

## KUDUZ HASTALIĞININ TEŞHİSİNDE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU\*

### “Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Rabies”

Hikmet ÜN\*\*

Feray ALKAN\*\*\*

#### ÖZET

Bu çalışmada, kuduz hastalığının teşhisinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniğinin kullanım olanaklarının araştırılması amaçlandı. Toplanan materyallerin Floresan Antikor Tekniği (FAT) ile kontrolü sonuçları heminested RT-PCR testinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldı. Ayrıca kokuşmuş materyallerden heminested RT-PCR ile kuduz hastalığının teşhisi olanağı araştırıldı.

Çalışmada 83 adedi FAT ile değerlendirilebilen ve 30 adedi de kokuşmuş olmaları nedeni ile FAT ile değerlendirilemeyen toplam 113 adet değişik hayvan türüne ait beyin örneği kullanıldı. FAT ile değerlendirilebilen 83 materyalden 80 adedi kuduz yönünden müspet, 3 adedi ise kuduz yönünden menfi idi. Bu materyaller Tarım ve Köyişleri Bakanlığına bağlı kuduz teşhis laboratuvarlarından temin edildi.

FAT ile müspet değerlendirilen 80 materyalden 49 (% 61,25) adedinde RT-PCR ile viral nükleik asit tespit edilirken, heminested RT-PCR ile tamamında (% 100) viral nükleik asit saptandı. FAT ile menfi olan 3 adet materyalde RT-PCR ve heminested RT-PCR ile de viral nükleik asit tespit edilmedi. 30 adet kokuşmuş materyalden 4 adedinde RT-PCR ile viral nükleik asit (%13,33) ve 6 adedinde de heminested RT-PCR ile viral nükleik asit (% 20) tespit edildi. Heminested RT-PCR ile viral nükleik asit tespit edilen bu 6 materyalden 3 adedi İstanbul Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edilen, diğer 3 adedi de Etlık Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde aşı üretimi ve deneysel çalışmalarda kullanılan hayvanlara ait beyinlerdi. Deneysel amaçlarla kullanılanlar ve kuduz virusu ile enfekte edilmiş olan hayvanlar (3 adet) hariç tutulacak olursa kokuşmuş materyallerdeki RT-PCR ve heminested RT-PCR pozitiflik oranları sırası ile % 3,7 (1/27) ve % 11,11 (3/27) olarak belirlendi.

**Anahtar Sözcükler :** Kuduz, RT-PCR, Heminested RT-PCR, Teşhis

Kabul Tarihi: 22.09.2004

\* Aynı isimli Doktora tezinden özetlenmiştir. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM/HIS 2000/09/04/44 proje numarası ile desteklenmiştir.

\*\* Etlık Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, ANKARA

\*\*\* Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı/ANKARA

## **SUMMARY**

*In this study, the probability of the use of the PCR technique for the diagnosis of rabies was investigated. The collected specimens were examined using the FAT and the results were compared with the ones that were obtained from the heminested RT-PCR test. Furthermore, it was investigated the diagnosis of rabies in the decomposed specimens using the heminested RT-PCR.*

*In this study, 83 brain specimens to evaluate using FAT and 30 decomposed materials not to evaluate using FAT belonging to various animal species totally 113 brain specimens were used. 80 of these specimens were found to be positive using FAT while 3 of them being negative using FAT. All of these specimens were obtained from the rabies diagnosis laboratories belonging to the Ministry of Agriculture and Rural Affairs.*

*Among the 80 specimens that were found to be positive using FAT, 49 of them were determined to be positive using RT-PCR (61,25%) while all of these 80 specimens were found to be positive using heminested RT-PCR (100 %). The 3 specimens that were found to be negative using FAT, all of them were found to be negative using RT-PCR and heminested RT-PCR. 4 of the 30 decomposed brain specimens were determined to be positive (13,33%) using RT-PCR and 6 of them found to be positive using heminested RT-PCR. If the results of the brain specimens that have been used for experimental purposes and animals that have been injected with rabies virus (3 animals) are excluded, these rates are 3,7% and 11,11% respectively in the decomposed materials. Among the 6 decomposed specimens were found to be positive using heminested RT-PCR, 3 of them were obtained from the İstanbul Pendik Veterinary Control and Research Institute, the other 3 of them were used for experimental purposes and vaccine production in Etlik Central Veterinary Control and Research Institute.*

**Key Words:** *Rabies, RT-PCR, Heminested RT-PCR, Diagnosis.*

## **GİRİŞ**

Kuduz hastalığı, bazı ada ülkeleri ve sıkı karantina, kontrol programlarının uygulandığı birkaç ülke hariç tutulacak olursa, günümüzde tüm dünyada insanları tehdit etmeye devam etmektedir (13). Kuduz virusu tüm sıcakkanlı hayvanları enfekte edebilme yeteneğine sahiptir (2, 3, 12). Ne yazık ki Pasteur'ün maruz kalma sonrası başarılı bir tedavi göstermesinin üzerinden 100 yıldan fazla bir süre geçmesinden sonra, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1998 yılında yayınlanan raporuna göre kuduzdan yıllık ölüm sayısı 60 000'dir ve 50 milyon

insan maruz kalma sonrası aşılanmaktadır (22). Bununla beraber King ve Turner (16) tarafından bildirildiğine göre yayınlanan bu rakamlar gerçek rakamların sadece küçük bir parçasıdır. 1989 yılında Hindistan'da 288 vaka bildirilmişken, gayri resmi olarak gerçek rakamın 25 000 ya da daha fazla olduğu bildirilmektedir (16). WHO tarafından 1992 yılında Dünya çapında yapılan survey sonuçlarına göre şekillenen vakaların % 97'si Asya kıtasındadır (23). Afrika ve Asya'da belirli ülkelerde yapılan karşılaştırmalı istatistik hesaplamalara göre, 1.000.000 insan ve 100.000 hayvan esas alındığında, her 2.500 insan tedavisinde yıllık

ortalama 4 insan ve 60 köpek ölümü şekillenmektedir (4). Kuduzdan ölenlerin tamamına yakın bir kısmı, dünya nüfusunun yaklaşık %75 inin yaşadığı tropik bölgelerde olmaktadır (16).

İlk zamanlardan günümüze teşhisin kolayca konulması amacı ile kuduzun insan ve hayvanlardaki klinik belirtileri gözlemlenmiş ve kaydedilmiştir. Kuduzda klinik semptomlar birçok olguda karakteristik olmasından dolayı teşhiste oldukça yardımcıdır (7, 16). Kesin teşhis sadece laboratuvar muayeneleri ile yapılabilir (5, 7, 9). Son yıllarda, hücre kültürü teknolojisinde, immünokimyasal çalışmalarda ve periferik sinirlerin ve dokuların kuduzun teşhisi için kullanılmasında önemli gelişmeler olmuştur. Monoklonal antikor teknolojisindeki gelişmeler ile kuduz ve kuduz benzeri virusların ayrılması sağlanabilmiştir. Bir çok gelişmiş ülkede temel rutin teşhis metodu olarak FAT ve deneme hayvanı veya hücre kültürüne inokulasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak bunun yanında çeşitli neden ve zorluklardan dolayı farklı metotlar da kullanılabilir. Çizelge 1.'de kuduzun teşhisinde kullanılan yöntemler verilmiştir (24).

Kuduzun laboratuvarında çabuk teşhisi, kuduz bir hayvan tarafından ısırılan insanların tedavilerinde izlenecek yol açısından çok

Çizelge 1. Kuduzun teşhisinde kullanılan yöntemler (24).

Doku cinsi	Taze dokudan	Fikse edilmiş dokudan
Beyin (CNS)	FAT, Fare İnokulasyon, Doku Kültürü İnokulasyon, Histopatoloji, Elektron Mikroskopisi, Enzimatik Bağlanma Esaslı Testler, RT-PCR*, Dot-Hibridizasyon*	FAT, Elektron Mikroskopisi, Enzimatik Bağlanma Esaslı Testler, RT-PCR*
Tükürük bezi	FAT	Elektron Mikroskopisi
Tükürük	Fare İnokulasyon, Doku Kültürü İnokulasyon, RT-PCR*	-
Cornea	FAT	-
Deri	FAT	-

\* Çizelgeye Ermine ve ark. (11), Whitby ve ark. (25), David ve ark. (8) ve Kulonem ve ark.'nın (17) yaptığı çalışmalar dikkate alınarak ilave edilmiştir.

önemlidir (6). Ayrıca salgın hastalıkların kontrolü ve gözetimlerinden sorumlu sağlık yetkilileri için de büyük önem taşımaktadır (6, 20).

Son 40 yılda kuduzun teşhisinde önemli gelişmeler olmuştur. Histolojik olarak Negri cisimciklerinin tespiti yerine FAT rutin kullanım alanı bulmuştur. Deneme hayvanı inokulasyonu (MIT) ve doku kültürüne inokulasyon yöntemleri (RTCIT) ile virus izolasyonu ise daha fazla ve kapsamlı etyolojik çalışmalara imkan vermiştir. RTCIT virus izolasyonunu ortalama 1 güne indirmiştir. Bu durum RTCIT'yi konfirmasyon testi yapmıştır. Sonraları Rapid Rabies Enzyme Immuno Diagnosis (RREID) geliştirilmiştir (21). Ermine ve ark. (11), Dot-Hibridizasyon tekniğini kullanarak spesifik kuduz virusu DNA'sını deneysel ve saha çalışmalarında tespit etmişlerdir. Ermine ve ark. (11) bu tekniğin belirli saha ve laboratuvar şartlarında kuduzun teşhisi için alternatif bir metot olabileceğini bildirmişlerdir. Sacramento ve ark. (21) kuduz virusu ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar ve teşhis çalışmalarında kullanılmak üzere hızlı, güvenilir ve spesifik bir Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi geliştirdiklerini açıklamışlardır. Takip eden yıllarda kuduz teşhisi ve moleküler epidemiyoloji konularında çalışmalar yoğunlaşarak devam etmiştir.

Bu çalışmada farklı disiplinlerde başarı ile kullanılmakta olan RT-PCR'ın, kuduz hastalığının teşhisinde kullanım olanağının araştırılmasının yanı sıra, özellikle kokuşmuş materyallerde bu yöntemin uygulanabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

Bu araştırma, Türkiye'de kuduz hastalığının tanısında RT-PCR yönteminin kullanıldığı ilk çalışmadır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Gereç

#### 1. Beyin Numuneleri

Çalışma materyalini, kuduz yönünden teşhis amacı ile Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığına bağlı diğer kuduz teşhis laboratuvarlarına (Pendik-İstanbul, Bornova-

İzmir, Erzurum, Bursa, Antalya) gönderilen, değişik hayvan türlerine ait 99 adet beyin numunesi ile Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde aşı üretimi, aşı kontrolü ve deneysel çalışmalarda kullanılan, tümü kuduz virusu ile enfekte edilmiş 7 köpek, 4 tavşan ve 3 keçiye ait toplam 14 beyin materyali oluşturdu (Çizelge 2). Kullanılan 113 beyin materyalinden 83 adedinin FAT ile değerlendirilebilir, 30 adedinin ise kokuşma nedeniyle FAT ile değerlendirmeye elverişsiz nitelikte olduğu belirlendi.

#### 2. Hücre Kültürü

CVS-11 (Challenge Virus Standard-11) suşunun üretilmesinde, Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarı stoklarında bulunan BHK-21 hücre kültürü kullanıldı.

*Çizelge 2. Çalışmada kullanılan materyallerin illere ve hayvan türlerine göre dağılımları.*

		İzmir	İstanbul	Bursa	Antalya	Ankara	Ankara <sup>a</sup>	Toplam	
								N	K
Köpek	N		14	19		13	7	53	
	K	2	11		1	7			21
Sığır	N		2	4		12		18	
	K								
Kedi	N		1					1	
	K				1	4			5
Koyun	N			3				3	
	K								
Tilki	N					2		2	
	K					1			1
Tavşan	N						3	3	
	K						1		1
Keçi	N						1	1	
	K						2		2
Hamster	N					1		1	
	K								
Sansar	N					1		1	
	K								
Toplam		2	28	26	2	41	14	83	30
G.Toplam				99			14		113

N : FAT ile test edilen materyaller. K : FAT ile test edilemeyen kokuşmuş materyaller

<sup>a</sup> Deneysel ve aşı üretim amacı ile Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde kullanılan hayvanlara ait beyin materyali.

### 3. Kontrol Virusu

BHK-21 hücre kültürüne adapte CVS-11 suşu kullanıldı. CVS-11 suşu Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarından temin edildi.

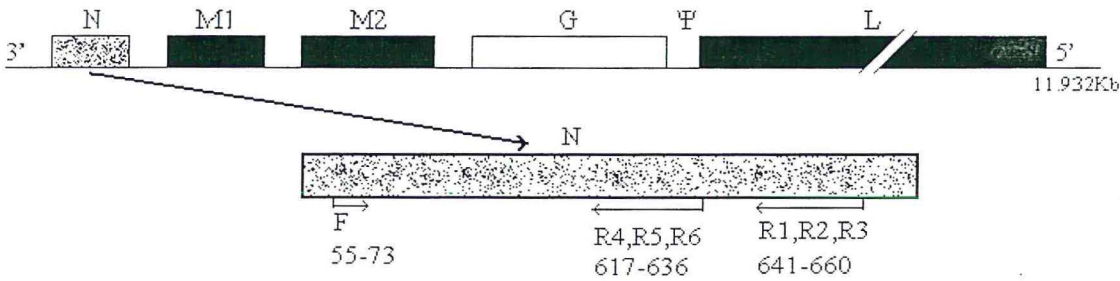
### 4. Oligonükleotid Primerler

Araştırmada, pozisyon ve dizinleri aşağıda bildirilen ve bütün kuduz viruslarının N genini tanımak üzere dizayn edilen primerler (Şekil 1.) kullanıldı (14).

konjugat Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edildi.

Floresan mikroskopta pozitif kontrol preparatı ile karşılaştırmalı olarak yapılan değerlendirme sonucunda, grimsi yeşil doku içinde büyüklü, küçüklü, filizi yeşil renkte, floresan veren cisimlerin tespit edildiği preparatlar müspet olarak değerlendirildi. Bu cisimler oval veya yuvarlak etrafı parlak yeşil, merkezine doğru parlaklığı azalan yapılar şeklinde tespit edildi.

Şekil 1. Primerlerin N geni üzerindeki pozisyonları (14).



<u>Primer</u>	<u>Dizin</u>	<u>Pozisyon</u>
F - JW12	5'- ATGTAACACC(C/T)CTACAATG -3'	55-73
R1 - JW6 (DPL)	5'- CAATTCGCACACATTTTGTG-3'	660-641
R2 - JW6 (E)	5'- CAGTTGGCACACATCTTGTG-3'	660-641
R3 - JW6 (M)	5'- CAGTTAGCGCACATCTTATG-3'	660-641
R4 - JW10 (DLE2)	5'- GTCATCAAAGTGTG(A/G)TGCTC-3'	636-617
R5 - JW10 (ME1)	5'- GTCATCAATGTGTG(A/G)TGTTTC-3'	636-617
R6 - JW10 (P)	5'- GTCATTAGAGTATGGTGTTC-3'	636-617

Bu primerler ile primer RT-PCR reaksiyonu sonunda 606 bp, heminested RT-PCR reaksiyonu sonunda ise 582 bp ürün gözlenmesi hedeflendi.

### Yöntem

#### 1. Floresan Antikor Tekniği (FAT)

Bu test Dean ve ark. (10) tarafından bildirilen yönteme göre yapıldı. Testte kullanılan

#### 2. RT-PCR ve Heminested RT-PCR

Heminested RT-PCR reaksiyonu Heaton ve ark. (14) tarafından bildirilen yönteme göre yapıldı. Çizelge 3.'de çalışmada kullanılan yöntemin aşamaları gösterildi.

Sonuçlar UV transillumunatör (UVP, USA) üzerinde değerlendirilerek fotoğraflama (Polaroid GelCam, UK) yapıldı. RT-PCR amplifikasyonu sonucunda 606 bp, heminested

Çizelge 3. Heminested RT-PCR'in aşamaları (14).

Aşamalar	Yapılan çalışma
1. aşama	Materyallerden RNA ekstraksiyonu
2. aşama	RNA' lardan cDNA' ların sentezlenmesi (reverse transcription)
3. aşama	RT-PCR amplifikasyonu
4. aşama	RT-PCR amplifikasyon sonuçlarının değerlendirilmesi (agaroz jel elektroforez ve fotoğraflama)
5. aşama	Heminested RT-PCR amplifikasyonu
6. aşama	Heminested RT-PCR amplifikasyon sonuçlarının değerlendirilmesi (agaroz jel elektroforez ve fotoğraflama)

RT-PCR amplifikasyonu sonucunda 582 bp bölgelerinde spesifik bantların şekillenmesi beklenildi (14).

## BULGULAR

### 1. Floresan Antikor Testi Sonuçları

Çalışma materyalini oluşturan değişik hayvan türlerine ait 113 adet beyin numunesinden, kokuşma nedeni ile FAT ile test edilmeye uygun olmayan 30'unun haricindeki 83 adedi FAT ile kuduz virusu yönünden test edildi. Bunlardan 80 adedi FAT ile pozitif, 3 adedi de FAT ile negatif olarak saptandı.

### 2. RT-PCR ve Heminested RT-PCR Sonuçları

Çalışmada kullanılan 113 materyalden 53 adedinde RT-PCR ile ve 86 adedinde de heminested RT-PCR ile viral nükleik asit tespit edildi (Çizelge 4.).

WHO'nun kuduz hastalığının teşhisi için önerdiği FAT ile değerlendirilen 83 materyalle ilgili RT-PCR ve heminested RT-PCR sonuçları FAT ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde; FAT ile kuduz müspet değerlendirilen 80 materyalden 49 adedinde (% 61,25) RT-PCR ile tamamında da (% 100) heminested RT-PCR ile viral nükleik asit saptandı (Çizelge 4.). FAT ile kuduz virusu yönünden negatif olarak değerlendirilen 3 materyal ise RT-PCR ve heminested RT-PCR ile de negatif olarak değerlendirildi.

FAT ile değerlendirilemeyen 30 adet kokuşmuş beyin materyalinden 4 adedinde (% 13,33) RT-PCR, 6 adedinde de (% 20) heminested RT-PCR ile viral nükleik asit saptandı. RT-PCR ile viral nükleik asit tespit edilen 4 materyalin tümü heminested RT-PCR ile de aynı sonucu verdi (Çizelge 5.).

Çizelge 4. Test edilen materyallerin FAT ile karşılaştırmalı RT-PCR ve heminested RT-PCR sonuçları.

Tür	Materyal Sayısı	FAT Sonuçları			RT- PCR	Heminested RT-PCR
		Pozitif	Negatif	Elverişsiz	Pozitif	Pozitif
Sığır	18	18	-	-	8	18
Tilki	3	2	-	1	-	2
Köpek	74	45+7 <sup>a</sup>	1	21	36	55
Kedi	6	1	-	5	-	1
Hamster	1	-	1	-	-	-
Tavşan	4	3 <sup>a</sup>	-	1 <sup>a</sup>	4	4
Sansar	1	-	1	-	-	-
Keçi	3	1 <sup>a</sup>	-	2 <sup>a</sup>	3	3
Koyun	3	3	-	-	2	3
Toplam	113	69+11 <sup>a</sup>	3	27+3 <sup>a</sup>	53	86

<sup>a</sup> Deneysel ve aşı üretim amacı ile kullanılan hayvanlar.

Çizelge 5. FAT ile pozitif materyallerin RT-PCR ve heminested RT-PCR sonuçları

Tür	FAT Pozitif	RT-PCR Pozitif	Heminested RT-PCR Pozitif
Sığır	18	8	18
Tilki	2	-	2
Köpek	45+7 <sup>a</sup>	36	52
Kedi	1	-	1
Hamster	-	-	-
Tavşan	3 <sup>a</sup>	3	3
Sansar	-	-	-
Keçi	1 <sup>a</sup>	1	1
Koyun	3	2	3
<b>Toplam</b>	<b>69+11<sup>a</sup></b>	<b>49</b> (% 61,25)	<b>80</b> (% 100)

<sup>a</sup> Deneysel ve aşı üretim amacı ile kullanılan hayvanlar.

Heminested RT-PCR ile kuduz virusuna spesifik nükleik asit varlığı saptanan 6 kokuşmuş materyalden 3 adedi kuduz yönünden teşhis amacı ile laboratuvara (Pendik-İstanbul) gönderilen beyinlerdi. Diğer 3 adedi ise Etlık Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde kuduz aşı üretimi, kontrolü ve deneysel amaçlı çalışmalarda kullanılan kuduz virusu ile enfekte edilmiş hayvanlara ait beyin materyali idi. Deneysel enfekte edilmiş bu 3 hayvanın (1 tavşan, 2 keçi) ölümlerinden 24-48 saat sonra çıkartılan beyin materyalleri kokuşmuş olduklarından FAT ile test edilememelerine rağmen bu hayvanların kuduz virusu ile enfekte edilmesinden dolayı kuduzdan öldükleri ve beyinlerinde kuduz virusunun bulunduğu bilindiğinden, RT-PCR ve heminested RT-PCR'ın kuduz hastalığı tanısında kullanımının güvenilirliğinin incelenmesinde "kuduz nükleik asidi yönünden pozitif" materyal olarak değerlendirildi. Bu materyallerin tümünde heminested RT-PCR ile viral nükleik asidin saptanması, heminested RT-PCR'ın kokuşmuş

materyallerde güvenle kullanılabilceğini ortaya koydu.

Kokuşmanın heminested RT-PCR'da nonspesifik reaksiyon oluşturup oluşturmadığı incelenbilmesi için ise FAT ile negatif tespit edilen beyinlerden birisinden alınan 10 adet parça, kokuşma oluşturulabilmesi ve farklı süreleri (1. - 10. gün) takiben laboratuvara ulaşan materyallerde heminested RT-PCR'ın kullanılabilirliğinin araştırılması amacı ile 37<sup>0</sup>C'de inkube edildi. Bu 10 adet beyin parçasından her gün bir adedi etüvden alınarak heminested RT-PCR ile test edildi. 10 adet beyin örneğinin tamamı hem RT-PCR ve hem de heminested RT-PCR ile negatif tespit edildi.

Kuduz hastalığının tanısı amacı ile laboratuvara gönderilen ve kokuşma nedeni ile FAT ile değerlendirilemeyen 27 adet beyin materyalinin RT-PCR ve heminested RT-PCR ile kuduz nükleik asidi yönünden pozitiflik oranları ise sırası ile % 3,7 (1/27) ve % 11,11 (3/27) olarak saptandı (Çizelge 6.).

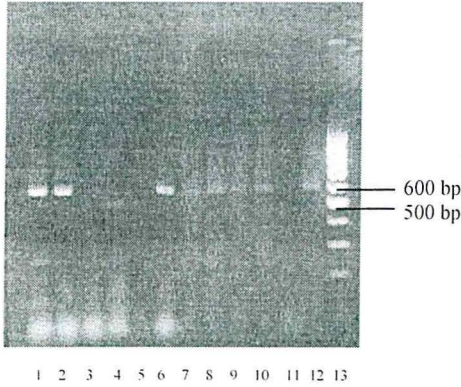
Çizelge 6. Kokuşmuş materyallerin RT-PCR ve heminested RT-PCR sonuçları

Tür	Materyal Sayısı		RT-PCR Pozitif	Heminested RT-PCR Pozitif
	A	B		
Tilki		1	-	-
Köpek		21	1	3
Kedi		5	-	-
Tavşan	1		1	1
Keçi	2		2	2
Toplam		27	1 (% 3,7)	3 (% 11,11)
	3		3 (% 100)	3 (% 100)
Genel Toplam	30		4 (% 13,33)	6 (% 20)

A: Deneysel ve aşı üretim amacı ile kullanılan hayvanlara ait beyin materyali

B: Teşhis amacı ile laboratuvarlara gönderilen hayvanlara ait beyin materyali

Kuduz müspet olgularda, RT-PCR amplifikasyon ürününün agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutulması ile 606 bp, hemnested RT-PCR amplifikasyon ürününün agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutulması ile de 582 bp bölgelerinde spesifik bantların oluştuğu görüldü (Şekil 2.)



Şekil 2. RT-PCR ve hemnested RT-PCR ürünlerinin değerlendirilmesi. 1 no. RT-PCR deneme kokuşmuş materyal, 2 no. RT-PCR materyal, 3 no. RT-PCR materyal, 4 no. RT-PCR kokuşmuş materyal, 5 no. RT-PCR negatif kontrol (distile su), 6 no. RT-PCR pozitif kontrol (CVS-11), 7 no. hemnested RT-PCR deneme kokuşmuş materyal, 8 no. hemnested RT-PCR materyal, 9 no. hemnested RT-PCR materyal, 10 no. hemnested RT-PCR kokuşmuş materyal, 11 no. hemnested RT-PCR negatif kontrol (distile su), 12 no. hemnested RT-PCR pozitif kontrol (CVS-11), 13 no. 100bp DNA merdiveni.

## TARTIŞMA

Hemen her kuduz olayından bir insanın etkilenmesi olasılığı bulunmasından dolayı kuduzun laboratuvarında çabuk ve doğru teşhisi insan sağlığı açısından çok önem taşımaktadır. Çoğu durumda etkilenen bireylere koruyucu aşı uygulanıp uygulanmayacağı konulan teşhisi belirlenmektedir (6, 20). FAT'nin geliştirilmesi ve bu testin kuduzun teşhisinde kullanılmaya başlanması ile teşhis laboratuvarları büyük bir rahatlığa kavuşmuşlardır. Halen WHO kuduzun teşhisi için FAT'ın en önemli

araç olduğunu belirtmektedir. Bunun yanında WHO kuduzun teşhisi açısından histopatolojik boyama yöntemleri ve deneme hayvanına inokulasyonu da önermektedir (28).

Kuduz şüpheli materyallerde virus miktarının çok düşük olması durumunda rutin teşhis metotları ile teşhis çok zor olmaktadır (18). Bu amaçla çeşitli amplifikasyon yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Nitekim son yıllarda, biyokimyasal yöntemleri kullanarak virus nükleik asitlerinin milyonlarca kez çoğaltılması temeline dayalı PCR yöntemlerinin kuduz hastalığının tanısında kullanılmasına ilgili çalışmalar oldukça yoğun düzeyde sürdürülmektedir.

Bir çok araştırmacı (8, 14, 21, 25, 27), karşılaştırmalı çalışmalara dayanarak kuduz hastalığının tanısında hemnested RT-PCR'ın WHO tarafından önerilen teşhis yöntemlerine alternatif olabileceği bildiriminde bulunmuştur.

Bu çalışmada, kuduz virusu yönünden WHO tarafından önerilen FAT ile müspet olarak değerlendirilen toplam 80 materyalden 49 (% 61,25) adedinde RT-PCR, 80 (% 100) adedinde de hemnested RT-PCR ile viral nükleik asit tespit edilmiştir. FAT ile negatif olan 3 adet materyal ise hem RT-PCR ile hem de hemnested RT-PCR ile negatif tespit edilmiştir. FAT pozitif ve negatif materyallerden elde edilen hemnested RT-PCR sonuçlarının FAT ile tam bir uyum (% 100) göstermesi, hemnested RT-PCR'ın kuduzun teşhisinde güvenle kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Kamolvarin ve ark. (15) 210 adet materyali FAT, fare inokulasyonu ve nested RT-PCR ile karşılaştırmalı test ettiklerini bildir-



mektedirler. Kamolvarin ve ark. (15), nested RT-PCR ile elde ettikleri verilerin FAT ve MIT ile bulunan sonuçları destekle: nitelikte olduğu vurgulayarak, materyal akışı yoğun laboratuvarlarda FAT için konfirmasyon testi olarak nested RT-PCR'in kullanılabilceğini belirtmektedirler. Yine Kamolvarin ve ark. (15) bu yöntemi FAT konfirmasyonunda kendi laboratuvarlarında MIT yerine kullanılmasını planladıklarını ve bu şekilde maruz kalma sonrası aşılamaalarda tasarruf sağlamak istediklerini özellikle vurgulamaktadırlar. Whitby ve ark. (25) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise kuduz ve kuduzla ilgili virusların hızlı teşhisi açısından heminested RT-PCR ve PCR-ELISA tekniklerinin karşılaştırıldığı, çalışılan 60 örneğin tamamının heminested RT-PCR ile tespit edilebildiği ve bu örneklerin kuduz virusuna ait 6 genotipi temsil ettiği bildirilmektedir. Whitby ve ark. (25) tarafından her iki test ile örneklerin tamamı kuduz pozitif olarak değerlendirilmiş, farklı sulandırma yöntemlerinin karşılaştırılması sonucunda PCR-ELISA'nın heminested RT-PCR'dan 100 kat daha hassas olduğu belirtilmiştir. David ve ark. (8) İsrail'de 20 yaşında bir askere, 7 yaşındaki bir kıza ve 58 yaşındaki bir erkeğe ait salya örneklerinden heminested RT-PCR ile kuduz tespit ettiklerini bildirmektedirler. Her üç olayda da hastalar hayatta iken teşhis konulduğu araştırmacılarca ifade edilmektedir: David ve ark. (8) tarafından, heminested RT-PCR'in kuduzun teşhisi açısından oldukça duyarlı bir test olduğu, bu tip şüpheli vakalarda teşhis yapılabilmesi ile hastane ortamında şüpheli hasta ile minimum temasın sağlanması yönünden önemli olduğu vurgulanmaktadır. Görüldüğü üzere, kuduzun teşhisi açısından RT-PCR, nested RT-PCR yada heminested RT-PCR'in

oldukça kullanışlı, güvenli, duyarlı ve hızlı olduğu farklı araştırmacılarca ortaya konulmaktadır. Araştırmacılarca (8, 15, 25, 26) tespit edilen sonuç ve tavsiyeler bu çalışmadan elde edilen veriler ile de desteklenmiştir.

Birçok çalışmada, FAT ile nested RT-PCR ve heminested RT-PCR arasında yüksek uyum bildirilmiş olmasına karşın, FAT ve RT-PCR'in karşılaştırılmalı olarak kullanıldığı çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir (8, 14, 25). Sacramento ve ark. (21) tarafından yapılan bir çalışmada da RT-PCR, FAT ve RTCIT arasında, Kulonen ve ark. (17) tarafından yapılan bir çalışmada Carnoy solusyonu ve parafinle bloklanmış 24 adet beyin dokusunda FAT ile RT-PCR arasında ve Heaton ve ark. (14) tarafından yapılan çalışmada RT-PCR ve heminested RT-PCR arasında benzer sensitivite ve spesivite tespit edildiği bildirilmiştir. Buna karşın Kulonen ve ark. (17) tarafından yapılan çalışmada farklı bir primer seti kullanılmak sureti ile yapılan RT-PCR ile FAT'nin karşılaştırılması sonucu iki yöntem arasında % 67 oranında uyum belirlendiği bildirilmektedir. Bu çalışmada da FAT ile kuduz yönünden pozitif olarak saptanan materyallerden yalnızca % 61,25'inde RT-PCR ile viral nükleik asit tespit edilebilmiştir. Bu noktada RT-PCR'da kullanılan JW 12 ve JW 6 primer kombinasyonunun Türkiye'de mevcut saha kuduz viruslarını tam olarak tanıyamadığı düşüncesine varmak olasıdır.

Kuduz hastalığının teşhisinde WHO tarafından önerilen klasik teşhis metotları ile (testlerde verdikleri yanlış pozitif sonuçlar nedeni ile) kokuşmuş materyallerden teşhis imkanı bulunmamaktadır. Bu tip vakalar yürürlükteki kanun ve yönetmeliklere göre kuduz

hastalığı yönünden müspet olarak değerlendirilmekte ve ona göre işlem yapılmaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar bu tip materyallerin teşhisinde heminested RT-PCR'in oldukça kullanışlı olabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada test edilen FAT ile değerlendirilemeyen 30 adet materyalden 4 adedinde RT-PCR ile (%13,33) ve 6 adedinde de heminested RT-PCR ile (% 20) viral nükleik asit saptanmıştır. Bu materyallerden 3 adedi Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde kuduz virusu ile enfekte edilen hayvanlardan sağlanmıştır. Kokuşmuş kontrol pozitif olarak değerlendirilen bu materyallerden RT-PCR ve heminested RT-PCR ile viral nükleik asit tespiti, kokuşmuş materyallerden kuduzun teşhisinde heminested RT-PCR'in güvenle kullanılabilmesini göstermektedir. Ayrıca negatif materyallerden bir adedinin parçalanarak 10 gün süre ile 37<sup>0</sup>C'de inkube edilmesi ile her gün bir adedinin heminested RT-PCR ile test edilmesi ve hepsinden de negatif sonuç alınması nonspesifik sonuç riskini de ortadan kaldırmıştır. Benzer olarak, Kamolvarin ve ark. (15) uyguladıkları nested RT-PCR ile 72 saate kadarki normal hava koşullarında bekletilen materyallerde de viral nükleik asidin saptanabileceğini belirtmektedirler. Whitby ve ark. (26), FAT ile negatif tespit edilen beynin % 20 dimethyl sulfoxide (DMSO) içinde sözkonusu çalışmada kullanıncaya kadar saklandığını (6 yıl) ve bu nedenle nested RT-PCR tekniğinin kokuşmuş materyallerde de kullanılabilmesini belirtmektedirler. Ayrıca Heaton ve ark. (14) FAT ile kuduz pozitif materyallerden deneysel kokuşma oluşturduklarını (37<sup>0</sup>C'de 0, 24, 72, 120, 168 ve 360 saatte) ve bunların tamamından heminested RT-PCR ile viral nükleik asidi tes-

pit ettiklerini bildirmektedirler. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ve birçok araştırmacı (14, 15, 25, 26) tarafından bildirilen sonuçlar heminested RT-PCR'in kokuşmuş materyallerden kuduzun teşhisinde kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.

Bu bulgulara dayanılarak, kuduz teşhisi amacıyla laboratuvarlara gönderilen materyallere (27 adet) ilgili heminested RT-PCR sonucu değerlendirildiğinde, olguların sadece % 11,11'inin "kuduz pozitif" olduğu görülmektedir. Başka bir ifade ile söylemek gerekirse, kuduz teşhisi için değerlendirilemediği halde "pozitif materyal" işlemi gören % 88,89'luk bir popülasyonun durumunun heminested RT-PCR kullanımı ile açıklık kazanması, kuduz vakalarından sonra uygulanması zorunlu olan aşılama yönünden tasarruf sağlayarak gereksiz karantina önlemleri alınması zorunluluğunun ortadan kalkmasına neden olabilecektir.

Bu çalışmada uygulanan heminested RT-PCR amplifikasyonu için kullanılacak olan primerlerin seçiminde tüm kuduz virusu suşlarının en geniş yelpazede tanımlanabilmesi kriter olarak alınmıştır. Kullanılan primerler 6 farklı kuduz virusu suşunun N genini tanımak üzere seçilmiştir. Bu bakış açısı farklı araştırmacı gruplarınca da kabul görmektedir. Nitekim Heaton ve ark. (14) tarafından yapılan heminested RT-PCR'da da kullanılan primerlerin bütün kuduz virusu suşlarını tanımak üzere dizayn ettirildiği belirtilmektedir. Benzer olarak Arai ve ark. (1) yaptıkları çalışmada 11 farklı saha ve laboratuvar kuduz virusu suşunun RT-PCR ile tespit edilebilirliğini araştırdıklarını belirtmektedirler. Arai ve ark. (1), kullandıkları RT-PCR yönteminin araştırdıkları 11 farklı virus suşunu başarı ile

tespit edebildiğini, dolayısıyla seçilen primerlerin bütün suşları tanıyabildiğini ve bu yöntemin kuduzun teşhisi açısından WHO tarafından önerilen bir yöntem olmamasına karşın oldukça kullanışlı bir metot olduğunu vurgulamaktadırlar. Whitby ve ark. (25) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise kuduz ve kuduzla ilgili virusların hızlı teşhisi açısından FAT, heminested RT-PCR ve PCR-ELISA karşılaştırılmış, 6 genotipi temsil eden 60 örneğin tamamının RT-PCR ile tespit edilebildiği bildirilmektedir. Farklı olarak Nadin-Davis (19) Kanada'da yaptığı bir çalışmada, Ontario bölgesinde görülen lokal suşları tanımak üzere seçtiği primerleri kullandığı suşa spesifik RT-PCR geliştirdiğini, elde ettiği sonuçların spesifik ve sensitif olduğunu belirtmektedir. Görüldüğü gibi belirlenen amaca göre tüm kuduz virusu suşlarını tanımak üzere veya sadece belirlenmiş olanlarını tanımak üzere primerlerin RT-PCR'da kullanımı mümkündür. Bu durum moleküler epidemiyolojik çalışmalarda avantaj sağlamaktadır.

Bu çalışmada, FAT ile heminested RT-PCR sonuçlarının % 100 uyumlu bulunması, 6 farklı kuduz ve kuduz benzeri virus suşunun N genini tanımak üzere dizayn ettirilmiş primerlerin seçiminin Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan farklı türlerdeki kuduz vakalarının teşhisi için doğru bir yaklaşım olduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, uygun şartlarda laboratuvara getirilen örneklerde kuduz tanısı amacı ile heminested RT-PCR'ın amaca uygun primerlerin seçimi koşulu ile FAT ile benzer düzeyde güvenilirlik ile kullanılabilmesi belirlenmiştir. Bununla birlikte harcanan zaman, birim test maliyeti, sonucu etkileyen

kontaminasyon olasılığının olmaması, daha kısa sürede sonuç vermesi FAT için akla gelen üstünlükler olarak değerlendirilebilir. Ancak gelecekte moleküler çalışmalarda sağlanacak gelişmelerin teknolojiye aktarılması ile heminested RT-PCR'ın kuduz tanısında iyi bir alternatif yöntem olabileceğini söylemek mümkündür. Kokuşmuş materyaller yönünden yapılacak değerlendirmede ise heminested RT-PCR öne çıkmaktadır. Ancak kokuşmuş materyaller yönünden çalışılan örnek sayısının az olması nedeni ile çok sayıda materyal ile yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

## **SONUÇ**

Bu araştırmada, Tarım ve Köyişleri Bakanlığına bağlı Merkez, Pendik, Bornova ve Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüleri ile Bursa ve Antalya İl Kontrol Laboratuvarlarına kuduz yönünden muayene için gönderilen çeşitli hayvan türlerine ait toplam 99 adet materyal ile Etlık Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde aşı üretimi, aşı kontrolü ve deneysel çalışmalarda kullanılan, kuduz virusu ile enfekte edilmiş çeşitli hayvan türlerine ait toplam 14 materyalden RT-PCR yöntemi ile kuduz hastalığının teşhisi FAT ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Bu çalışma ile kuduzun tanısında RT-PCR yöntemi Türkiye'de ilk kez uygulandı.

Heminested RT-PCR'dan elde edilen bulgular, FAT ile değerlendirilebilen materyallerin FAT sonuçları ile karşılaştırıldığında, bu testin FAT ile % 100 uyumlu olduğu gözlemlendi. Aşı üretim ve kontrol çalışmasında kullanılan kuduz virusu ile enfekte edilmiş 3 adet hayvana ait kokuşmuş beyin materyalinden heminested RT-PCR ile viral nükleik asidin

tespit edilmesi, testin güvenilirliğini ortaya koydu. Elverişsiz olmaları nedeni ile WHO tarafından önerilen metotlarla teşhis konulamayan 27 adet materyalden 3 adedinden heminested RT-PCR ile viral nükleik asit tespit edilmesi ise bu testin özellikle bu tür olgularda teşhise yardımcı olabileceğini ortaya koydu.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, kuduz hastalığının teşhisinde heminested RT-PCR yönteminin Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilen bir teşhis metodu olmamasına karşın, alternatif bir yöntem olarak kullanılabilirliğini göstermiştir. Özellikle kokuşmuş materyallerde bu yöntemin kullanılması ile teşhiste yaşanan belirsizliğin ortadan kaldırılacağı kanaatine varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. ARAI, Y.T., YAMADA, K., KAMEOKA, Y., HORIMOTO, T., YAMAMOTO, K., YABE, S., NAKAYAMA, M., TASHIRO, M. (1997). Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabies virus variants using RT-PCR. *Arch. Virol.* **142** : 1787-1796.
2. BAER, G.M. (1990). Rabies virus. In: *Virus Infections of Ruminants*. Ed. : Z. Dinter, B. Morein, Amsterdam: Elsevier, p.: 393-404.
3. BAER, G.M., BELLINI, W.J., FISHBEIN, D.B. (1990). Rhabdoviruses In: *Fields Virology*. Ed.: B.N. Fields, D.M. Knipe, New York : Raven Press, p.: 883-930.
4. BLANCOU, J. (1988). Epizootiology of rabies : Eurasia and Africa. In : *Rabies*, Ed. : J.B. Campbell, K.M. Charlton, London : Kluwer Academic Publishers, p.: 243-299.
5. BLOOD, D.C., RADOSTITS, O.M. (1990). *Veterinary Medicine*. 7th Ed. London : Bailliere Tindall, p.: 919-925.
6. BOURHY, H., ROLLIN, P.E., VINCENT, J., SUREAU, P. (1989). Comparative field evaluation of the fluorescent antibody test, virus isolation from tissue culture and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *J. Clin. Microbiol.* **27** : 519-523.
7. BUXTON, A., FRASER, G. (1977). *Animal Microbiology*. Edinburgh : Blackwell Scientific Publication, p.: 553-567.
8. DAVID, D., RUPPRECHT, C.E., SMITH, J., SAMINA, I., PERL, S., STRAM, Y. (1999). Human rabies in Israel. *Emerging Infectious Diseases*. **5** (2) : 306-308.
9. DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISEN, H.N., GINSBERG, H.S. (1990). *Microbiology*. 4th. Ed. Philadelphia : J.B. Lippincott Comp. p.: 1035-1043.
10. DEAN, D.J., ABELSETH, M.K., ATANASIU, P. (1996). The fluorescent antibody test. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. Ed.: F.-X. MESLIN, M.M. Kaplan, H. Koprowski. 4th. Ed. Geneva : WHO. p.: 88-95.
11. 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.
12. FENNER, E., BACHMANN, P.A., GIBBS, E.P.J., MURPHY, F.A., STUDDERT, M.S., WHITE, D.O. (1987). *Veterinary Virology*. 1th. Ed. Orlando, Florida : Academic Press. p.: 534-541.
13. FU, Z.F. (1997). Rabies and rabies research : past, present and future. *Vaccine*. **15** : 20 - 24.
14. HEATON, P.R., JOHNSTONE, P., McELHINNEY, L.M., COWLEY, R., O'SULLIVAN, E., WHITBY, J.E. (1997). Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies related viruses. *Journal of Clinical Microbiology*. **35** (11) : 2762-2766.
15. KAMOLVARIN, N., TIREWATNPONG, T., RATTANASIWAMOKE, R., TIREWATNPONG, S., PANPANICH, T., HEMACHUDHA, T. (1993). Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. *Journal of Infectious diseases*. **167** : 207-210.
16. KING, A.A., TURNER, G.S. (1993). Rabies : A Review. *J. Comp. Path.* **108** : 1-39.
17. KULONEN, K., FEKADU, M., WHITFIELD, S., WARNER, C.K. (1999). An evaluation of immunofluorescence and PCR methods detection of rabies in archival carnoy-fixed, paraffin embedded brain tissue. *Journal Vet. Med. B.* **46** : 151-155.
18. McCOLL, K.A., GOULD, A.R., SELLECK, P.W., HOOPER, P.T., WESTBURY, H.A., SMITH, J.S. (1993). Polymerase chain reaction and other laboratory techniques in the diagnosis of long incubation rabies in Australia. *Australian Veterinary Journal*. **70** (3) : 84-89.

19. NADIN-DAVIS, S.A. (1998). Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. *Journal of Virological Methods*. **75** : 1-8.
20. PERRIN, P., SUREAU, P. (1988). A new immunoenzymatic test for the rapid laboratory diagnosis of rabies on field specimens (RREID) In: *Virus Diseases in Asia*. Ed. : P. Thongcharoen, E. Kurstak. Bangkok : Mahidol University. p.: 345-348.
21. SACRAMENTO, D., BOURHY, H., TORDO, N. (1991). PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Molecular and Cellular Probes*. **5** : 229-240.
22. T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI. (1998). Dünya Sağlık Raporu. Çeviri Ed. B. Metin, A. Akın, İ. Güngör. Ankara : Dış İlişkiler Dairesi Başkanlığı Yayınları. s.: 53-54.
23. TSIANG, H. (1995). Current concepts in Rabies. *Bull. Ins. Pasteur*. p.: 2-4.
24. WEBSTER, W.A., CASEY, G.A. (1988). Diagnosis of rabies infection. In: *Rabies*. Ed. : J.B. Campbell, K.M. Charlton. London : Kluwer Academic Publishers. p.: 201-221.
25. WHITBY, J.E., HEATON, P.R., WHITBY, H.E., O'SULLIVAN, E., JOHNSTONE, P. (1997a). Rapid detection of rabies and rabies related viruses by using RT-PCR and enzyme-linked immunodorbent assay. *Journal of Virological Methods*. **69** : 63-72.
26. WHITBY, J.E., JOHNSTONE, P., SILLERO-ZUBIRI, C. (1997b). Rabies virus in the decomposed brain of an Ethiopian Wolf detected by Nested RT-PCR. *Journal of Wildlife Diseases*. **33** (4) : 912-915.
27. WHITBY, J.E., HEATON, P.R., BLACK, E.M., WOOLDRIDGE, M., McELHINNEY, L.M., JOHNSTONE, P. (2000). First isolation of a rabies-related virus from a Daubenton's bat in the United Kingdom. *Veterinary Record*. **147** : 385-388.
28. WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1992). W.H.O. Expert Committee on Rabies, 8<sup>th</sup> report. Geneva : *W.H.O. Technical Series*. No. 824.