

Doğal enfekte köpek parvovirus enfeksiyonunda patolojik bulgular ve viral antijenin floresan antikor tekniği ile demonstrasyonu

Recai TUNCA¹, Nihat TOPLU²

¹ Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kars, ² Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Özet: Bu çalışmada klinik olarak köpek parvovirus enfeksiyonu şüpheli 10 adet köpekte karşılaşılan patolojik bulgular tanımlandı ve viral antijenlerin dokulardaki dağılımı indirek floresan antikor tekniği ile belirlenerek hastalığın tanısı kesinleştirildi. Tüm olgularda histopatolojik bulgular, karakteristik parvoviral enteritis lezyonları ile örtüşmekteydi. İmmunofloresan pozitif reaksiyonlara ince ve kalın bağırsaklar, mezenteriyel lenf yumruları, dalak, karaciğer ve kalpte rastlandı. Akciğerlerde patolojik bulgular tanımlanmasına karşın, viral antijen saptanmadı. Pozitif reaksiyonların şiddeti, lezyonların şiddetiyle ters orantılıydı. Şiddetli lezyonların görüldüğü 3 olguda ince bağırsaklarda, 5 olguda da mezenteriyel lenf düğümlerinde viral antijene rastlanmadı. Sonuç olarak, özellikle şiddetli lezyonların görüldüğü olgularda kesin tanının ortaya konabilmesi için, bütün organların immunohistokimyasal olarak incelenmesi gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: İmmunohistokimya, köpek parvovirus, patoloji, poliklonal antikor.

Pathological findings and demonstration of viral antigen by fluorescein antibody technique in naturally infected dogs with canine parvovirus

Summary: In the present study, the pathological findings were described in 10 dogs clinically suspected with canine parvovirus, and the disease was proved by defining viral antigen in the tissue sections by fluorescein antibody technique. In all the cases histopathological lesions were characteristic for the parvoviral enteritis of the dogs. IF positive reactions were present in the small and large intestines, mesenterial lymph nodes, spleen, liver and heart. Despite the presence of the pathological lesions, viral antigens were not present in the lungs. The intensity of the IF positive reactions and severity of the lesions were inversely proportional. Viral antigens were not present in the small intestines (3 cases), and mesenterial lymph nodes (5 cases) of which severe lesions were evident. In conclusion, it is necessary that immunohistochemical application should be carried out in all the organ for definite diagnosis of the canine parvovirus infection.

Key words: Canine parvovirus, immunohistochemistry, pathology, polyclonal antibody.

Giriş

Köpek parvovirus enfeksiyonu (KPE); köpeklerin, akut, fibrinli nekrotik veya hemorajik enteritis ile seyreden viral bir hastalığıdır (1,2,16). Hastalık lezyonları ilk kez 1978 yılında 4-8 haftalık köpek yavrularında bildirilmiştir (7). Daha sonra dünyanın pek çok bölgesinde ve Türkiye’de hastalık tanımlanmıştır (1-4,11-13). Hastalıkta parvoviral enteritis alışılga gelen form olmakla beraber, özellikle yeni doğan köpek yavrularında nonsuppuratif myokarditis ile karakterize myokardiyal form da görülür (8,9,17). Enfeksiyona özellikle maternal bağışıklığı düşük olan köpek yavruları duyarlıdır (4,15).

Şiddetli nekrotik enteritis, nonsuppuratif myokarditis, bağırsak kript epitelinde, myositlerde ve damar endotelinde intranükleer bazofilik ya da amfofilik inklüzyon cisimcikleri karakteristik bulgulardır (8-10,13). Üç-sekiz haftalık köpek yavrularında gözlenen kalp formunda, ani ölümler şekillenir (8,9).

KPE’nun tanısı genelde klinik bulgular (6,12) anatomopatolojik ve histopatolojik lezyonlara (1,2,11-15) dayandırılır. Hastalığın kesin tanısı, dokularda viral antijenin immunohistokimyasal metotlarla saptanması (14,18), serum nötralizasyon testi (5) ve doku kültüründe virus izolasyonu ile gerçekleştirilmektedir (10).

Çalışmada klinik olarak köpek parvoviral enteritisi tanısı konulan ancak tedaviye cevap vermeyip ölen olgularda, hastalığıdaki anatomopatolojik ve histopatolojik lezyonların tanımlanması, köpek parvovirus viral antijeninin dokularda tesbiti ve dağılımı indirek floresan antikor tekniği ile saptanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma materyalini, klinik olarak KPE tanısı konularak tedavi gören, ancak tedaviye yanıt vermeyerek ölen 4-17 haftalık yaşta 10 köpek yavrusu oluşturdu. Ölen hayvanların nekropsileri sistemik olarak gerçekleştirildi.

Hayvanlar 1'den 10'a kadar numaralandırıldı ve her hayvandan bağırsak, karaciğer, akciğer, kalp, dalak, lenf yumruları ve beyinden alınan doku örnekleri % 10'luk tamponlu formalin solusyonunda tespit edildi. Örnekler rutin olarak parafinde bloklandı, 4-6 µm kalınlığında alınan kesitler haematoxylin-eosin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

İmmunohistokimyasal yöntem

İndirek floresan antikor tekniği (FAT) için, poly-L-lysine ile kaplı lamlara 4-6 µm kalınlığında alınan kesitler ksilol ve alkol serilerinde deparafinize ve rehidre edildi. Antijenik yapıların açığa çıkarılması amacıyla, 10 dakika 37 °C'de % 0,1 proteinase-K ile muamele edildi. Phosphate-buffered solution (PBS; pH 6) ile 15 dakika yıkama işleminden sonra, dokular 1:64 oranında sulandırılmış poliklonal rabbit anti-parvovirus serumu ile 37 °C'de 1 saat süre ile inkübe edilerek 15 dakika PBS ile yıkandı. Kesitler, goat anti-rabbit gamma globulin-fluorescein isothiocyanate konjugatı ile 37 °C'de, 45 dakika süreyle inkübe edildi. PBS ile 20 dakika yıkanan kesitler phosphate-buffered glycerol (pH 9.0) ile kapatıldı. Bütün inkubasyon işlemleri nemli kameralarda gerçekleştirildi. Kontrol olarak, kesitlere primer antikor yerine normal tavşan serumu damlatıldı. Dokulardaki immunreaksiyon, floresan mikroskopta (Leica DMLB) değerlendirildi.

Bulgular

Nekropsi bulguları

Genel olarak hayvanlarda gözler çökük, deri elastikiyeti kaybı ile karakterize dehidrasyon bulguları vardı. Anal bölgeler sulu dışkı ile kirlenmişti. Bağırsaklar

konjestif ve şişkin görünümdeydi. Mukoza belirgin şekilde şişkindi. İki hayvanın (Olgu no: 6 ve 8) ince bağırsakları ve sekumunda şiddetli kanamalar vardı. İki hayvanda (Olgu no 1 ve 2) ise kanamalar yalnızca ileosekal bölgede çizgisel tarzdaydı. Diğer hayvanların bağırsaklarında, sulu, akışkan çorba kıvamında bir içerik mevcuttu. Özellikle ileum ve sekum bölümlerinde Peyer plakları ödemli ve belirgindi.

Histopatolojik bulgular

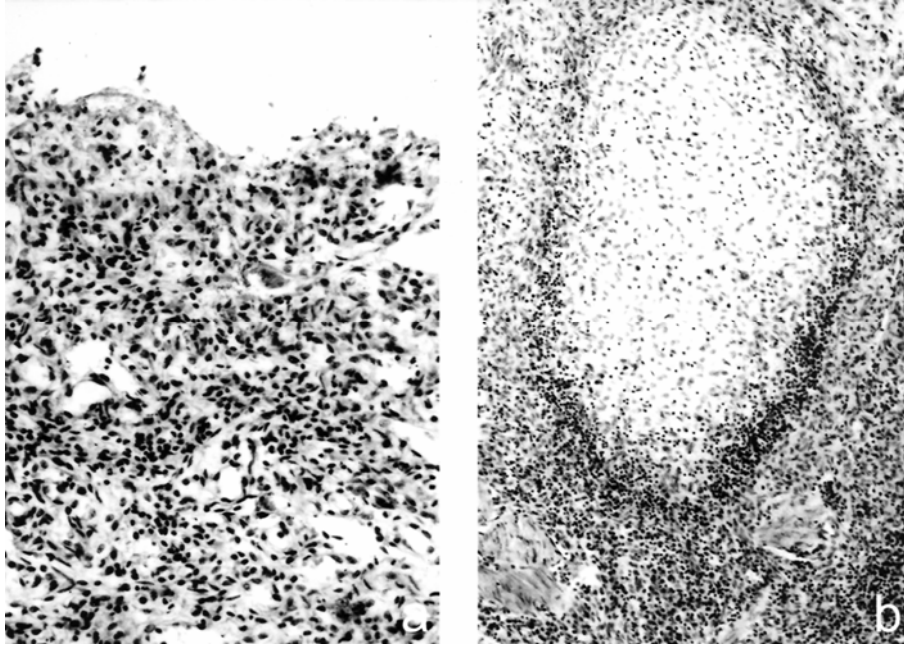
Histopatolojik değişikliklerin şiddeti ve organlara göre dağılımı Tablo 1'de gösterildi. Damarlar hiperemikti. İnce bağırsakların özellikle jejunum ve ileum bölümlerinde villuslar kütleleşmiş ve epitelleri kısmen ya da tamamen dökülmüştü. Propria mukozada yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları belirlendi. 4, 6 ve 8 nolu hayvanlarda bu infiltrasyonların yanında nötrofil infiltrasyonları da görüldü. Bağırsak bezlerinde atrofi ve bazılarında kistik dilatasyonlar göze çarptı. Bunun yanında 3, 5 ve 7 nolu hayvanlarda ise, propriya mukozada belirgin fibrosit proliferasyonları da dikkati çekti (Şekil 1 a). Peyer plakları genişlemiş, merkezi kısımları boşalmış ve retikulum hücre proliferasyonu göze çarpmaktaydı (Şekil 1 b). 5 nolu hayvanda ise Peyer plaklarında lenfositlerin karyoreksise uğradığı dikkati çekti. Mezenteriyal lenf yumruları ve dalakta, sinüzoidler genişlemiş ve ödemli olup, lümenleri makrofajlar, dökülmüş endotel hücreleri ve daha az olarak da nötrofiller ile dolu idi. Karaciğerde tüm olgularda konjesyon ve parankim dejenerasyonu dikkati çekti. İki olguda (Olgu no; 2, 4) belirgin perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü. Tüm olgularda akciğerlerde konjesyon, perivasküler ve peribronşioler ödem dikkati

Tablo 1. Histolojik lezyonların ve viral antijenlerin organlara göre dağılımı.
Table 1. Distribution of the histological lesions and viral antigens.

No	İrk	Yaş (hafta) ve cinsiyet	Histolojik lezyon/ IF reaksiyon						
			İnce bağırsaklar	Mezenteriyal lenf yumruları	Kalın bağırsaklar	Dalak	Karaciğer	Kalp	Akciğer
1	Melez	12/D*	+++/+	+++/+	+/-	+++/+	+++/+	+++/+	+/-
2	Kangal	10/E**	+++/-	+++/-	+++/+	+++/+	++++	+++/-	+/-
3	Melez	11/D	+++/>+++	+++/-	+/-	+++/>+++	+/-	+++/>+++	+/-
4	Cocker	16/D	+++/>+++	+++/>+++	+++/>+	+++/>+++	+++/>+++	+++/>+++	+/-
5	Terrier	8/E	+++/>+++	+++/>-	+++/>-	+++/>+	+/-	+++/>-	+/-
6	Coli	11/D	+++/>-	+++/>-	+++/>-	+++/>+	+/-	+++/>+++	+++/>-
7	Terrier	8/E	+++/>+++	+++/>+	-/+	+++/>+++	+++/>+	+++/>+++	+++/>-
8	Melez	4/D	+++/>-	+++/>-	+++/>+	+++/>+	+/-	+++/>+++	+++/>-
9	Melez	7/D	+++/>+++	+++/>+	+++/>+	+++/>+++	+++/>+	+++/>+++	+/-
10	Melez	5/E	+++/>+	+++/>+	+++/>+	+++/>+	+++/>+	+++/>+	+++/>-

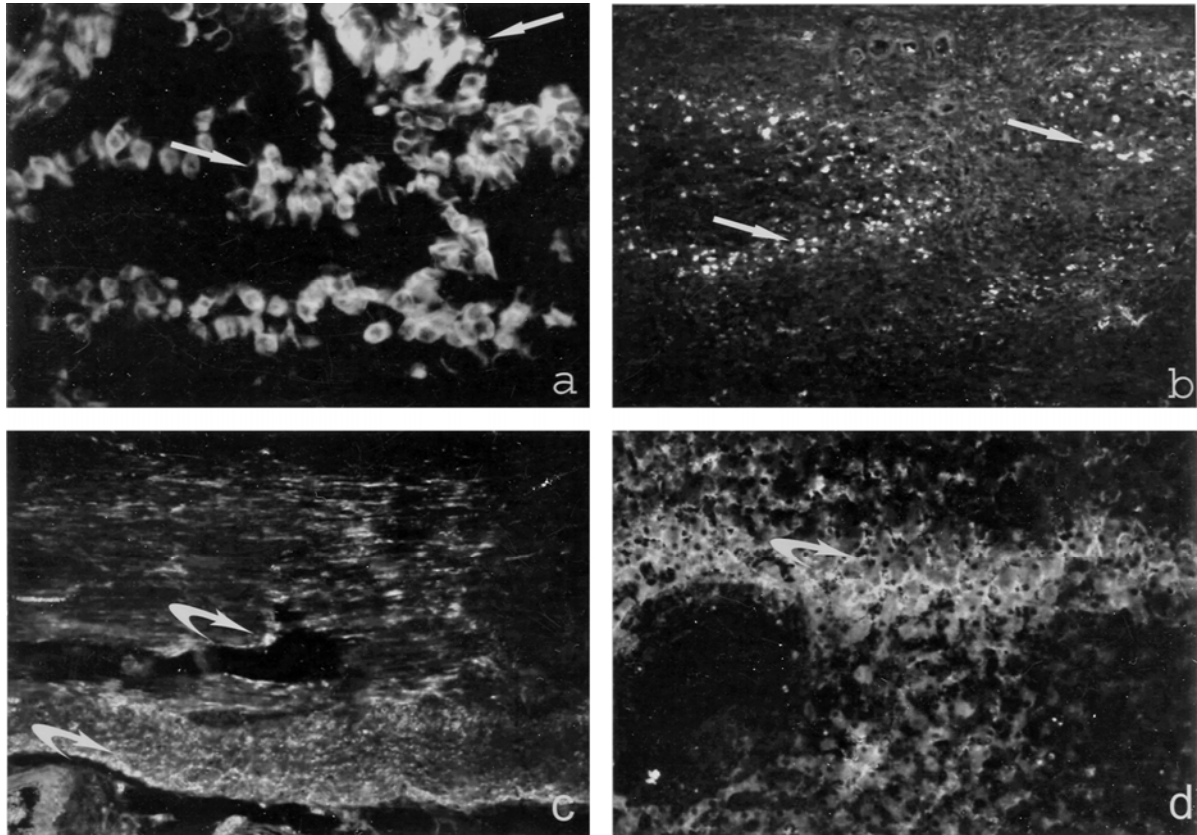
*:Dişi, **: Erkek

Patolojik değişiklikler: - : hastalığa ilişkin değişiklik yok, + : hafif şiddette hastalık lezyonları, ++ şiddetli hastalık lezyonları, +++ : çok şiddetli lezyonlar / İmmunofloresan değerlendirme sonuçları; - : negatif immunohistokimyasal reaksiyon, +: zayıf pozitif reaksiyon, ++: güçlü pozitif reaksiyon ve +++: çok güçlü pozitif immunoreaksiyon.



Şekil 1. (a) Villuslarda kütleleşme, propria mukozadaki bezlerde atrofi ile birlikte mononükleer hücre infiltrasyonu ve fibrosit proliferasyonu. Olgu no; 7, ileum, HE x 180. (b) Peyer plağında lenfoid boşalma ve retiküler hücre proliferasyonu. Olgu no; 3, ileum, HE x 180.

Figure 1. (a) Blunting in the villi, and atrophy of the intestinal glands, monocyctic infiltration and fibrocytic proliferation in the lamina propria. Case number; 7, ileum, HE x 180. (b) Lymphocytical emptying and reticular cell proliferation in Peyer's patch. Case number; 3, ileum, HE x 180.



Şekil 2. (a) Epitel hücrelerinde IF pozitif reaksiyonlar (oklar). Olgu no; 3, jejunum, FAT x300. (b) Lenfositlerde IF pozitif reaksiyonlar (oklar). Olgu no; 9, ileum, FAT x300. (c) Kas dokusunda güçlü IF pozitif reaksiyonlar (oklar). Olgu no; 4, ileum, FAT x300. (d) Hepatositlerde viral antijenler (oklar). Olgu no; 2, Karaciğer, FAT x300.

Figure 2. (a) IF positive reaction in the epithelial cells (arrows). Case number; 3, jejunum, FAT x300. (b) Fluoresceint labelling in the lymphocytes (arrows). Case number; 9, ileum, FAT x300. (c) Strong IF positive reaction in the smooth muscle tissue (arrows). Case number; 4, ileum, FAT x300. (d) Viral antigen in the hepatocytes (arrows). Case number; 2, liver, FAT x300.

çaktı. Dört olguda (Olgu no; 1,7,8,10), interalveoler septal doku mononükleer hücre infiltrasyonları ve fibrozis nedeniyle kalınlaşmıştı. Tüm olguların myokardiumunda konjesyon görüldü. İki olguda (Olgu no; 8, 10) fokal mikrohemorajilerin yanısıra, miyositlerde multifokal nekroz göze çarptı.

İmmunohistokimyasal bulgular

Viral antijenin dokularda dağılımı ve şiddeti olgulara göre belirgin farklılıklar gösterdi (Tablo 1). Viral antijeni belirleyen floresan pozitif (İF) reaksiyonlar, bağırsakların epitel hücrelerinde ve kript lümenlerinde de dökülmüş epitel hücrelerinde belirgin şekilde göze çarptı (Şekil 2 a). Viral antijen, Peyer plaklarında lenfositlerde ve ender olarak da retikulum hücrelerinde dikkati çaktı. Diğer yandan, viral antijen propria mukozada damar endotelileri, tek tük de mononükleer hücrelerde rastlandı (Şekil 2 b). Pozitif reaksiyon, 3 ve 4 nolu hayvanların bağırsaklarının kas katmanında da belirlendi (Şekil 2 c). Buna karşın, 2, 6 ve 8 nolu hayvanların bağırsak kesitlerinde görülmedi. Viral antijenin en belirgin şekilde tesbit edildiği diğer organ da dalaktı. Dalakta, pozitif reaksiyonlar özellikle kortikal bölgedeki lenfositlerde ve retikulum hücrelerindeydi. Mezenteriyal lenf yumrularında ise viral antijen, yalnızca 6 ve 8 nolu hayvanların lenfositlerinde dikkati çaktı. Karaciğerde İF pozitiflik hepatositlerde (Olgu no; 2 ve 4) ve Kupffer hücrelerinde (Olgu no; 1,2,4,7,9,10) görüldü (Şekil 2 d). Kalpte pozitif reaksiyon, çoğunlukla miyositlerde (Olgu no; 3,6,7-10) ve tek tük damar endotelilerinde (Olgu no; 3,7) dikkati çaktı. Akciğerlerde ve beyinde pozitif reaksiyonlara rastlanmadı.

Tartışma ve Sonuç

KPE'nin tanısı, klinik-patolojik bulgular ve virus izolasyonuna dayanır (1,2,5,6,11,13). Enterik formda özellikle ince bağırsaklarda villöz atrofi, villuslardan kriptlere kadar uzanan bölgede epitel hücrelerinde nekroz, kript lümenlerinde nekrotik hücre kırıntıları, propria mukozada mononükleer hücre infiltrasyonu şeklinde tanımlanan lezyonlar patolojik tanının temel dayanağını oluşturur (1,2,4,11,15,18). Çalışmada incelenen köpeklerdeki patolojik değişiklikler, hastalığın karakteristik bulguları olarak kabul edilen bu verilerle uyumluydu. Akut epitel nekrozunun bulunduğu bölgelerde sağlam kalan kript epitelilerinde bazofilik ya da amfofilik, inklüzyon cisimciklerine, çalışmada rastlanmadı. Hastalık, karakteristik bulguların görülmediği olgularda, hemaglutinasyon inhibisyon (5) testi virus izolasyonu ve hasta hayvanların dışkılarının elektron mikroskopta negatif boyama tekniği ile incelenmesiyle teşhis edilir (7,10,12). Çalışmada immunfloresan tekniği kullanılarak köpek parvovirus antijenlerinin dokularda gösterilmesiyle

le hastalık teşhis edilmiştir. İncelenen olgularda floresan pozitif reaksiyon, bağırsaklarda epitel hücrelerinde, Peyer plakları, mezenteriyal lenf düğümleri ve dalakta lenfositlerde ve retikulum hücrelerinde, hepatositler ve Kupffer hücrelerinde, kardiyak miyositlerde ve enterik miyositlerde ve damar endotelilerinde görüldü. KPE'nin tanısında kript epitelilerinde inklüzyon cisimciklerinin görülmesi tanı için önemli bir bulgudur. Ancak sunulan olgularda olduğu gibi, klinik bulguların şekillenmesi ve enfekte hücrelerin erimesiyle inklüzyon cisimciklerini görmek çoğunlukla olanaksızdır (1,11,12). Çalışmada özellikle bağırsaklar, lenf düğümleri ve dalakta immunfloresan pozitif reaksiyonun şiddeti yangısal reaksiyonun şiddetiyle ters orantılı olarak değişmekteydi. Hastalıkta, kript epitelilerinin yıkılma derecesi ve lenfosit proliferasyon oranına bağlı olarak virus miktarı değişmektedir (5,15). Nitekim şiddetli olgularda özellikle bağırsaklarda pozitif reaksiyonun şiddetinin azalması, hastalık ilerledikçe viral proliferasyonun yavaşlamasıyla ilişkili olabilir.

İmmunohistokimyasal teknikler kullanılarak yapılan çalışmalarda, viral antijenlerin özellikle mitotik aktivitesi yüksek epitelial, endotelial ve lenfoid hücrelerde görüldüğü bildirilir (14,18). Bazı deneysel çalışmalarda viral antijene, bağırsaklarda karaciğer'in Kupffer hücrelerinde rastlanırken karaciğer paransimi, böbrek ve akciğerlerde viral antijenlere rastlanılmadığı bildirilmektedir (14). Myokardiyal lezyonlu KPE ile doğal enfekte köpeklerde, pekçok çalışmada akciğerde lezyonlar bulunmasına karşın viral antijenlere rastlanılmadığı belirtilmektedir (14, 17). Viral antijenlerin bulunmamasına rağmen, akciğer lezyonlarının myokardiyal yıkım sonucu, pulmoner vasküler yatakta hemodinamik yapının bozulmasına bağlı olduğu öne sürülmektedir (17). Buna karşın doğal enfekte köpekleri içeren bir çalışmada (18), immunohistokimyasal olarak alveoler makrofajlarda ve pnömositlerde viral antijene rastlandığı rapor edilmekte ve bu durumun boyamadan önce dokuların tesbiti sırasında şekillenen antijen-formol köprülerinin enzimatik kırılımı sonrası, antijenik yapının serbest kalması ile tekniğin daha hassas hale getirilmesine bağlanmaktadır. Ancak bu çalışmada da antijenik yapının açığa çıkarılması amacıyla % 0,1'lik proteinase-K uygulanmasına rağmen akciğerlerde viral antijen dikkati çekmemiştir. İncelenen olgularda da, akciğer lezyonları olasılıkla sekonder olarak şekillenmişti.

Çalışma sonucunda, asıl lezyonların şekillendiği bağırsaklar, mezenteriyal lenf yumruları ve dalakta İF pozitif reaksiyonların şiddeti yangısal değişikliklerin şiddeti ile belirgin olarak azalması ya da görülememesi, KPE'nin kesin tanısının bütün organlarda immunohistokimyasal incelemeyi gerektirdiği sonucunu doğurmaktadır. Bunun yanında, antijenik yapının zayıf-

ladığı ya da ortadan kalktığı bu hastalıkta, hastalığın tanı-sağaltımına ışık tutacak ilave çalışmaların yapılmasına, dokularda parvovirusun spesifik viral nükleotidlerini hedef alan *in-situ* hibridizasyon (*in-situ* PCR) testi ile antijenik yapıyı hedef alan immunohistokimyasal metodların karşılaştırılması olarak incelenmesine gereksinim vardır.

Kaynaklar

1. **Berkin Ş, Alçıgır** (1986): 1973-1984 periyodunda incelenen 523 köpeğin post mortem bulguları üzerinde survey çalışması. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **31**, 153-164.
2. **Berkin Ş, Milli ÜH, Urman HK** (1981): Türkiye'de köpeklerde parvoviral enteritiser Ankara Üniv Vet Fak Derg, **28**, 36-49.
3. **Binn LN, Marchwicki RH, Stephenson EH** (1980): Establishment of canine cell line: derivation, characterization and viral spectrum. Am J Vet Res, **41**, 855-860.
4. **Boros G, Bartha A** (1981): Occurrence of the parvovirus induced acute enteritis of dogs in Hungary. Magy. Aliaton Lap, **36**, 247-251.
5. **Carmichel LE, Joubert JC, Pollock RVH** (1980): Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. Am J Vet Res, **41**, 784-792.
6. **Carpenter JL, Robets RM Harpster N, King NW** (1980): Intestinal and cardiopulmonary forms of parvovirus infection in alitter of pups. JAVMA, **176**, 1269-1273.
7. **Eugster AK, Bendele RA, Jones LP** (1978): Parvovirus infection in dogs. JAVMA, **173**, 1340-1341.
8. **Hayes MA, Russel, RG, Babiuk LA** (1979): Sudden death in young dogs with myocarditis caused by parvovirus. JAVMA, **174**, 1197-1203.
9. **Jezky PF, Haskins ME, Jones CL** (1979): Myocarditis of probable viral origin in pups of weaning age. JAVMA, **174**, 1204-1207.
10. **Johnson BJ, Castro AE** (1984): Isolation of canine parvovirus from a dog brain with severe necrotizing vasculitis and encephalomalacia. JAVMA, **184**, 1398-1399.
11. **Karadaş E, Metin N, Erösüz Y** (1995): Elazığ yöresinde "canine parvovirus enteritis" olguları üzerinde morfolojik incelemeler. Türk Vet Hayv Derg, **19**, 309-314.
12. **Klingeborn B, Lopez, JM** (1980): Diagnostic experience from an epidemic of canine parvoviral enteritis. Zbl Vet Med B, **27**, 483-488.
13. **Lenghaus C, Studdert MJ** (1982): Generalized parvovirus disease in neonatal pups. JAVMA, **182**, 41-45.
14. **Macartney L, Macartney CM** (1986): Canine parvovirus: development of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. Res Vet Sci, **40**, 201-208.
15. **Macartney L, McCandlish, Thomson H, Cornwell JC** (1984): Canine parvovirus enteritis 2: pathogenesis. Vet Rec, **115**, 453-460.
16. **Pletcher J M, Toft J D, Frey RM, Casey HW** (1979): Histopathologic evidence for parvovirus infection in dogs. JAVMA, **175**, 825-828.
17. **Robinson WF, Huxtable, CR, Pass DA** (1980): Canine parvoviral myocarditis: a morphologic description of the natural disease. Vet Pathol, **17**, 282-293.
18. **Svara T, Juntas P, Pogacnic M, Gombac M, Hostnic P** (2003): Immunohistochemical demonstration of parvoviral antigen in the organs of the dogs with canine parvovirus. Slov Vet Res, **40**, 81-90.

Geliş tarihi: 14.06.2006 / Kabul tarihi: 28.06.2006

Yazışma adresi:

Dr.Recai Tunca
Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Patoloji Anabilim Dalı,
Paşaçayırı-Kars.
e-mail: rtunca26@hotmail.com