

Sığırlarda Kuduz Hastalığının Teşhisi ve Kuduz Virüsünün Anatomik Lokalizasyonunun Real Time PCR ile Belirlenmesi Üzerine Karşılaştırmalı Çalışmalar

Atilla YOLDAŞ*, Mehmet TUZCU*, Erdal ÖZMEN**, Akın YİĞİN***, Murat ÖZMEN*,
Seval KUL****, Nevin TUZCU*

*Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Adana – TÜRKİYE **Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi AB Dalı Hatay-TÜRKİYE ***Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Adana – TÜRKİYE ****Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi AD Gaziantep-TÜRKİYE

Özet

Kuduz bütün sıcakkanlı canlılarda görülen, öldürücü zoonoz bir hastalıktır. Bu çalışmada Real Time PCR tekniği ile kuduz virüsünün sığır kafasındaki lokalizasyonları tespit edilerek, kuduz hastalığının teşhisinde Real Time PCR ile histopatoloji, Seller boyama ve floresan antikor testi (FAT) karşılaştırıldı. Çalışmanın materyalini Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne 2007-2009 yılları arasında getirilen kuduz pozitif 25 adet sığır kafası oluşturdu. Real Time PCR ile kuduz olduğu belirlenen 25 olgunun 21'inde FAT ile 11'inde Seller boyama ile 15'inde histopatolojik olarak kuduzun bulguları tespit edildi. Real Time PCR ile cerebellum'larda belirlenen viral nükleik asit miktarının diğer bölgelere göre daha fazla olduğu, kafanın farklı bölgelerinde ve bu bölgeleri inerve eden sinirlerin orijin yerlerinde belirlenen viral nükleik asit miktarları arasında pozitif korelasyonun bulunduğu belirlendi. Beyin ve beyinciğin klasik yöntemlerle muayeneye uygun olmadığı durumlarda Real Time PCR'nun teşhis için kullanılabilmesi ve yine beyin ve beyinciğin bulunmadığı durumlarda kafanın farklı bölgelerinden alınan örneklerden Real Time PCR ile kuduz hastalığının teşhisinin yapılabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kuduz, Sığır, Real Time PCR, Histopatoloji, Nöroanatomi

Comparative Studies on the Diagnosis of Rabies in Cattle and Anatomical Localization of Rabies Virus by Real Time PCR

Summary

Rabies is a fatal disease of all warm blooded animals. In this investigation the distribution of the rabies virus was determined by real time PCR, and comparison of PCR against histopathology, Seller reaction and florescent antibody test for diagnosis, was made. The material of the research was composed of 25 head of the cattle with rabies infection that was brought to Adana Veterinary Control and Research Institute between the years 2007-2009.

All of the cases were determined viral nucleic acid by real time PCR. Eleven of them were positive by Seller, 15 were positive by histopathologically and 21 was positive by fluorescent antibody reaction for rabies.

In this research it was observed that the amount of the viral nucleic acid was higher in cerebellum than the other parts of the head. A positive correlation was found between the viral load on the different areas of the head and viral load on origin of the nerves innerved these areas.

The results of this study confirmed the real time PCR can be used in cases that rabies cannot be diagnosed by routine methods and absence of cerebrum and cerebellum.

Key Words: Rabies, Cattle, Real Time PCR, Histopathology, Neuroanatomy

Giriş

Kuduz bütün sıcakkanlı canlılarda görülen, nonpurulent ensefalomyelitis, ganglionöritis ve sialoadenitis ile karakterize RNA içeren *Rhabdoviridae* ailesine ait *Lysavirus* genusu içerisinde yer alan rabies virüsü tarafından oluşturulan öldürücü zoonoz bir hastalıktır¹. Kuduz hayvan tarafından ısırılmayı takiben kas dokusuna giren virüs, önce kas dokusu içinde çoğalır, sonra periferik sinirler aracılığıyla merkezi sinir sistemine ve oradan da hızla beyine ulaşır^{1,2}. Beyinde lezyonlar oluşturan virüs, tekrar perifere doğru hareket ederek göz, tükürük bezleri, deri gibi dokulara yayılır². Klinik bulgular şekillenmeden önce organlarda çok az antijen bulunması nedeniyle virüsa karşı oluşan antikor cevabı zayıftır. Bu nedenle kuduzun laboratuvar tanı yöntemlerinin duyarlılığı klinik belirtiler tam olarak ortaya çıkmadan önce düşüktür³. Kuduz virüsü nörotrop bir virüsdür. Bu özelliğinden dolayı perifer sinirler ile merkezi sinir sistemi arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için çeşitli nöroanatomik araştırmalarda kullanılmaktadır^{4,5,6}. Kuduz hastalığının laboratuvar teşhisi; beyin, tükürük bezi, kornea ve deride, Negri cisimciklerini veya patognomonik patolojik bulguları göstermeye dayalı yöntemlerle yapılmaktadır⁷. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) kuduz hastalığının teşhisinde Seller boyama, floresan antikor testi (FAT) ve fare inokülasyon testini (FİT) önerdiği de bilinmektedir⁷.

Kuduz virüsüne karşı oldukça duyarlı olmalarına rağmen ruminantlarda Babes nodülü oluşumu ve perivasküler hücre infiltrasyonu şekillenmesi karnivorlardaki kadar belirgin değildir. Kuduz hastalığı ruminantlarda beyinde yangısal bir değişiklik olmadan sadece Gasser ganglionunda ganglionöritis şeklinde de ortaya çıkabilir¹. Kuduz hastalığının teşhisinde en önemli kriter olan intrastoplazmik inklüzyon cisimcikleri klinik bulguların yeni şekillendiği dönemde ölen yada öldürülen hayvanlarda görülemeyebilir⁸. Ayrıca yaşlı sığırların nöronlarının stoplazmalarında normalde görülebilen spesifik olmayan cisimcikler de inklüzyonlarla karışabilir¹. Kuduz hastalığının teşhisinde önerilen Seller boyama tekniği, FAT, deney hayvanı inokülasyonu ve histopatoloji için marazi maddenin kokuşmamış olması gerekir⁹. Sayılan bu sebepler hastalığın kesin teşhisini oldukça güçleştirmektedir.

Son yıllarda, moleküler biyolojik yöntemleri kullanarak virüs nükleik asitlerinin milyonlarca kez çoğaltılması temeline dayalı PCR yöntemlerinin kuduz hastalığının tanısında kullanılmasına ilgili çalışmalar yoğun olarak sürdürülmekte ve bu çalışmalarla birlikte araştırmacılar tarafından kuduz hastalığının teşhisinde kullanılan farklı PCR

protokolleri de rapor edilmektedir^{7,10,11,12}. Karşılaştırmalı çalışmalara dayanarak kuduz hastalığının teşhisinde PCR'un DSÖ tarafından önerilen teşhis yöntemlerine alternatif olabileceği de bazı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir^{7,10,11}.

Bu çalışmanın amacı, tek basamaklı Real Time PCR tekniği ile kuduz virüsünün sığır kafasındaki lokalizasyonlarının belirlenmesi ve cornu ammonis, cerebellum, pons ve kafanın farklı bölgelerinden alınan dokularda viral nükleik asit miktarlarını belirleyerek kuduz hastalığının teşhisinde viral nükleik asit tespitine dayalı Real Time PCR yöntemi ile Seller boyama, floresan antikor tekniği ve histopatolojik yöntemlerin karşılaştırmalarını yapmaktır.

Materyal ve Metot

Çalışma materyalini Adana Veteriner ve Kontrol Araştırma Enstitüsüne 2007 -2009 yılları arasında getirilen kuduz şüpheli 25 adet sığır kafası oluşturdu. Bu materyallerden 21 tanesinden fare inokülasyonu sonucu, kokuşmuş olan 4 tanesinden ise real time PCR ile kuduz hastalığı tespit edildi. Makroskobik muayenesi yapılan sığır kafalarının kılırları traş edildikten sonra regio infraorbitalisten (İFO), regio supraorbitalisten (SPO), angulus mandibula'nın dorsal'inden (M1) ve regio massetrica ile regio zygomatica'nın kesişme noktasından (M2), burun mukozasından (Br), regio parotide'a'nın dorsal'inden (GP1), regio parotide'a'nın distalin'den (GP2) ve konjunktiva'dan (Cn) steril bistüri kullanılarak 2.5 mm çapında doku örnekleri alındı. Ayrıca tekniğine uygun olarak kafatası açılarak¹³ bulbus olfactarius (BO), cornu ammonis (CO), cerebellum (Cr) ve pons'dan (Pn) da doku örnekleri alındı.

Seller Boyama

Kuduz şüpheli sığır kafalarından alınan örneklerin tamamından, sürme preparatlar hazırlanıp oda ısısında kurutularak fuksin-metilen mavisi ile 4-5 saniye süre ile boyandı¹⁴. Boyanmış preparatların mikroskobik muayenesinde stoplazmaları maviye boyanan hücrelerin içerisinde pembe-kırmızı renkte yuvarlak veya oval şekilli cisimciklerin görülmesi kuduz pozitif sonuç olarak kabul edildi.

Histopatoloji

Histopatolojik muayeneler için alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi. Tespit edilen dokular trimlendikten sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafin blokları hazırlandı. Hazırlanan parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında alınan kesitlerin tamamı

Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanarak¹⁵ ışık mikroskobunda incelendi.

Floresan Antikor Testi

Sığır kafalarından alınan örneklerin tamamından, lamaların iki tarafına dokuların kesit yüzü bastırılarak tuşe preparatlar hazırlandı ve oda ısısında kurutuldu.

Kurutulan lamalar-20⁰C de 4 saat süreyle asetonda tespit edildi. Asetondan çıkarılan preparatlar oda ısısında 4-5 dakika bekletilerek asetonu uçuruldu. Tespit edilen tuşe preparatlar Gürçay'ın¹⁶ bildirdiği yöntem kullanılarak Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edilen konjugat ile boyanarak floresan mikroskopta incelendi. Filizi veya parlak yeşil floresan veren yuvarlak veya oval şekilli merkezine doğru parlaklıkları azalan boyanma alanlarının görülmesi kuduz pozitif sonuç olarak kabul edildi.

Real Time PCR

Real time PCR incelemelerinde pozitif kontrol olarak ring test sonuçlarına göre kuduz pozitif bulunan ve Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü tarafından teyit edilen doku homojenatları kullanıldı.

Real time PCR için alınan doku örneklerinden steril koşullarda hassas terazide 30 gr tartıldı. Tartılan dokular MagNA Lyser doku homojenizatörü kullanılarak MagNA pure LC robotik izolasyon cihazı ile MagNA Pure LC Total Nükleik asit kiti (Roche; Cat. No. 03 038 505 001) kullanılarak kit prosedürüne uygun RNA izolasyonları yapıldı. Elde edilen RNA lar -80 °C'de saklandı.

Primer ve prob lar klasik kuduz virüsünün nükleoproteinlerini tanımlayacak şekilde TMB (TıbbiMolBiol; Almanya) tarafından sentezlendi. Çalışmada kullanılan primer ve prob lar aşağıda verilmiştir.

PCR Primerler

Rabies nükleoprotein (GenBank X03673)

Forward 5' ATG TAA CAC CYC TAC AAT G 3'

Rewerse 5' CAA TTC GCA CAC ATT TTG TG 3'

TaqMan probe

Probe 5'-6-FAM CCC AAT TCC CGT CTA CAT CAG TAC GC-TAMRA

Çalışmada uygulanan Real Time PCR işleminde Light Cycler RNA Amplification Hybridization Probes Kiti (Roche; Cat. No. 12 015 145 001) kullanıldı. PCR reaksiyon hacimleri 2µl (1x) Light Cycler Real Time PCR reaksiyon mix hybridizasyon prob, 2,4 µl MgCl₂ (25

mM), 0,4µl (1x) Real Time PCR enzim mix, 1,6 µl Primer 1 (7,5µM), 1,6µl Primer 2 (7,5 µM), 0,6 µl TaqMan prob (5 µM), 10,4 µl ddH₂O ile 19 µl mix hazırlanarak 1 µl virüs RNA'sı eklenerek toplam 20 µl karışım LC kapillarlara konuldu. Hazırlanan kapillerler, LC Carosel (Roche) santrifüjde 3000 rpm de 15 sn santrifüj edildi. Reaksiyon karışımı içeren tüpler ilk olarak cDNA sentezi daha sonra ilgili bölgelerin çoğaltılacağı programın yazılı olduğu Real Time PCR cihazına yerleştirilmişlerdir. Real Time PCR cihazında 50 °C 10 dakika bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. İlk denatürasyon 95 °C gerçekleştirildi, takip eden 40 döngülük PCR için; denatürasyon 95 °C 1 saniye, bağlanma ve uzatma işlemi de 58 °C'de 30 saniye süreyle gerçekleştirildi.

Viral nükleik asit miktarlarının belirlenmesinde kullanılacak olan standart eğrinin hazırlanmasında intraserebral olarak enfekte edilen fare beyninden alınan örneklerden elde edilen Rabies virüs RNA'sının spektrofotometrede (NanoDrop ND-1000) konsantrasyonları belirlenerek 10'dan 10⁶ 'ya kadar sulandırmaları yapıldı. Seri sulandırmalarda belirlenen viral nükleik asit konsantrasyonlarından Real Time PCR cihazında standart eğrinin oluşturulmasında yararlanıldı. Sonuçların değerlendirilmesi Real Time PCR cihazının kantitatif deteksiyon programı ile yapıldı.

İstatistik

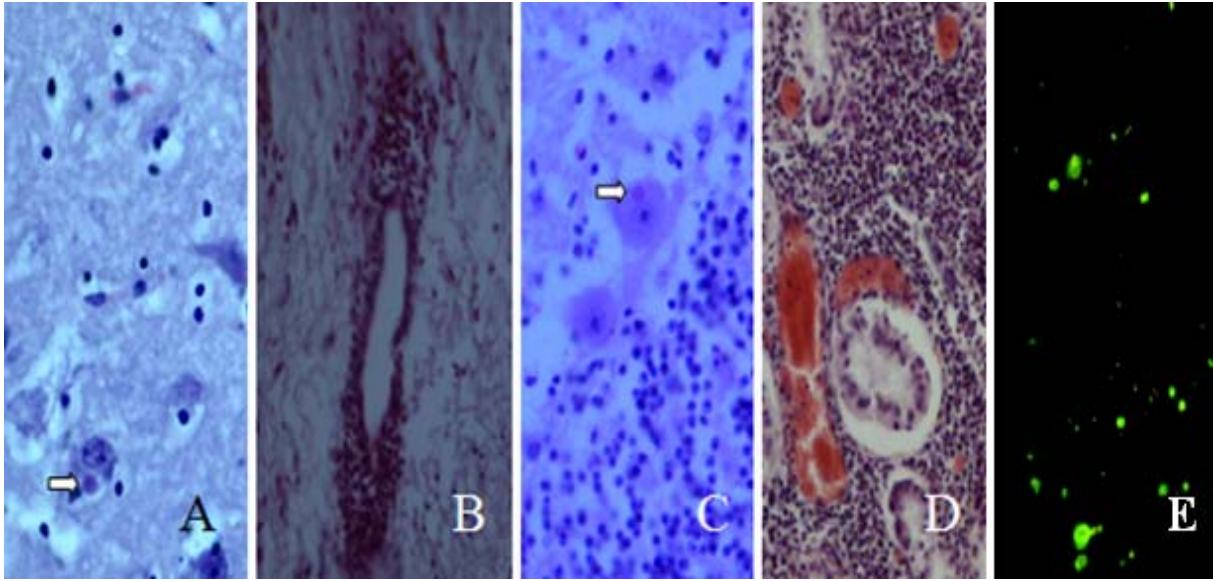
Çalışmada kafanın farklı bölgelerinden alınan dokularda belirlenen viral nükleik asit miktarları ile bu örneklerle ait crossing point değerleri arasındaki ilişkiler, Pearson korelasyon katsayısı ile test edildi, tanıttıcı istatistik olarak ortalama±std. Standart sapma değerleri verildi. Analizlerde SPSS for Windows 11.5 paket programı kullanıldı. P≤0.001 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Real Time PCR ile kuduz viral nükleik asidi tespit edilen 25 sığırın 21 tanesinde FAT ile (Şekil 1E), 11 tanesinde de seller boyama ile kuduzla ait bulgular tespit edildi. Konjunktivalardan hazırlanan seller boyalı preparatların incelenmesi sonucu sadece iki tanesinde inklüzyon belirlenirken, FAT 6 adet numunede kuduz pozitif olduğu görüldü. Çalışmada yirmi bir olguda cornu ammonis ve cerebellum'da nöron dejenerasyonu ve nekrozu (Şekil 1A), perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu (Şekil 1B), fokal gliozis ile karakterize ensefalomyelitis belirlendi. Cerebellum'da purkinje hücrelerinde belirgin olmak üzere 15 olguda beyin ve beyincikte nöronlarda intrastoplazmik yerleşimli. 2-8 mikron büyüklüğünde ve eozinofilik boyanan yuvarlak oval

yapıda inklüzyon cisimcikleri dikkati çekti (Şekil 1C). İncelenen olguların 4 tanesinde beyin ve beyincikte otoliz belirlendi. Üç sığırın tükürük bezlerinde hiperemi ile birlikte bez yapılarının arasında yoğun mononükleer hücre infiltrasyonlarına rastlandı (Şekil 1D).

Histopatolojik incelemelerde beyin, beyincik ve tükürük bezlerinden farklı olarak alınan diğer dokularda patognomonik patolojik bulgu belirlenemedi.



Şekil 1: İntrastoplazmik inklüzyon cisimciği (Ok), Beyin, HE x460 (A), Perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu, Beyin, HE x280 (B), İntrastoplazmik inklüzyon cisimciği, Beyincik, HE x460 (C), Mononükleer hücre infiltrasyonları ve hiperemi, Tükürük bezi, HE x280 (D) Filizi veya parlak yeşil floresan veren yuvarlak veya oval şekilli inklüzyon cisimcikleri, FAT, Beyincik x 900 (E)

Tablo 1 : Sığır kafalarının farklı bölgelerinden ve beyin dokusunun farklı yerlerinden alınan dokuların FAT, Seller boyama, histopatoloji ve Real Time PCR ile inceleme sonuçları

Örneğin Geldiği Yer / Tarih	FAT	Seller	HİSTOPATOLOJİ						Real Time PCR
			Ensefalitis		Beyinde Spongiosis	Sialoadenitis	İnklüzyon		
			CO	Cr			CO	Cr	
Yüreğir / 2007	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Hassa / 2007	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kırıkhan / 2007	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Kozan /2007	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Oğuzeli / 2007	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Oğuzeli / 2007	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Reyhanlı / 2007	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Sincik / 2007	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sincik / 2007	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Siverek / 2007	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Ceyhan / 2008	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Ceyhan / 2008	-	-	O	O	-	-	O	O	+
Harran / 2008	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Siverek / 2008	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Suruç / 2008	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Viranşehir / 2008	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Yüreğir / 2008	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Yüreğir / 2008	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Hilvan / 2009	-	-	O	O	-	-	O	O	+
Reyhanlı / 2009	-	-	O	O	-	-	O	O	+
Ş.Urfa / 2009	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Ş.Urfa / 2009	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Ş.Urfa / 2009	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Ş.Urfa / 2009	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Siverek / 2009	-	-	O	O	-	-	O	O	+

CO: Cornu ammonis Cr: Cerebellum O: otoliz

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan enfekte fare beyninin crossing point değeri 16,16 olarak belirlendi. Bulunan bu değerden viral RNA konsantrasyonu 4.48 ng olarak hesaplandı.

Cerebellum örneklerinden elde edilen crossing point değer ortalamalarının (25,09±0,9) CO, BO ve Pons'dan elde edilen crossing point değer ortalamalarından daha düşük olduğu görülmüştür. Cerebellum'dan elde edilen crossing point değeri ile CO, BO ve Pn dan alınan örneklerden elde edilen

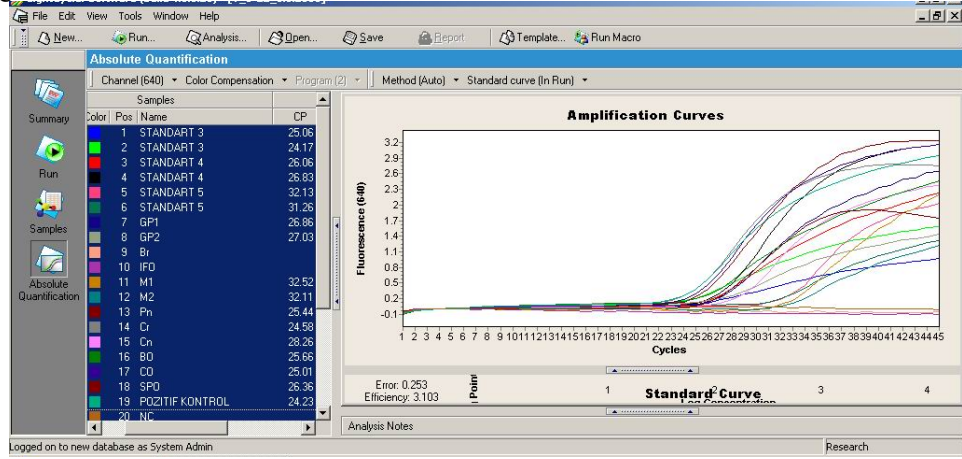
crossing point değerleri arasındaki korelasyon araştırıldığında Cr ile CO ($r=0,726$, $p=0,001$), Cr ile Pn arasında ($r= 0,909$, $p=0,001$) ve Cr ve BO arasında ($r=0,929$, $p=0,001$) pozitif bir korelasyonun bulunduğu belirlenmiştir.

Pons örneklerinden elde edilen virüs miktarları ile İFO ($r=0,846$, $p=0,001$), SPO ($r=0.675$ $p=0,001$), M1($r=0.878$, $p=0.001$), M2 ($r=0,905$, $p=0,001$) Cn ($r:0,958$ $p=0,001$) arasında pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Regio paratodia'nın dorsalinden (GP1) elde edilen crossing point ortalama değerinin $25,67\pm1,0$ olduğu Regio paratodia'nın ventralin'den alınan örneklerde ise $26,20\pm1,0$ olduğu görülmüştür. Pn ile GP1 ($r= 0,865$ $p= 0,001$) ve GP2 ($r= 0,878$ $p= 0,001$) arasında güçlü bir pozitif korelasyon olduğu görülmüştür. BO ile M1, M2, SPO, İFO, GP1 ve G2 arasında anlamlı bir istatistiki ilişki belirlenmemiştir.

Çalışmada pons'ta belirlenen crossig point değerleri 31.65, 31.08, 32.65, 31.43 olan 4 olguda M1, M2, SPO, İFO bölgelerinden alınan örneklerde virüs

nükleik asitleri belirlenemezken GP1 ve GP2'de virüs nükleik asitleri saptanmıştır. Bir vakada merkezi sinir sisteminden alınan örneklerde virüs nükleik asitleri tespit edilmesine rağmen aynı materyalde kafa bölgesinden alınan dokularda viral nükleik asitlere rastlanamamıştır. Kokuşmuş 4 olgunun iki tanesinde GP1'de, bir tanesinde GP2'de dört tanesinde M1, M2, SPO, İFO bölgelerinde Real Time PCR sonucu negatif bulunmuştur. Bir örneğe ait Real Time PCR ile elde edilen amplifikasyon eğrileri şekil 2 de verilmiştir.

Sığır kafalarının farklı bölgelerinden ve merkezi sinir sisteminin farklı yerlerinden alınan dokulardan Real Time PCR da elde edilen crossing point değer ortalama ve standart sapmaları ile bu değerlerden hesaplanan viral RNA konsantrasyonları ve teşhis oranları tablo 2 de verilmiştir.



Şekil 2: Çalışmada incelenen bir vakanın Real Time PCR ile elde edilen amplifikasyon eğrileri

Tablo 2: Sığır kafalarından alınan örneklerden Real Time PCR da elde edilen crossing point değer ortalama ve standart sapmaları ile bu değerlere göre hesaplanan viral RNA konsantrasyonları ile teşhis yöntemlerinin karşılaştırılması.

	Cn	SPO	Br	İFO	M1	M2	GP1	GP2	Pn	Cr	BO	CO
CP ± St.S	26,2 ±0,8	26,13 ±0,9	26,1 4±0, 97	27,33± 0,83	26,93± 0,8	27,20± 0,9	25,67± 1,0	26,20± 1,0	25,17± 1,4	25,09± 0,9	25,09 ±0,9	25,22 ±0,9
Viral Nükleik Asit miktarı (logaritmik dönüştürülmüş değerler)	3.60	3.40	3.45	2.76	3.31	2.82	3.86	3.60	3.90	3.92	3.92	3.88
Real Time PCR Pozitiflik Oranı	%96	%84	%84	%80	%84	%84	%92	%96	%100	%100	%100	%100
FAT Pozitiflik Oranı	%24	-	-	-	-	-	%8	%8	%84	%84	%76	%84
Negri Cisimciği (Hematosilen Eozin)	-	-	-	-	-	-	-	-	%60	%60	%40	%48
Seller Boyama Pozitiflik Oranı	%8	-	-	-	-	-	-	-	%40	%44	%32	%44

PC: pozitif kontrol Cn: konjuktiva Br : burun mukozası İFO: regio infraorbitalis SPO: regio supraorbitalis

M1: regio masentrica'nın angulus mandibula'nın dorsali M2: regio masentrica ile regio zygomatica'nın kesişim noktasından GP1: regio parotidea'nın dorsal'inden GP2: regio parotidea'nın distalin'den Pn: pons Cr: cerebellum BO: bulbus olfactarius, CO: cornu ammonis CP: crossing point değeri

Tartışma ve Sonuç

Evcil hayvanlarda görülen kuduz olaylarından bunlarla iç içe yaşayan hayvan sahiplerinin de etkilenmesi ve hastalığın insanlara bulaşma ihtimalinin bulunmasından dolayı kuduzun laboratuvarında hızlı ve doğru teşhisi insan sağlığı açısından önem taşımaktadır. Çoğu durumda etkilenen bireylere koruyucu aşı uygulanıp uygulanmayacağı konulan teşhise belirlenmektedir^{16,17}. Kuduz şüpheli materyalde virüs miktarının çok düşük olması ya da materyalin klinik bulgular şekillenmeden önce alınması durumunda rutin teşhis metotları ile teşhis güçleşmekte³ ve şüpheli materyalin pozitif gibi değerlendirilmesine sebep olmaktadır. Bu durumda aşı ve karantina uygulaması gibi koruyucu tedbirlerin fazladan uygulanmasına neden olmaktadır.

Ülkemizde görülen kuduz olayları incelendiğinde tespit edilen kuduz olaylarının %98' nin köpek, at, sığır ve kedi gibi evcil hayvanlarda şekillendiği, bu vakaların içerisinde sığırların önemli bir yer tuttuğu görülmektedir¹⁷. Yine sığırlarda kuduz hastalığında belirlenen klinik bulguların sinirsel semptomlarla ortaya çıkan koriza gangrenoza bovum, listeriyozis,

Real time PCR otolitik dokularda FAT ve diğer yöntemlere göre daha duyarlı bulunmasına rağmen, oldukça pahalı cihaz altyapısı gerektirmesi ve

ketozis gibi hastalıklara benzemesi¹⁸ ve bu hastalıkların ülkemizde görülüyor olması sığırlarda kuduz hastalığının kesin ve çabuk teşhisinin önemini ortaya koymakta ve hastalığın biyopsi materyalinden teşhis edilebilmesi imkanlarının araştırılmasının önemini artırmaktadır.

Etkene özgü nükleotidlerin belirlenmesini hedefleyen ve polimeraz zincir reaksiyonu esasına dayanan moleküler yöntemlerin kısa sürede güvenilir tanıyı sağlamalarının yanında en önemli avantajları otolitik ve putrefaktif dokularda da teşhis imkanı sunmalarıdır. Çünkü otolitik ve putrefaktif değişikliklere karşı enfeksiyöz etkenlerin nükleotid yapıları antijenik yapılarına göre daha uzun süre dayanıklı kalabilmektedir¹⁹. Schaf²⁰ kokuşmuş yada tespit edilmiş dokularda antijenik bağlanmanın zayıfladığı, bunun da FAT teşhisinde sensitivitenin düşmesine sebep olabileceğini belirtmektedir. Çalışmamızda da literatüre benzer şekilde otoliz belirlenen 4 olguda Real Time PCR ile kuduz virüsü nükleik asitleri belirlenirken FAT ile bu vakalarda kuduz antijenlerinin belirlenememiş olması otolizin FAT ile yapılacak teşhisin duyarlılığını azaltabileceğini göstermektedir.

maliyeti yüksek sarf malzemeler ile uygulanıyor olması bu yöntemin diğer yöntemlere göre en önemli dezavantajını oluşturmaktadır.

Kuduzun histopatolojik teşhisi yangısal değişiklikler ve Negri cisimciklerinin belirlenmesi ile yapılmaktadır. Herbivorlarda kuduz hastalığında görülen histopatolojik bulguların karnivorlara nazaran daha zayıf şekillendiği yine sığır kuduz olaylarının % 30'unda inklüzyon cisimciklerinin görülebileceği kaynaklarda belirtilmektedir⁸. Çalışmada incelenen sığır kafalarının yirmi bir tanesinde cornu ammonis ve cerebellum'da nöron dejenerasyonu ve nekrozu, perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu ve fokal gliosis ile karakterize nonpurlent ensefalomyelitis belirlenirken, bu olguların sadece 15 tanesinde hastalığın tanıtıcı bulgusu olan inklüzyon cisimciklerinin belirlenmiş olması, kuduz teşhisinde histopatolojik muayenenin FAT ile veya antijeni göstermeye dayalı immunhistokimyasal metotlarla desteklenmesi gerektiği görüşünü desteklemektedir.

Araştırmacılar^{8,9,21} kuduz hastalığında tükrük bezlerinde histopatolojik olarak bezlerin intensitesiyumunda mononükleer hücre infiltrasyonları, damar dilatasyonları ve bezlerde nekrotik değişikliklerin bulunduğunu bildirmektedir. Çalışmada incelenen üç sığırdaki tükrük bezlerinde hiperemi ile birlikte bez yapılarının aralarında mononükleer hücre infiltrasyonlarına rastlandı. Araştırmada tükrük bezlerinde belirlenen histopatolojik bulguların kaynaklarda bildirilenlerle uyumlu olduğu görülmüş, ancak bezlerde görüldüğü bildirilen nekrotik değişikliklere incelenen örneklerde rastlanamamıştır. Sağlık bakanlığının kuduz teşhis yönetmeliğinde²² Seller ve FAT ile muayenede negatif olarak belirlenen vakaların fare inokulasyonu testine tabi tutulması gerektiği belirtilmektedir. Fare inokulasyon testi teşhis süresini uzatmakla birlikte her vaka için en az 6 adet fare kullanılmasını gerektirmektedir. Çalışmada beyin ve beyincikten farklı olmak üzere kafanın farklı yerlerinden alınan doku örneklerinde dahi virüs nükleik asitlerinin belirlenmiş olması Real Time PCR'ın deney hayvanı kullanımının ve fare inokulasyon testinin önemli bir alternatifi olabileceğini göstermektedir.

Güzel ve Aylan²³ 143 örnek üzerinde yaptıkları çalışmada FAT ve fare inokulasyon testinde pozitif sonuç elde edilen iki örnekte, kuduz doku kültürü enfeksiyon testinde negatif olmasını, materyalin kokuşmuş olmasına yada virüs miktarının az olmasından dolayı zayıf reaksiyon veren bu örneklerin FAT pozitif kabul edilmelerine bağlamışlardır. Yapılan bu çalışmada Real Time PCR ile şüpheli materyalde bulunan çok az sayıdaki etkenlerin bile belirlenebilmesi Real Time PCR'nın doğrulama testi olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Pons'ta viral RNA konsantrasyonları ile regio infraorbitalis, regio supraorbitalis, regio masentrica ile regio zygomatice'nin kesişim noktasından, regio parotideae'nin dorsal'inden, regio parotideae'nin distalin'den alınan dokularda belirlenen viral RNA

konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak güçlü bir korelasyonun olması, sayılan bölgelerin tamamının pons ve çevresinden²⁴ orijin alan sinirlerin kolları tarafından innerve edilmesi ile ilgili olabilir. Benzer şekilde pons'da belirlenen virüs nükleik asit miktarları ile pons'dan orijin alan n. trigeminus son dallarının inerve ettiği m. masseter bölgelerindeki (M1, M2) virüs miktarı arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiş olması, kuduz virüsü inokule edilerek Real Time PCR tekniği ile inokulasyon bölgesini innerve eden motorik sinirlerin bağlantılı oldukları merkezi sinir sistemi kısımlarının tespit edilebileceğini göstermiştir. Bu düşüncüyü destekleyen, floresan işaretli kuduz virüsü kullanılarak perifer sinirler ile merkezi sinir sistemi arasındaki fonksiyonel ilişkiyi ortaya koymak üzere yapılan farklı araştırmalar bulunmaktadır^{5,25}. Bu çalışmada merkezi sinir sisteminden alınan dokularda belirlenen virüs nükleik asit miktarları ile kafanın farklı bölgelerinden alınan dokularda belirlenen virüs nükleik asit miktarları arasında belirlenen pozitif korelasyonlar Real Time PCR'ın fonksiyonel nöroanatomi çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

Virüsün kas dokusunda ve iç organlarda bulunabileceğini ifade eden farklı çalışmalar bulunmaktadır^{21,26,27}. Ancak kuduz virüsünün organlarda ve organların farklı bölümlerindeki yoğunluğunu gösteren literatür bilgisine rastlanılamamıştır. Bu çalışma ile kuduz virüsünün merkezi sinir sistemi organlarında ve kafanın farklı bölümlerindeki konsantrasyonları Real Time PCR ile ortaya konulmuştur. Çalışmada İFO, M1 ve M2 hesap edilen virüs nükleik asit miktarının diğer örneklerden daha düşük oranda belirlenmesi bu bölgelerde bulunan sinir dokusunun yoğunluğu ile ilgili olabilir. Yine tükrük bezinde belirlenen viral nükleik asit miktarlarının beyin ve beyincikten alınan dokularda hesap edilen miktarlara yakın olması, araştırmacıların^{8,9} belirttiği kuduz virüsünün sinir dokuları kadar tükrük bezlerine de affinite gösterdiği görüşünü desteklemektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, tek basamaklı Real Time PCR tekniği ile kuduz virüsünün sığır kafasındaki topografik dağılımı tespit edilerek, cornu ammonis, cerebellum ve pons'dan alınan dokular ile kafa bölgesinin farklı yerlerinden alınan dokularda viral nükleik asit konsantrasyonları belirlenerek kuduz hastalığının teşhisinde Real Time PCR ile Seller boyama, floresan antikor tekniği ve histopatolojik yöntemlerin karşılaştırmaları yapılmış ve sinir dokusunun bulunmadığı durumlarda kafa bölgesinden alınacak farklı dokuların veya biyopsi materyallerinin Real Time PCR ile hastalığın teşhisinde kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Urman HK. (1977). Veteriner Patoloji. Cilt IV Sınır Sistemi Patolojisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara.
2. Shankar V, Dietzschold B, Koprowski H. (1991). Direct Entry of Rabies Virus into the Central Nervous System without Prior Local Replication. *Journal of Virology*. 65(5): 2736-2738.
3. Jackson A, Reimer DL. (1989). Pathogenesis of Experimental Rabies in Mice: An Immunohistochemical Study. *Acta Neuropathol*. 78: 159-165.
4. Gong S, DeCuypere M, Zhao Y, LeDoux MS. (2005). Cerebral Cortical Control of Orbicularis Oculi Motoneurons. *Brain Res*. Jun 21;1047(2):177-93.
5. Morcuende S, Delgado-García JM, Ugolini G. (2002). Neuronal Premotor Networks Involved in Eyelid Responses: Retrograde Transneuronal Tracing with Rabies Virus from the Orbicularis Oculi Muscle in the Rat. *The Journal of Neuroscience*. 22(20): 8808-8818.
6. Kelly RM, Strick PL. (2000). Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J. Neurosci Methods*. 103: 63-71.
7. Ün H, Alkan F. (2004). Kuduz Hastalığının Teşhisinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 15: 1-13.
8. Milli HÜ, Hazıroğlu R. (2000). Veteriner Patoloji, I. Cilt, Medipress, Ankara.
9. Vural AS. (1997). Köpeklerde Kuduzun Tanısında Histopatolojik İmmunperoksidaz ve İmmunofloresan yöntemlerin karşılaştırılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, s. 42-60, Ankara
10. Whitby JE, Johnstone P, Sillero-Zubiri C. (1997). Rabies virus in the decomposed brain of an Ethiopian wolf detected by Nested Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction. *J. Wild. Dis*. 33: 912-915.
11. Sacramanto D, Bourhy H, Tordo N. (1991). PCR Technique as an Alternative Method for Diagnosis and Molecular Epidemiology of Rabies virus. *Molecular and Cellular Proses*. 5: 229-240.
12. Ermine A, Tordo N, Tsiang H. (1988). Rapid Diagnosis of Rabies Infection by means of a Dot Hybridization Assay. *Mol. Cell. Probes*. 2: 75 -82.
13. Berkin Ş, Alçıgır G. (1997). Nekropsi. Medisan Yayınevi, Ankara.
14. Beşe M. (1993). Mikrobiyolojide Kullanılan Boyalar ve Boyama Yöntemleri. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi, Prof Dr. Nazım Terzioğlu Basım Atölyesi, İstanbul.
15. Demir R. (2001). Histolojik Boyama Teknikleri. Palme Yayıncılık, Ankara.
16. Gürçay M. (2002). Doğu Anadolu Bölgesinde Bazı illerde (Elazığ, Malatya, Tunceli, Bingöl, Muş) 1996-1999 Yıllarında Görülen Kuduz Olguları. 8 (2): 153-156.
17. Göktaş P, Ceran N, Karagül E, Çiçek G, Özyürek S. (2002). Kuduz Aşı Merkezine Başvuran 11017 Olgunun değerlendirilmesi. *Klinik Dergisi*, 15 (1): 12-15.
18. Alaçam E, Şahal M. (1997). Sığır Hastalıkları. Medisan Yayınevi, Ankara.
19. Türkyılmaz S, Esendal MÖ. (2002). Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanım alanları. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 8 (1): 71-76,
20. Schaff J. (1968). Technik und Zuverlässigkeit der mikroskopischen Diagnose der Tollwut. II Antigen-Nachweismittels Fluoreszens-Antikörper-Technik. *Zbl.Vet.Med*. 15: 249-258.
21. Balachandran A, Charlton K. (1994). Experimental Rabies Infection of Nonnervous Tissues in Skunks (*Mephitis mephitis*) and Foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet. Pathol*. 31: 93-102
22. Güzel T, Aylan O. (1995). Kuduz hastalığının laboratuvar Teşhisinde Flöresan Antikor, Fare İnokulasyon Testi ve Kuduz Doku Kültür Enfeksiyon Testlerinin Karşılaştırılması. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 8: 45-55.
23. Kuduz Korunma ve Takip Yönergesi (2001). Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Ankara
24. Dursun N. (2000). Anatomi Ders kitabı III. Medisan Yayınevi, Ankara.
25. Ugolini G. (2005). Specificity of Rabies Virus as a Transneuronal Tracer of Motor Networks: Transfer from Hypoglossal Motoneurons to Connected Second-Order and Higher Order Central Nervous System Cell Groups. *Brain Res*. 21 (2):177-193.
26. Murphy FA, Bauer SP, Harrison AK, Winn WC. (1973). Comparative Pathogenesis of Rabies and Rabies-Like Viruses: Viral Infection and Transit from Inoculation Site to the Central Nervous System. *Lab. Invest*. 28: 361-376.
27. Park CH, Kondo M. (2006). The Histopathogenesis of Paralytic Rabies in Six-Week-Old C57BL/6J Mice Following Inoculation of The CVS-11 Strain into The Right Triceps Surae Muscle. *J. Vet Med Sci*. Jun. 68(6): 589-95.

Yazışma Adresi: Dr. Atilla YOLDAŞ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Adana – TÜRKİYE

Email: atillayoldas99@hotmail.com