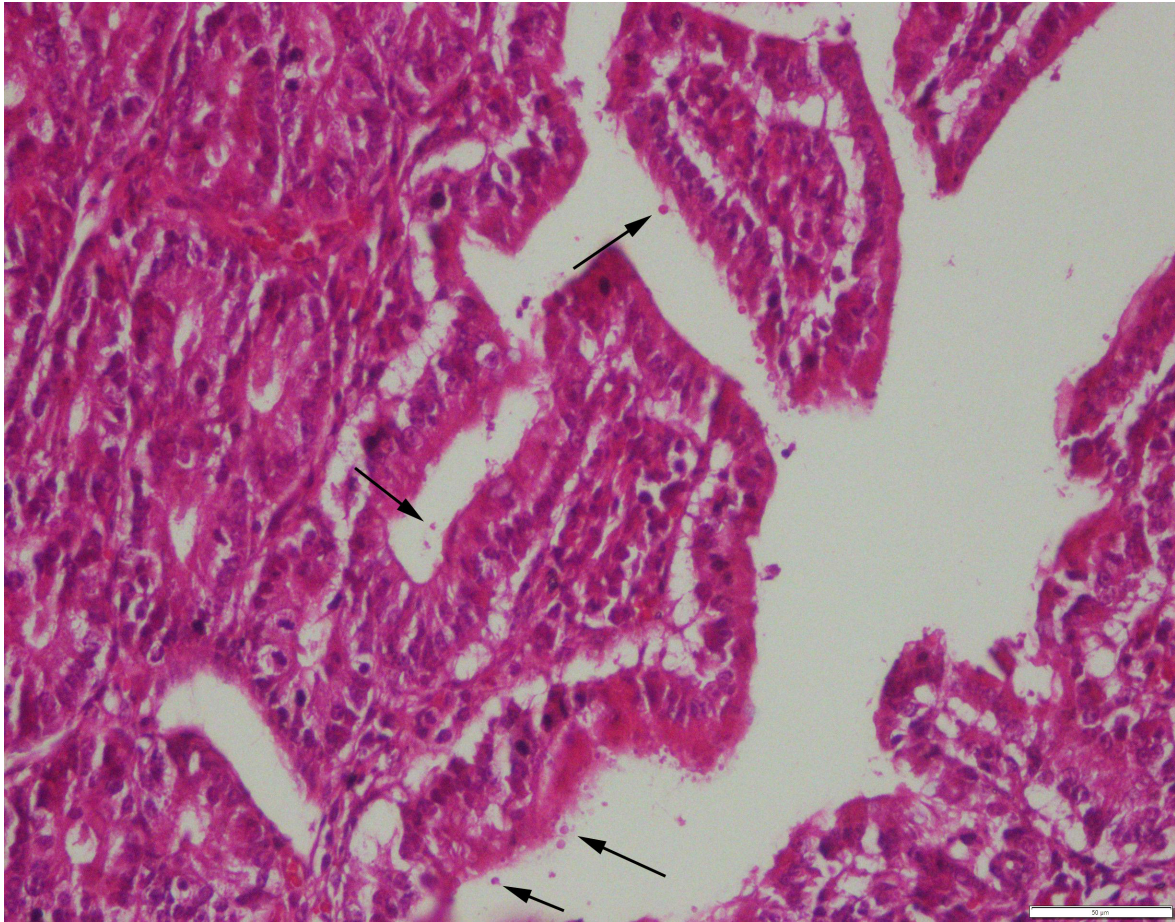
Mikroskopik olarak en belirgin lezyonlar damarlarda hiperemi, submukozada ödem, deskuamasyon, erozyon, ülserler ve mukozada yangısal hücre infiltrasyonlarıydı ve bu bulgular incelenen bütün hayvanlarda göz-

lendi. Bağırsak mukozasında mukus artışı sık gözlenen bulgulardandı. Bağırsakların mikroskopik incelemesinde villusların kütleştiği ve yer yer kaynaştığı dikkati çekti. Epitel hücrelerine yapışık şekilde mukozal yüzeyi kaplayan çok sayıda etkene rastlandı (Resim 2). Yer yer epitel hücrelerinin deskuame olarak döküldüğü gözlemlendi. Kriptosporidial enterit olaylarında özellikle şiddetli olaylarda epitel hücrelerinin parçalandığı ve oosistlerin lümeninde serbest hale geldiğine sıklıkla rastlandı. Kriptosporidiozis en fazla yerleştiği bağırsak bölümünün ileum olduğu gözlemlendi. Villöz atrofinin yanı sıra Lieberkühn kript epitellerinde hipertrofi saptandı. Propria mukozada yaygın yangısal hücre infiltrasyonlarına rastlandı.

İmmunohistokimyasal incelemede ince bağırsak epitellerine tutunmuş halde ve serbest şekilde kriptosporidium etkenleri kahverengi boyalı şekilde gözlemlendi (Resim 3).



Resim 3: *Cryptosporidium parvum* etkenlerinin (oklar) immunohistokimyasal olarak boyandıktan sonraki görünümü, Streptavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=50 µm.



Resim 2: *Cryptosporidium parvum* (oklar) etkenlerinin bağırsaklarda yerleşiminin mikroskopik görünümü, HE, Bar=50 µm.

TARTIŞMA

C. parvum, genellikle etken olarak 1-2 haftalık kuzu ve oğlaklarda ishale ve ölümlere sebep olur. İshal şiddetli, sulu ve sarımsı renktedir. Dışkıda sindirilmemiş süt, kan, fibrin ve mukus bulunabilir. Orta şiddette dehidrasyon, hafiften orta şiddete kadar değişebilen depresyon, tenesmus ve hafif ateş sık gözlenen bulgulardandır. Kronik enfekte yavrularda zayıflama şekillenir. Hastalık tipik olarak yüksek morbidite ve düşük mortalite ile seyreder. Komplike olmayan olayların çoğu 6-10 gün içerisinde iyileşir ancak otoreenfeksiyonlar sık gözlenir (7,8,17). Benzeri klinik semptomlar bu çalışmada kriptosporidial enteritis olaylarında gözlemlendi. Morbidite ve mortalite oranları çoğu olayda oldukça yüksek bulundu ve şiddetli klinik semptom gösteren hayvanlar arasında mortalite oranı yüksek olarak tespit edildi. Bu olayın muhtemel sebebi hijyenik kurallara uyulmaması ve değişik yaştaki hayvanların aynı sürü içinde yetiştirilmesi olarak saptandı. Yaşlı hayvanlar yavrular için taşıyıcı görevi üstleniyorlardı.

Cryptosporidium spp. bağırsak epitelinde mikrovillusları enfekte eder ancak sitoplazmanın içine girmez. Organizmanın etrafında konakçı tarafından bir membran oluşturur ve bu onu antibiyotiklerin etkisinden korur. Koksidiyal oositlerin tersine *C. parvum* oositleri dışkıya geçtiklerinde zaten sporlanmışlardır ve infektiftirler (7,8). Bu çalışmada saptanan bulgular önceki çalışmalarla büyük oranda benzerlik gösterdi. Kriptosporidiumların çoğu intestinal epitel hücrelerine tutunmuş şekilde bazıları ise lümeninde serbest haldeydi. Bağırsak epitellerinde deskumasyon ile propria mukozada yangısal hücre infiltrasyonlarına rastlandı.

Bulaşma bir hayvanın sporlanmış oositleri ağız yoluyla almasıyla oluşur. Enfeksiyon villus atrofisine ve kript hücre hiperplazisine yol açar. İshal malabsorbsiyon ve

maldigesyon ve artmış sekresyon nedeniyle şekillenir (7,8). Bu çalışmada incelenen olaylarda hastalık genellikle çok şiddetli ve akut bu nedenle villus atrofisi ve kript hücre hiperplazisi gibi kronik değişikliklere pek rastlanmadı. *Cryptosporidium* ile şiddetli enfekte hayvanlarda villusların tamamen bu organizmalar ile kaplı oldukları histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak belirlendi. İshal sonucu şekillenen dehidrasyon en önemli ölüm sebebiydi.

Kriptosporidiosis neonatal ruminantların önemli problemlerindedir. *C. parvum* buzağı, kuzu ve oğlaklarda neonatal enteritislerin önemli etiyolojik faktörlerinden birisidir ve ekonomik kayıpların direkt veya indirek sebeplerindedir (19,21). Angus ve ark. (18) kriptosporidiosis İngiltere’de buzağılarda ishale sebep olan ikinci önemli ajan olduğunu rapor etmiştir. Kuzular arasında salgınlar sporadik olarak şekillenmesine rağmen mortalite yüksek olabilir. *C. parvum* konakçı spesifik değildir buzağılardan atılan oositler aynı çevrede otlayan kuzular tarafından alındığında da enfeksiyon oluşturabilirler. Buzağılarda neonatal ishallerle ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır ancak kuzu ve oğlakların neonatal enteritlerindeki çalışmalar nispeten kısıtlıdır (19,22-24). Etiyolojik faktörler ile ilgili incelemeler sınırlıdır (25,26). Bu çalışma da göstermiştir ki kriptosporidiosis neonatal enteritisli kuzu ve oğlaklarda da önemli etkenlerden birisidir. Bu hastalık koyun ve keçi endüstrisinde önemli kayıplara sebep olmaktadır. *C. parvum* küçük ruminantların neonatal enteritislerinde özellikle hijyenik faktörlere uyulmayan ve kalabalık çiftliklerde önemli bir etiyolojik faktör olarak tespit edildi.

Abomasal kanamalar bu çalışmada büyükün kriptosporidial enteritisli hayvanlarda gözlemlendi. Bu durumun muhtemel sebebinin olaylara karışan *E. coli* gibi diğer bakteriyel

enfeksiyonlar sonucunda olabileceği düşünüldü. Fakat *C. parvum* olaylarında bu bulgu sıklıkla dikkati çekti. Kanamalara ilaveten kriptosporidiozis olaylarında hiperemi ve ödem sürekli gözlemlendi.

Bu çalışmanın sonucunda *C. parvum*'un neonatal kuzu ve oğlak ishallerinde önemli bir etken olduğu gözlemlendi. *Cryptosporidium* oosistlerinin taze dışkının natif muayenesi ile saptanabileceği ancak Carbol-fuchsin boyalı preparatlarda daha kolay saptanabileceği gözlemlenmiş özellikle hastalığın hızlı teşhisinde boyamanın önemli olduğu görüldü. Histopatoloji ve immunohistopatolojinin teşhisi doğrulamakta kullanılabilecek diğer metotlar olduğu gözlemlendi.

KAYNAKLAR

1. Dumanlı N, Karaer Z. Veteriner Protozooloji, p. 155, Ankara: Medisan; 2010.
2. Tzanidakis N, Sotiraki S, Claerebout E, Ehsan A, Voutzourakis N, Kostopoulou D, Stijn C, Vercruyse J, Geurden T. Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheep and goats reared under dairy husbandry systems in Greece. *Parasite*. 2014;21:45.
3. Wilhelm CL, Yarovinsky F. Apicomplexan infections in the gut. *Parasite Immunol*. 2014; 36:409–20.
4. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microb Rev*. 2013; 26(1):115-34.
5. Wang R, Li G, Cui B, Huang J, Cui Z, Zhang S, Dong H, Yue D, Zhang L, Ning C, Wang M. Prevalence, molecular characterization and zoonotic potential of *Cryptosporidium* spp. in goats in Henan and Chongqing, China. *Exp Parasitol*. 2014; 142:11–6.
6. Romero-Salas D, Alvarado-Esquivel C, Cruz-Romero A, Aguilar-Domínguez M, Ibarra-Priego N, Merino-Charrez JO, Pérez de León AA, Hernández-Tinoco J. Prevalence of *Cryptosporidium* in small ruminants from Veracruz, Mexico. *BMC Vet Res*. 2016; 12 (14): 1-6.
7. Van Kruiningen HJ. Gastrointestinal system. In: Carlton WW, McGavin DV, editor. Thomson's Special Veterinary Pathology. p.44-45. Missouri: Mosby Publishing; 1995.
8. Jones TC, Hunt RD, King NW. Diseases due to protozoa. In: Jones TC, Hunt RD, King NW, editors. *Veterinary Pathology*, p.575-581. Pennsylvania: Williams & Wilkins Company; 1997.
9. Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 2004; 126(1-2): 37-56.
10. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(1): 145-54
11. Rossle NF, Latif B. *Cryptosporidiosis* as threatening health problem : a review. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013; 3:916–24.
12. Milli ÜH, Hazıroğlu R. Veteriner Patoloji, p.137. Ankara: Medipres; 2000.
13. Thompson RC, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijjawi NS. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv Parasitol*. 2005;59:77–158
14. Fahey T. *Cryptosporidiosis*. Primary Care Update for OB/GYNs 2003; 10(2): 75-80
15. Morgan U, Weber R, Xiao L, Sulaiman I, Thompson RC, Ndiritu W, Lal A, Moore A, Deplazes P. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected

- individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1180–3.
16. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4:325–58.
17. Santín M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *N Z Vet J.* 2013; 61: 1–10.
18. Angus KW, Appleyard WT, Menzies JD, Campbell I, Sherwood D. An outbreak of diarrhoea associated with cryptosporidiosis in naturally reared lambs. *Vet. Rec.* 1982; 110:129-130.
19. Graaf DC, de Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbasi H, Peeters JE. A review of the importance of cyrptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasit.* 1999; 29:1269-87.
20. Li P, Caib J, Caia M, Wua W, Li C, Lei M, Xua H, Fenga L, Maa J, Fenga Y, Xiaoc L. Distribution of *Cryptosporidium* species in Tibetan sheep and yaks in Qinghai, China. *Vet Parasitol.* 2016; 215:58–62.
21. Ye J, Xiao L, Wang Y, Wang L, Amer S, Roellig DM, Guo Y, Feng Y. Periparturient transmission of *Cryptosporidium xiaoi* from ewes to lambs. *Vet Parasitol.* 2013;197: 627–633.
22. Naylor JM. Diarrhea in neonatal ruminants. In: Smith BP, editor. *Large Animal Internal Disease.* p. 348-353. Missouri: Mosby Publishing; 1990.
23. Xiao L, Herd RP. Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Vet Parasitol.* 1994;55: 257-62.
24. O’Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Olson ME. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhoe. *JAVMA.* 1999; 214: 391-6.
25. Collinet-Adler S, Babji S, Francis M, Kattula D, Premkumar PS, Sarkar R, Mohan VR, Ward H, Kang G, Balraj V, Naumova EN. Environmental factors associated with high fly densities and diarrhea in Vellore, India. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81(17):6053–8.
26. Maurya PS, Rakesh RL, Pradeep B, Kumar S, Kundu K, Garg R, Ram H, Kumar A, Banerjee PS. Prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* spp. infection in young domestic livestock in India. *Trop Anim Health Prod.* 2013; 45:941–6.