

Şap Hastalığının Miyokardiyal Formundan Ölen İki Kuzuda Kalp ve Dilde Gözlenen Patolojik Bulgular

Mustafa Kemal ÇİFTÇİ¹

Muammer İNANÇ²

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Konya

²Veteriner Kontrol Enstitüsü, Konya
muammerinanc@gmail.com

Öz

Şap hastalığının (FMD) morbiditesinin çok yüksek olması nedeniyle salgınların önüne geçilebilmesi ve kayıpların azaltılmasında hızlı teşhis, özellikle hastalığın ilk çıkışında son derece önemlidir. Bu nedenle çalışmada, şap hastalığının miyokarditis formu sonucu ölen 2 adet kuzuda kalp ve hastalığın teşhisine katkı sağlaması amacıyla makroskopik bir lezyon olmamasına rağmen dilden de örnekler alınmış ve histopatolojik metotlarla incelenmiştir.

Bu maksatla Şap Enstitüsü (Türkiye) tarafından FMDV serotip A Nepal-84 suşu enfeksiyonundan öldüğü belirlenen 2 adet kuzuda gözlenen makroskopik bulgular kaydedilerek, histopatolojik ve immunohistokimyasal (IHC) yöntemlerle incelendi. Kalp kasında makroskopik ve mikroskopik olarak şap hastalığına işaret patolojik lezyonlar gözlemlendi. IHC boyamalarda da makrofajlar ve miyositlerde FMDV serotip A Nepal-84 (G-VII) yönünden antijen pozitiflik belirlendi. Dilde ise histopatolojik olarak stratum spinosum hücrelerinde vezikül oluşumunun başlangıcına işaret eden belirgin bir hidropik dejenerasyon gözlemlendi. Bu bulgular şap hastalığının histopatolojik teşhisinde miyokarditis bulgularına önemli derecede destek sağlayacak bulgulardır. Böylece miyokarditis formuna ilgili ölümlerde her ne kadar makroskopik düzeyde vezikül oluşumu gözlenmiyorsa da histopatolojik incelemeler için dilden de örnek alınmasının teşhis için katkılı olacağı anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Histopatoloji, immunohistokimya, şap hastalığı.

The Pathologic Findings in Heart and Tongue in Two Lambs Died from Myocardial Form of Foot and Mouth Disease

Abstract

Rapid diagnosis is crucial to prevent and control outbreaks, especially at the first appearance of the disease, due to the high morbidity of foot-and-mouth disease (FMD). In this study, samples from two lambs which were determined to have died due to myocarditis form of FMD, and to contribute to the diagnosis of the disease their tongues without macroscopic lesions were investigated by histopathological methods.

For this purpose, macroscopic findings were recorded from two lambs which were determined to have died due to FMDV serotype A Nepal-84 strain infection by the Şap Institute (Turkey). Also, samples from two lambs were examined by histological and immunohistochemical (IHC) methods. Macroscopic and microscopic lesions that signs of foot-and-mouth disease were observed in the heart. By IHC staining, macrophages and monocytes were evaluated as antigen positive for FMDV serotype Nepal-84 (G-VII). Histopathologically, significant hydropic degeneration was observed in the stratum spinosum cells of tongue indicating the onset of vesicle formation. These findings are important findings in the histopathological diagnosis of FMD that will provide important support for myocarditis findings. Thus, although vesicle formation is not observed at the macroscopic level in the deaths related to the myocarditis form, it has been understood that taking the sample for the histopathological examinations will contribute to the diagnosis.

Keywords: Histopathology, immunohistochemistry, foot and mouth disease.

Bu yayın, Selçuk Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (Proje numarası: 17202003) desteklenen yüksek lisans tezinden faydalanarak hazırlanmıştır.

Giriş

Şap hastalığı (foot and mouth disease: FMD) ülkeler arası canlı hayvan ve hayvansal ürün ticaretini olumsuz yönde etkileyen, büyük ekonomik kayıplara neden olan, evcil ve vahşi ruminantların akut ve çok bulaşıcı viral bir hastalığıdır (Terpstra, 1972; Dinter ve Morein, 1990). Şap virüsü *Picornaviridae* ailesinden bir *Aphthovirus*'tür. Virusün A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 ve Asia-1 olmak üzere 7 adet farklı serotipi ve her serotipin çok sayıda topotip/genotipi vardır (Mann ve Sellers, 1990). Etken pH 7-9 arasında stabil olmakla birlikte en dayanıklı olduğu pH değerleri 7.4-7.6 arasındadır (Sobrin ve ark., 1986; Steinhauer ve Holland, 1987; Aftosa, 2007). Dünya üzerinde en yaygın olanları A ve O tipleridir. C tipi ise Hindistan ile sınırlıdır. Asia-1 genelde güney Asya'da, SAT serotipleri (SAT1, SAT2 ve SAT3) ise Afrika'da bulunmaktadır (Knowles ve Samuel, 2003).

Enfekte ve duyarlı hayvanlar arasında en yaygın bulaşma şekli aerosol ve doğrudan temas ile bulaşmadır (Donaldson ve ark., 1987). Virus enfekte hayvan hareketleri, kontamine hayvan ürünleri ve ekipmanların nakli, yetiştirici ziyaretleri ve rüzgâr gibi çeşitli durumlarla kolaylıkla yayılır. Hastalığın çok bulaşıcı olması nedeniyle geniş hayvan popülasyonları etkilenir. Süt veriminde azalma, hayvanların gelişmesinde gerileme, gebe hayvanlarda yavru atma, genç hayvanlarda ani ölümler görülür (Lubroth, 2002). Hayvan ve hayvansal ürünlerin ticaretinin engellenmesi, uluslararası ticarete önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Dukpa ve ark., 2011). Şap hastalığından etkilenen hayvanlar solunum, deri, sekret ve ekskretleri ile virüs saçarlar. Bu durum epidemiyolojik yönden önemlidir (Dinter ve Morein, 1990; Dekker ve ark., 1997).

Virüs nazofaringeal dokularda ve yumuşak damakta çoğalarak viremiye neden olur ve kan yoluyla ağız boşluğu, özellikle de dil, interdijital bölge ve meme dokusu başta olmak üzere birçok doku ve organa yerleşerek hastalığın en önemli klinik belirtisi olan vezikül oluşumuna neden olur (Donaldson ve ark., 1987; Woodbury ve ark., 1995; Monaghan ve ark., 2005; Windsor ve ark., 2011). Şap hastalığı virüsü replikasyonu kalpte yüksek seviyelerde gerçekleşmekte ve viremi döneminde genç ve duyarlı hayvanlarda virüs kalp kasında ve iskelet kasında dejenerasyon ve nekrozlara neden olarak ani ölümler görülmektedir (Gulbahar ve ark., 2007). Miyokarditis formu viremi döneminde ve per akut/akut seyirli olduğundan genellikle vezikül oluşumu şekillenmeden ölümler görülmektedir (Lubroth, 2002). Viremi döneminde virusün etkisi ile Str. spinozum hücreleri şişer ve sitoplâzmaları eozinofilik bir hal alır ve bu hücrelerin akontolizisi sonucu mikroskobik veziküller, bunların birleşmesi ile makroskobik veziküller oluşur (Kitching ve Alexandersen, 2002).

Şap hastalığında morbitide oranı %100'e kadar varabilir. Mortalite ise yetişkin hayvanlarda %1 veya %2 gibi düşük olmasına karşın, genç hayvanlar ile hastalıktan ari bölge hayvanlar hastalığa daha duyarlı olduklarından %20'nin üzerindedir (Radostits, 1994; Lubroth, 2002; Aftosa, 2007). Genç ve duyarlı hayvanlarda miyokarditise ilgili oluşan ölümlerde miyokartta, özellikle sol ventrikülüs ile musculus papillarilerde hiperemi ile çevrili solgun ve nekrotik odaklar görülür (Milli, 2000; Alexandersen ve ark., 2003). Bu değişiklik şap hastalığının miyokardiyal formuna ilgili ölümlerde patognomik bir bulgudur (Aftosa, 2007; Çiftçi ve ark., 2015). Ayrıca nekropside kanda pıhtılaşma bozuklukları, akciğerde hiperemi, ödem, trake ve bronşlar içerisinde köpüklü bir sıvı, karaciğer ve böbrekte hiperemi görülür (Alexandersen ve ark., 2003).

Materyal ve Metot

Çalışma materyalini, Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne şap hastalığı şüphesi ile getirilen ve Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nce FMDV serotip A NEPAL-84 (G-VII) şusu tespit edilen, 2 adet kuzu oluşturdu. Ölü olarak getirilen kuzuların sistematik nekropsileri yapılarak gözlenen makroskopik bulgular kaydedilerek, kalp ve dilden örnekler alındı. Alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edilip, alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafinde bloktandı. Parafin doku bloklarından mikrotom (Leica RM2245) ile 4µm kalınlığında alınan kesitler Hematoksilen-Eosin (H-E) yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) incelendi. Karakteristik makroskopik ve mikroskopik bulgulardan fotoğraflar çekilerek dijital ortama aktarıldı (Olympus DP12, Microscopic Digital Camera Systems, Tokyo, Japonya).

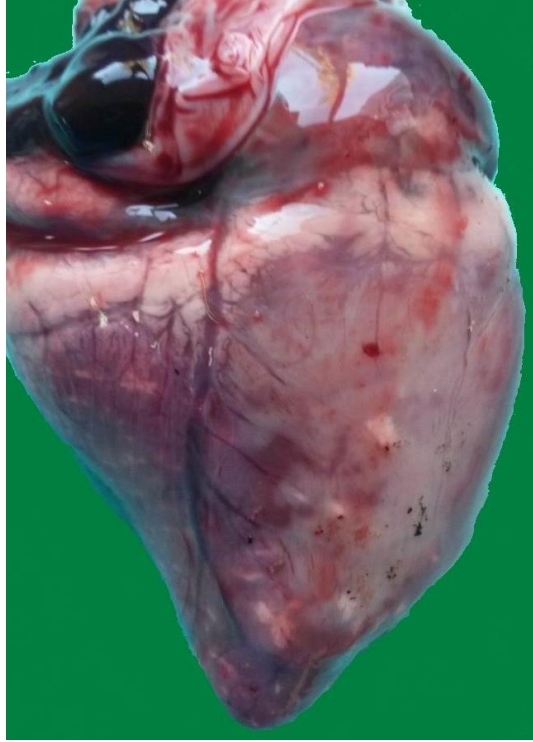
İmmünohistokimyasal İncelemeler

Şap hastalığı virusünün (FMDV) immünohistokimyasal olarak doğrulanması amacıyla, kalp dokusundan polysine lamlara 4µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler, 15 dk. 60 °C'lik etüvde kurutuldu. İmmünohistokimyasal boyama ultra view universal DAB detection kit (DAB İnhibitör %3 H₂O₂, HRP Multimer ≤50 µg/mL, DAB Chromogen %0.2 DAB, DAB H₂O₂ %0.04 H₂O₂, DAB Copper CuSO₄ 5g/L), Hemotoylin 25 mL (≤%48), Bluing Reagent 25 ml (0.1M Li₂CO₃, 0.5M Na₂CO₃), EZ Prep, LCS, SSC, Reaction Buffer, CC1, CC2 solüsyonları kullanılarak, Ventana Benchmark® XT cihazı ile otomatik olarak yapıldı. Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nden (Ankara, Türkiye) temin edilen primer (anti-rabbit Nepal-84 poliklonal antikor) 1/350 oranında sulandırılarak uygulandı. Boyamada kullanılan negatif kontroller de primer antikor yerine normal Antibody Diluent kullanılarak aynı prosedüre göre boyandı.

Kesitler dereceli alkol serilerinden %76, %80, %96 ve ksilolde 5 dakika bekletilerek kimyasallardan temizlendi. Lam üzerlerine otomatik kapatma cihazı (Leica CV5030) ile lameller yapıştırıldı. Boyanan tüm kesitler ışık mikroskopunda değerlendirildi.

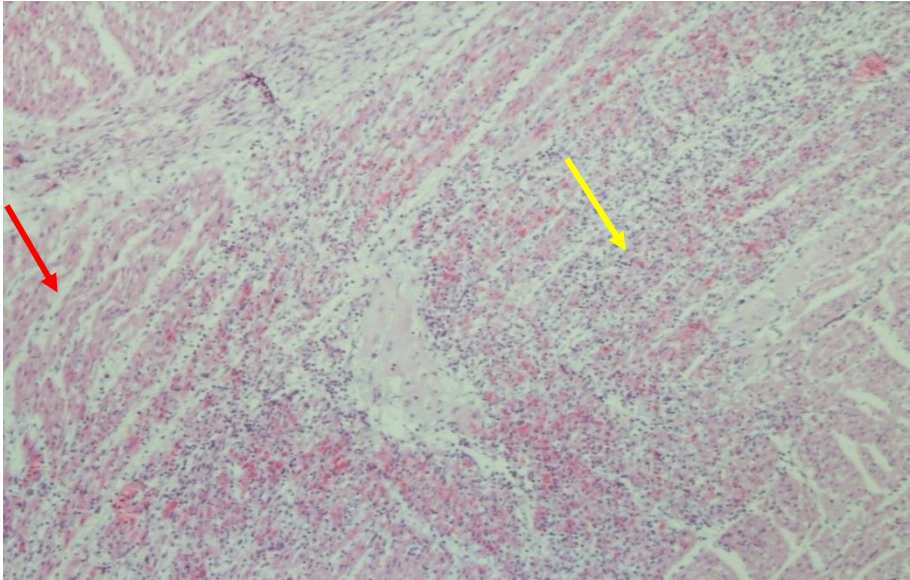
Bulgular

Makroskopik olarak olguların, kalp ve dilleri ayrıntılı olarak incelendi. Olgulara ait en belirgin makroskopik bulgular kalpte gözlemlendi. Sol ventrikuslarda daha yaygın ve belirgin olmak üzere epikartta, miyokarta ve musculus papillarislerde etrafı hiperemik bir çizgi ile çevrili değişik büyüklükte solgun alanlar dikkati çekti (Şekil 1). Hem sol ve hem de sağ ventriküler boşluğu dolduran kan pıhtısı görüldü. Dilde makroskopik bir lezyon görülmedi. Akciğerlerin hiperemik, daha ağır ve volümünöz olduğu, trake ve bronşlar içerisinden köpüklü bir sıvının geldiği, karaciğer ve böbreklerde ise belirgin bir konjesyon görüldü.

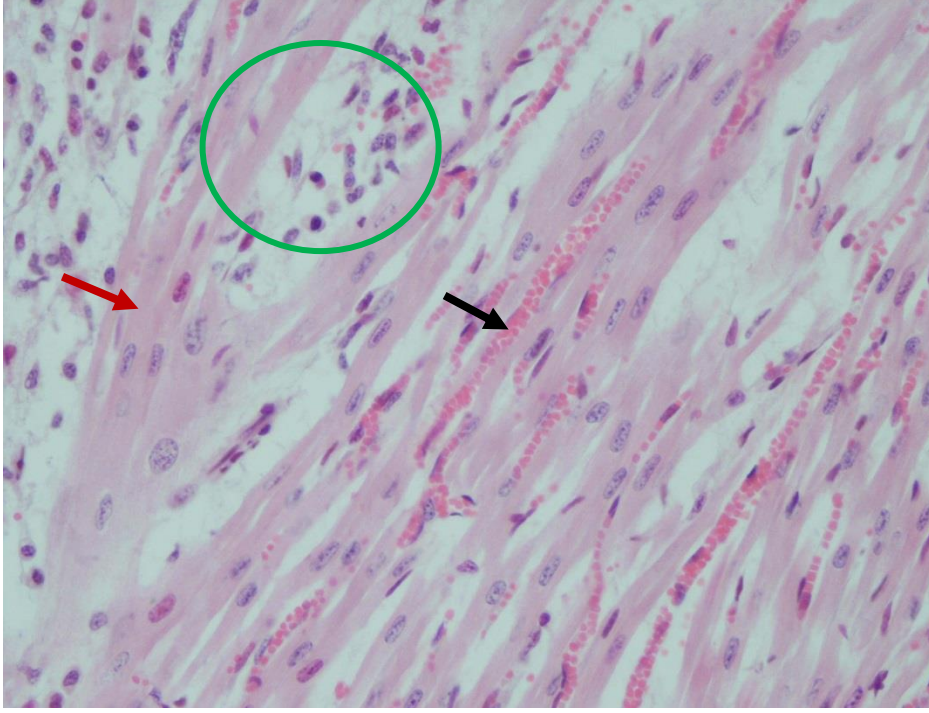


Şekil 1. Epikartta boz beyaz odaklar (Kaplan postu görünümü). Kuzu.

Mikroskopik olarak kalp kasının incelemelerinde, damarlarda belirgin bir hiperemi, miyositlerde yaygın olarak gözlenen hiyalin dejenerasyonu ve nekrozlar ile genelde makrofaj, lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonu (MNH) yer yer kanamalar ile beliren non-purulent interstisyel bir miyokarditis belirlenmiştir (Şekil 2, 3).

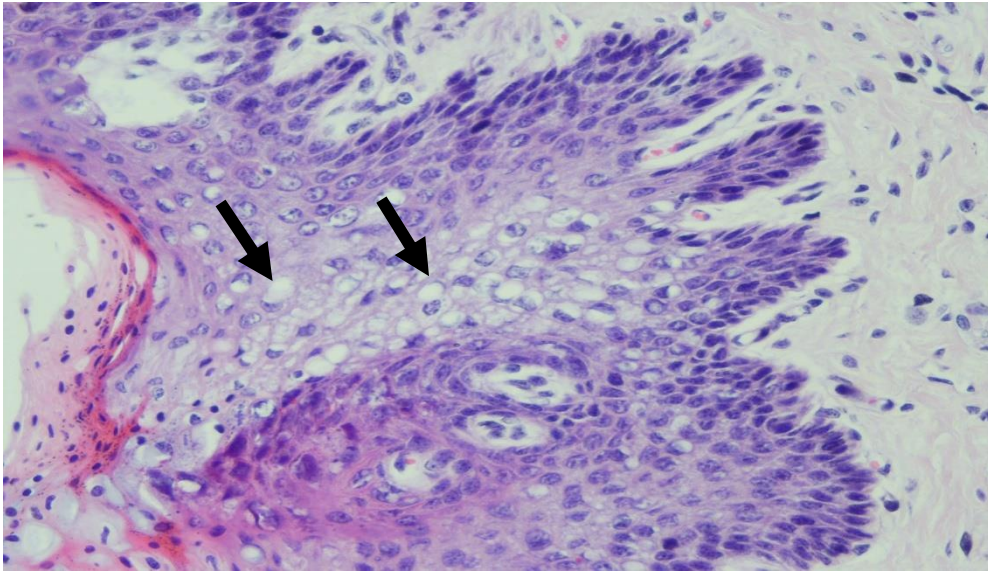


Şekil 2. Lenfohistiyositer miyokarditis. Yaygın MNH infiltrasyonları (sarı ok) ve miyositlerde nekroz (kırmızı ok). Kalp. H-E. x100.

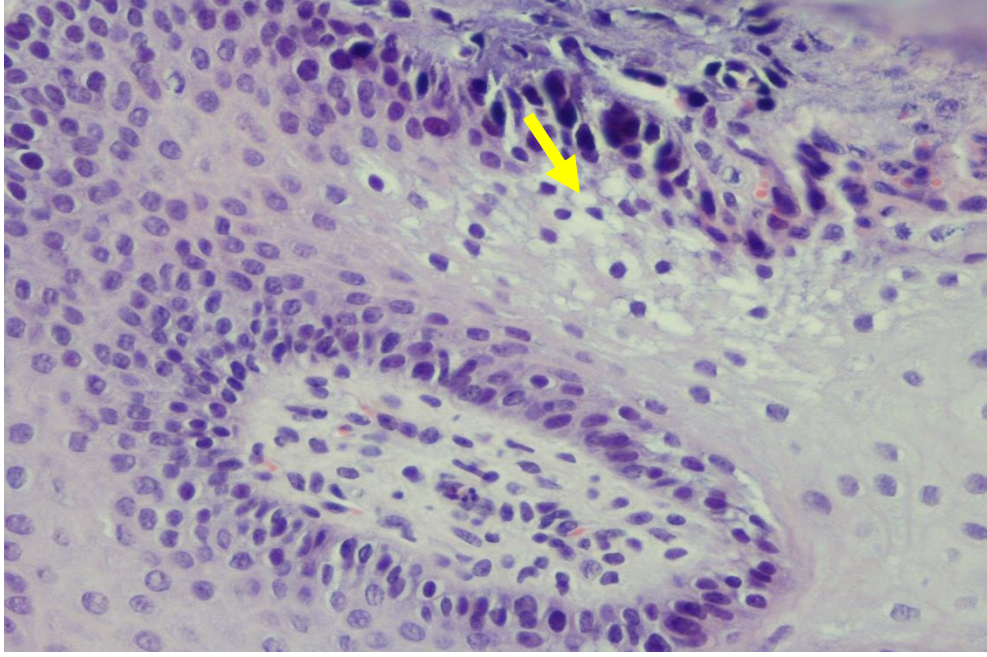


Şekil 3. Lenfohistiyositer miyokarditis. Damarlarda hiperemi (siyah ok), miyositlerde hiyalin dejenerasyonu (kırmızı ok), MNH infiltrasyonu (çember). Kalp, H-E. x400.

Mikroskobik olarak dilde ise her iki olguda da bazı alanlarda epidermin kalınlaştığı ve kalınlaşma gözlenen bu alanlarda stratum spinosum hücrelerinde hidropik dejenerasyon ile belirgin vakuol oluşumları tespit edilmiş, mikrovezikül oluşumları belirlenememiştir (Şekil 4-5). Ayrıca hem dermiste ve hem de epidermiste yangısal bir hücresel reaksiyona da rastlanmamıştır.



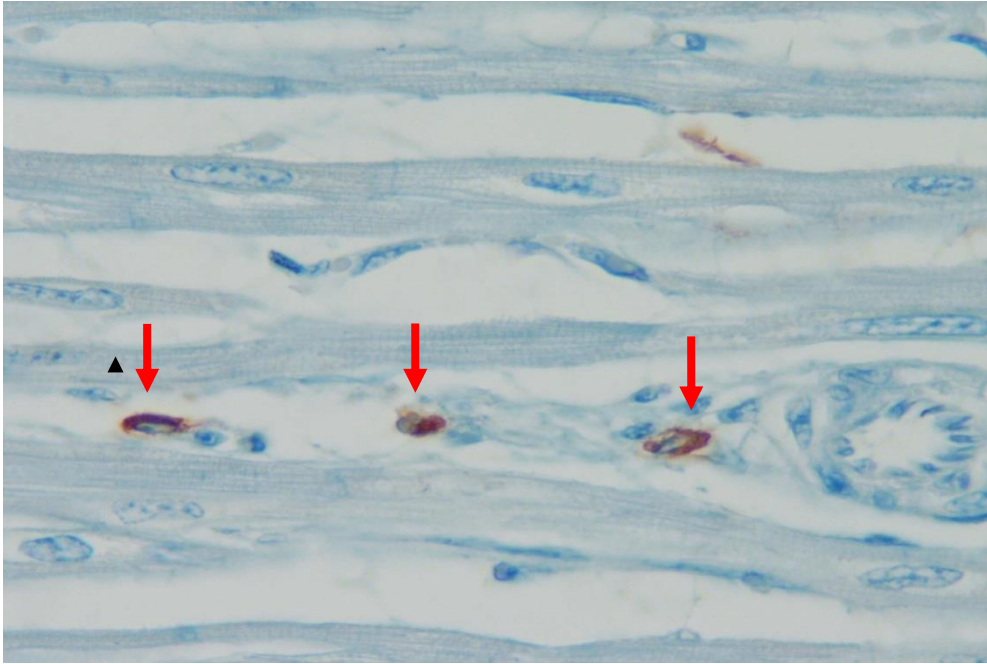
Şekil 4. Stratum spinosum hücrelerinde hidropik dejenerasyon (oklar). Dil. H-E x400.



Şekil 5. Stratum spinosum hücrelerinde hidropik dejenerasyon (ok). Dil. H-E x400.

İmmunohistokimyasal Bulgular

Şap Enstitüsü Müdürlüğü tarafından FMDV serotip A Nepal-84 (G-VII) suşu pozitif olarak değerlendirilen 2 adet olguya ait kalp dokusunun immunohistokimyasal boyamalarının mikroskopik incelemelerinde; yoğun olarak makrofajlar ve miyositler ile epikardiyal hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında antijen pozitifliği ifade eden kahverengimsi, küçük granüller tespit edilmiştir (Şekil 6). Böylece olgularda, FMDV serotip A Nepal-84 (G-VII) için IHC boyama sonuçları pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 6. İntersitisyumda MNH sitoplâzmasında antijen pozitif boyanma (oklar). Kalp. DAB.x1000.

Tartışma ve Sonuç

Şap hastalığı çok hızlı yayılan ve ülke sınırlarını aşabilen, viral bir enfeksiyon olduğu için ruminantlarda büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca hastalıkla mücadele için uygulanan aşılama çalışmaları ülkeler için önemli bir ekonomik maliyet oluşturmaktadır. Hastalıkla mücadelenin ve ekonomik kayıpların asgariye indirilmesinde kritik aşama, hastalığın hızlı teşhis edilerek koruyucu tedbirlerin alınmasıdır.

FMDV serotip A Nepal-84 ülkemizde ilk defa Eylül 2015 yılında Van ilinde görülmüş olup, genel aşı uygulamalarında FMDV serotip A Nepal-84 suşu içeren aşı kullanılmadığından genç ve duyarlı hayvanlarda, özellikle kuzu ve oğlaklarda ani ölümlere neden olmuştur. Ülkemizde 2016 yılı Ocak-Ekim ayları arasında hızla yapılan aşılama ve karantina tedbirleri ile 2016 yılının ikinci yarısından itibaren pozitif (Nepal-84) vakalar görülmemiştir. Bu durum aşı uygulamalarından olumlu sonuçların alındığına işaret etmektedir. Şap hastalığı salgınlarında klinik belirtiler oluşmadan şekillenen miyokarditis formuna ilişkin ölümlerde hastalığın erken teşhis edilebilmesi, hastalığa karşı tedbirlerin hızla alınarak, salgınların önüne geçilmesi ve kayıpların azaltılmasında oldukça önemlidir (Sobrino ve ark., 1986). Bu nedenle yapılan çalışma hastalığın erken teşhisine katkı sağlamak amacıyla planlanmış ve önemli veriler elde edilmiştir.

Ölü olarak getirilen 2 olgunun ağız boşluğu ve ayaklarında şap hastalığının en önemli makroskobik bulgusu olan vezikül oluşumunun gözlenmemiş olması, diğer araştırmacılar (Lubroth, 2002; Bayraktar, 2014) tarafından kaydedildiği gibi FMD'nin miyokarditis formuna ilişkin ölümlerin vezikül şekillenmeden gerçekleştiğini ifade eden bulgulardır. FMD'nin miyokarditis formuna ilgili ölümlerde makroskobik karakteristik lezyon olan kalp kasında solgun alanlar ve nekroz ile mikroskobik olarak da nonpurulent bir miyokarditişi ifade eden hiperemi, hiyalin dejenerasyonu, zenker nekrozu ve mononükleer hücre infiltrasyonlarının belirlenmiş olması, ölümlerin akut seyirli bir şap hastalığına ilişkin gelişen miyokarditis sonucu olduğuna işaret etmektedir (Lubroth, 2002). Ayrıca her iki olgunun kalplerinden alınan kesitlerin IHC boyamaların da FMDV serotip A Nepal-84 suşuna ilgili bir enfeksiyon varlığının ortaya konmuş olması da ölümlerin şap hastalığından ileri geldiğini gösteren bulgulardır.

Şap hastalığının miyokarditis formu perakut seyirli olduğundan genellikle nekropsilerde makroskobik olarak vezikül oluşumlarına rastlanılmadığından, ağız boşluğu ve interdigital bölge gibi şap hastalığının karakteristik lezyonlarının görüldüğü dokulardan teşhis için örnekler alınmamaktadır. Bu çalışmada her iki olgunun dilinden alınan örneklerde Str. Spinozum hücrelerinde belirgin olarak gözlenen hidropik dejenerasyonlar vezikül oluşumunun başlangıcına işaret eden önemli bir bulgu niteliğindedir. Viremi döneminde kalp kasında oluşan lezyonlar ölüme neden oluyorsa da, virüsün affinite gösterdiği diğer dokularda da lezyon oluşumunun başladığı anlaşılmaktadır. Bu bulgular şap hastalığının histopatolojik teşhisinde miyokarditis bulgularına önemli derecede katkı sağlayacaktır. Böylece miyokarditis formuna ilgili ölümlerde makroskobik düzeyde vezikül veya erozyon oluşumu gözlenmiyorsa da gerek ağız boşluğundan ve gerekse interdigital bölgeden örnekler alınmalıdır.

Kaynakça

- Aftosa, F. (2007). Foot and mouth disease. The center for Food Security & Public Health, pp. 475-99. Erişim http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/foot_and_mouth_disease.pdf, Erişim tarihi:10.10.2016
- Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A., Garland, A. (2003). The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *Journal of comparative pathology*, 129; 1-36.
- Bayraktar, B. (2014). Kuzu ve oğlaklardaki miyokardiyal hasarın belirlenmesinde kardiyak troponinlerin etkinliğinin araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Çiftçi, M. K., Ortatatlı, M., Erer, H., Hatipoğlu, F., Özdemir, Ö. (2015). Veteriner Sistemik Patoloji 1, Konya, SÜ Basımevi, pp. 5-8.
- Dekker, A., Nielen, M., Molendijk, M., Kroonenberg, F. (1997). Foot-and-mouth disease airborne transmission prediction model: data and model considerations. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Research Group of the Standing Technical Committee, Kibbutz Ma'ale Hachamisha (Israel), 2-6 Sep 1996.
- Dinter, Z., Morein, B. (1990). Virus infections of ruminants, Elsevier Science Publishers BV, pp. 506-508.
- Donaldson, A., Gibson, C., Oliver, R., Hamblin, C., Kitching, R. (1987). Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O1 and SAT 2 strains. *Research in veterinary science*, 43(3), 339-346.
- Dukpa, K., Robertson, I. D., Edwards, J. R., Ellis, T. M. (2011). A retrospective study on the epidemiology of foot-and-mouth disease in Bhutan. *Tropical animal health and production*, 43, 2, 495-502.
- Gulbahar, M., Davis, W., Guvenc, T., Yarim, M., Parlak, U., Kabak, Y. (2007). Myocarditis associated with foot-and-mouth disease virus type O in lambs. *Veterinary pathology*, 44(5), 589-599.
- Kitching, R., Alexandersen, S. (2002). Clinical variation in foot and mouth disease: pigs. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties*, 21(3), 513-516.
- Knowles, N., Samuel, A. (2003). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus research*, 91(1), 65-80.
- Lubroth, J. (2002). Foot-and-mouth disease: a review for the practitioner. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 18(3), 475-499.
- Mann, J. A., Sellers, R. F.(1990). Foot-and-Mouth Disease Virus. In: *Virus Infections of Ruminants*. Eds: Z. D, B. M. New York, U.S.A: Elsevier Science Publishers B.V., pp. 503-512.
- Milli, Ü. (2000). Sindirim Sistemi. In: *Veteriner Patoloji*. Eds: Milli Ü, R H. Ankara: Medipres Matbaacılık, pp. 1-239.
- Monaghan, P., Gold, S., Simpson, J., Zhang, Z., Weinreb, P. H., Violette, S. M., Alexandersen, S., Jackson, T. (2005). The $\alpha\beta 6$ integrin receptor for foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *Journal of General Virology*, 86(10), 2769-2780.
- Radostits, O. M. (1994). *Veterinary Medicine*, London, W.B. Saunders, pp. 965-974.
- Sobrinho, F., Palma, E. L., Beck, E., Davila, M., De La Torre, J., Negro, P., Villanueva, N., Ortin, J., Domingo, E. (1986). Fixation of mutations in the viral genome during an outbreak of foot-and-mouth disease: heterogeneity and rate variations. *Gene*, 50(1), 149-59.
- Steinhauer, D., Holland, J. (1987). Rapid evolution of RNA viruses. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 409-31.
- Terpstra, C. (1972). Pathogenesis of foot-and mouth disease in experimentally infected pigs. *Bulletin*, 77(1), 859-874.
- Windsor, M. A., Carr, B. V., Bankowski, B., Gibson, D., Reid, E., Hamblin, P., Gubbins, S., Juleff, N., Charleston, B. (2011). Cattle remain immunocompetent during the acute phase of foot-and-mouth disease virus infection. *Veterinary research*, 42(1), 108.
- Woodbury, E., Ilott, M., Brown, C., Salt, J. (1995). Optimization of an in situ hybridization technique for the detection of foot-and-mouth disease virus in bovine tissues using the digoxigenin system. *Journal of virological methods*, 51(1), 89-93.