

KÖPEKLERDE KUDUZUN TANISINDA HİSTOPATOLOJİK, İMMÜNOPEROKSİDAZ VE İMMUNOFLORESAN YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI^x

Sevil (Atalay) Vural¹

The comparison of histopathological, immunoperoxidase and immunofluorescence techniques in the diagnosis of rabies in dogs

Summary: In the study the tissues of 10 rabies suspected dogs obtained from Pendik and Etilik Veterinary Control and Animal Diseases Research Institutes were used. The results are as follows: The nonspecific inflammatory reactions and degenerative changes detected by histopathologic method as regarding rabies were observed in the central nervous system, Gasserian ganglions and parotid glands (10 cases), adrenal glands (7 cases), and submandibular salivary glands (2 cases). The inclusion bodies were seen in the cornu ammonis and cerebellum (8 cases), thalamus (3 cases), nucleus caudatus and colliculus rostralis (1 case), also in the Gasserian ganglion (2 cases). In the immunoperoxidase staining method, extra and intra cellular rabies virus antigen and/or the inclusion bodies were seen in central nervous system of all dogs and Gasserian ganglion's cell body (9 cases). In addition, they were identified in ganglion cell layer of retina, submandibular salivary gland cells (2 cases), basal cells of cornea, epithelial cells of parotid gland and ductus, intramural ganglion's cell body, kinocilium and nervous fibers of trachea, principal cells of stomach, plexus of intestine and mouth and nose, urinary bladder's epithelium, cells of hair follicule of ear and mouth skin, cells of nose mucosa, gland cells of nose and mouth mucosa (1 case), and kromaffin cells of adren (6 cases). In the immunofluorescence staining method, the rabies virus antigen was seen in central nervous system of all cases, parotid gland cells and its duct epithelial cells and hair follicule cells of skin (1 case). Equally positive results were obtained from the avidin-biotin peroxidase and indirect immunofluorescence methods which have been used for the first time in the diagnosis of rabies in formalin fixed and paraffin embedded tissues in Turkey. But the immunoperoxidase method appeared to be more advantageous for use in pathology laboratories since this method permitted the usage of high filtered sera as well as the usage of more simplified microscopes and the storage of stained slides for a long time.

Key words : Rabies, dog, immunoperoxidase, immunofluorescence, histopathology.

Özet: Çalışmada Pendik ve Etilik Veteriner Kontrol ve Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüleri'nden temin edilen 10 adet kuduz köpeğe ait doku blokları incelenmiş ve şu bulgular gözlemlenmiştir. Yangısal ve dejeneratif bulgular tüm hayvanlarda santral sinir sistemi, Gasserian gangliyonu ile parotis bezinde, 7 olguda böbreküstü bezlerinde ve 2 olguda ise submandibular tükürük bezlerinde saptanmıştır. İnklüzyon cisimcikleri 8 olguda komu ammonis ve serebellumda, 3 olguda talamus, 1 olguda nukleus kaudatus ve kollikulus rostralis, 2 olguda da Gasserian gangliyونunun sinir hücrelerinde görülmüştür. İmmünoperoksidaz yöntemi ile yapılan incelemede tüm hayvanların santral sinir sistemi bölümlerinde, 9 olguda ise Gasserian ganglionlarında intra ve ekstrasellüler viral antijen partiküllerine ve/veya inklüzyon cisimciklerine rastlanmıştır. Ayrıca 6 olguda adrenin kromaffin hücrelerinde, 2 olguda retinanın sinir hücrelerinde, submandibular tükürük bezi epitel hücrelerinde, trakea kinosilyumları ve epitel hücreleri arasındaki sinirlerde, 1 olguda korneanın özellikle bazal tabakasındaki epitel hücrelerinde, submandibular tükürük bezinin intramural gangliyon sinir hücrelerinde, parotis bez ve kanal epitel hücrelerinde, midenin prensipal hücrelerinde, idrar kesesi epitel hücrelerinde, ağız, burun ve bağırsaklarda yer alan pleksuslarda, kulak ve ağız derisi kıl follikül epitelinde, burun mukozası epitel hücrelerinde, ağız ve burun mukozası bez epitel hücrelerinde viral antijen bulunmuştur. İmmunofloresan yöntemle incelenen tüm olgularda santral sinir sisteminin her bölgesinde ve Gasserian gangliyونunda, 2 olguda retinanın sinir hücreleri, 1 olguda parotis bezi ile kanal epitel hücrelerinde ve derinin kıl follikülü epitelinde viral antijeni belirleyen immunofloresan pozitif granüller bulunmuştur. Bu çalışmada ülkemizde kuduzun tanısında ilk defa formalin tesbili parafin bloklarda kullanılan avidin-biotin peroksidaz ve indirekt immunofloresan yöntemlerden eşit pozitif sonuç alınmıştır. Ancak yüksek titrelili serumlarla çalışılması, özel mikroskoba ihtiyaç duyulmaması ve boyanan preparatların uzun süre saklanması nedeni ile immunoperoksidaz yönteminin patoloji laboratuvarlarında kullanıma avantajının daha fazla olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler : Kuduz, köpek, immunoperoksidaz, immunofloresan, histopatoloji.

Geliş tarihi : 04.07.1999.

^x Aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir. Çalışma TÜBİTAK (VHAG-1119/ADP) nolu proje) tarafından desteklenmiştir.

¹ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, ANKARA.

Giriş

Kuduz (lyssa, rabies, lollwul, rage) insan ve kanatlılar dahil tüm sıcak kanlı hayvanlarda, santral sinir sistemi bulgularıyla ortaya çıkan akut seyirli, viral bir hastalıktır (Buxton ve Fraser, 1977; Blood ve ark., 1983; Shannon ve ark., 1988; Andrewes ve Walton, 1990). Tehlikeli bir zoonoz olduğu için önem taşır.

Hastalığın tedavisi yoktur, önlem alınmadığı takdirde daima ölümlü sonuçlanır. Aşılamayla alınan tek önlem ise hastalığı bulaştıran hayvanın gerçekten kuduz olup olmadığını en kısa zamanda ve en güvenilir yöntemle ortaya çıkarılmasına yani teşhise bağlıdır. Hastalığın tanısı Seller boyama, histopatolojik inceleme, fare deneme inokulasyonları ve immunohistokimyasal yöntemlerle yapılır. Seller boyama ve histopatolojik incelemelerde kornu ammonisteki nöronlar ile serebellumdaki Pürkinje hücrelerinde intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin (Negri) görülmesi patognomonik olarak kabul edilir (Blood ve ark., 1983; Jones ve Hunt, 1983; Jubb ve ark., 1985; Ulrich ve ark., 1985). Ancak Seller boyamanın % 69-100, histopatolojik incelemenin ise genellikle % 50-80 oranında pozitif sonuç vermesi güvenilirliği sarsmıştır (Goldwasser ve Kissling, 1958; Atanasiu ve ark., 1971; Koprowski, 1973; Tanzer, 1976; Anjaria ve Jhala 1985; Kotwal ve Narayan, 1987). Deneme inokulasyonlarının doğruluk oranı % 94-100 olmakla beraber uzun bir süreye (6-30 gün) gereksinim vardır (Maerdink, 1969; Kotwal ve Narayan, 1987; Zimmer ve ark., 1990; Ademoğulları, 1992). Birçok laboratuvarında uygulanan immunofloresan (IF) yöntemiyle kısa zamanda hastalığın tanısında % 87-100, immunoperoksidaz (IP) yöntemiyle % 87-98 gibi pozitif sonuç alınmıştır (Anjaria ve Jhala, 1985; Kotwal ve Narayan, 1985; 1987; Jayakumar ve ark., 1989; Zimmer ve ark., 1990). Immuno Floresan antikor yöntemi (FAT) en uygun yöntem olmakla beraber, pahalı ekipmana gerek duyulması nedeniyle dezavantajlıdır. Bu yüzden birçok hastalıkta olduğu gibi kuduzun tanısında da immunoperoksidaz yöntemi kullanılmaya başlanmıştır (Genovese ve Andral, 1978; Jayakumar ve ark., 1989).

Ülkemizde sıklıkla rastlanılmamakla birlikte kuduz hastalığının tanısı, immunofloresan yöntemin uygulandığı birkaç laboratuvar hariç Seller boyama, histopatolojik incelemeler ve farelerde deneme inokulasyonlarına dayanmaktadır. Bu çalış-

mada hastalığın tanısında histopatolojik, parafin blok kesitlerinde IP ve IF yöntemlerin değerlendirilmesi ve IP yöntemin laboratuvarında kullanılıp kullanılmayacağını araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma materyali, Pendik ile Etlik Veteriner Kontrol ve Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitülerinde nekropsileri yapılan 10 adet erkek köpeğin doku örnekleri ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden temin edilen kuduz müsbet 30 köpeğin kornu ammonis ve serebellumlarına ait doku bloklarından temin edildi.

Nekropsileri yapılan hayvanların santral sinir sistemi (kornu ammonis, nukleus kaudatus, talarnus, kollikulus rostralis, pons serebri, serebellumun vermis, medulla spinalis, medulla oblangata), Gasserian gangliyonu, parotis ve submandibular tükürük bezleri, mukoza ve deriden geçecek şekilde ağız ve burun kanadı, tonsiller, göz, ağız çevresi ve kulak derisi, larinks, trakea, akciğerler, kalp, dalak, karaciğer, safra kesesi, böbrekler, adrenler, pankreas, mide, ince bağırsaklar, reofaringeal ve mezenteriyel lenf düğümleri, idrar kesesi ve testislerinden alınan doku örnekleri % 10'luk tamponlu formolde tesbit edildi ve parafinde bloklandı. Her parafin blokta 4-6 mikron kalınlığında alınan kesitler (aynı blokta 4 kesit) histopatolojik incelemeler, immunohistokimyasal yöntemler ve kontrol için kullanıldı.

Histopatolojik incelemeler : Kesitler Hematoxilen-Eosin (HE); beyinde spongiyöz değişikliklerle karşılaşıldığı durumlarda da myelin yıkımının saptanması amacıyla luxol fast blue ile boyandı (Luna, 1960).

Immunoperoksidaz incelemeler : Bu yöntemde Shandon'ın antirabbit universal kitinden (Katalog no : 407300 / Pittsburg) faydalanılarak Avidin-Biotin Peroksidaz (ABC) yöntemi ile dokularda viral antijenler saptandı. Bu amaçla rutin olarak hazırlanan parafin bloklardan adezivli lama alınan kesitler 10 dakika 48°C'lik etüvde kurutuldu; ksitlerde deparafinize edilip 100, 96, 80 ve 70°'lik alkol serilerinden de geçirilerek dehidre edildi. Üç kez beşer dakika PBS (Phosphat Buffer Saline) içinde yıkandıktan sonra % 0.02 kalsiyum diklorit ihtiva eden % 0.25'lik tripsin solüsyonunda tripsinize edildi ya da aynı amaç için kullanılan % 0.1'lik pronaz so-

lasyonuna konularak 45°C'lik etüvde 30 dakika bekletildi. Üç kez beşer dakika PBS içinde yıkandı. Oda ısısında 5 dakika % 3'lük hidrojen peroksit tutuldu ve 2 kez PBS içinde beşer dakika yıkandı. Kesitler nemli kamaraya alındı ve üzerlerine normal keçi serumu damlatılıp 20 dakika 45°C'lik etüvde bekletildi. Serum dökülerek hiperimmün serumla¹ (1/500 sulandırma) 45°C'lik etüvde 2x20 dakika inkube edildi. Kesitler 2 kez PBS içinde 5 dakika yıkandı. Biotinize sekonder antikor damlatılarak nemli kamara içinde 45°C'lik etüvde 20 dakika tutuldu. PBS içinde beşer dakika 2 defa yıkanan kesitler, üzerlerine % 1.2'lik hidrojen peroksit damlatılarak bu kez oda ısısında 20 dakika bekletildi. Bundan sonra Streptavidin-peroksitaz damlatılıp 45°C'lik etüvde 20 dakika tutularak yeniden PBS'te yıkandı. Nihayet kesitler 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) 7 dakika tutulduktan sonra 2 kez 5 dakika deionize suda yıkandı ve Mayer's hemaloksilen boyasında 1 dakika tutulup çeşme suyu altında yıkandı ve kapatıldı.

İmmunofloresan incelemeler : Bunun için indirekt immunofloresan yöntemi uygulandı. Kesitlerin boyamaya hazırlanmasında uygulanan deparafinizasyon, dehidrasyon ve tripsinizasyon işlemleri burada da peroksitaz yöntemindeki sırayı izledi. Kesitler aynı hiperimmün serum¹ (1/100 sulandırma) ile 45°C'lik etüvde, nemli kamarada 2x20 dakika inkube edildikten sonra 3 kez beşer dakika PBS ile yıkanıp üzerlerine keçiye tavşan IgG'sine karşı hazırlanıp fluoresceinisothiocyanate (FITC) ile işaretlenmiş anti-tavşan hiperimmün serum konjugatından (Sigma-F 6005) damlatıldı. Yeniden 45°C'lik etüvde 30 dakika tutuldu. Bu ikinci inkubasyondan sonra PBS ile yıkanan kesitler kapatıldı. Çevreleri parafin ile kaplanarak inceleninceye kadar buzdolabında saklandı.

İmmunoperoksidaz ve immunofloresan yöntem için hazırlanan kontrol preparatları da aynı prosedüre göre boyandı. Ancak hiperimmün serum yerine normal tavşan serumu kullanıldı.

Bulgular

Nekropsileri yapılan hayvanların tümünde hastalığı tanıttıcı makroskopik bulguya rastlanmamıştır.

Histopatolojik Bulgular : Etütün olgularda sinir sisteminde hiperemiyle karşılaşıldı. Lep-

tomeningeal ve Virchow Robin boşluklarındaki damarlarda çoğunluğu lenfosit, az sayıda makrofaq ve tek tük de plazmasitlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü (Tablo 1, Şekil 1). Bunlar kornu ammoniste hafif, sinir sisteminin diğer kesimlerinde ise orta veya şiddetli derecedeydi. Tüm olgularda, yoğunluk piramidal hücre bölgesi olmak üzere kornu ammonis, serebellum, talamus (Şekil 2), pons serebri, kollikulus rostralis, nukleus kaudatus, medulla oblongata ve çoğunlukla da dorsal kornular olmak üzere medulla spinaliste diffuz veya fokal olarak değişik derecede glia hücre proliferasyonu görüldü. Belirtilen bölgelerdeki bazı nöronlarda dejeneratif ve nekrotik değişiklikler şekillenmişti (Şekil 2 ve 3). Böyle nöronlar çekirdeklerini kaybetmiş, düzensiz kenarlı ve soluk pembe renkli sitoplazmaya sahipti. Bazılarının çevresini glia hücreleri çevirip satellitosis şekillenmişti. Bir kısmı ise nöronofajiye (Şekil 2 ve 4) uğrayarak yerlerini, nöron kalıntısı ile glia hücrelerinin bulunduğu odaklara veya tamamen fokal glia hücrelerinden oluşmuş Babes nodüllerine terk etmişti.

Intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerine çoğunlukla kornu ammonis (Şekil 5) ve serebellumda (Şekil 6) rastlandı. Bunlardan 6 olayda her ikisinde, ikişer olayda ise yalnız birinde lokalize olmuştu. Bunlarla birlikte talamusta 3, kollikulus rostralis (Şekil 3) ve nukleus kaudatusunda birer, Gasserian gangliyonunda da 2 olguda inklüzyon cisimciği vardı. Bunlar değişik büyüklükte, oval veya yuvarlak şekilli, pembe renkli olup kimisinin çevresinde açık renkli dar bir alan bulunuyordu ve bir hücrede genellikle tek bazen birden fazlaydılar. İnceleme sırasında bazı cisimciklerin akson veya dentritlere doğru uzandığı da görüldü.

Bir olguda kollikulus rostraliste (Şekil 3), 2 olguda da Gasserian gangliyonundaki bazı nöron sitoplazmalarında vakuoller dikkati çekti. Ayrıca ikişer olguda serebellum ve kollikulus rostralisin substantia albasında, 3 olguda da nukleus kaudatusun substantia alba ve grizeasında fokal alanlar halinde, sınırlı ve içleri boş spongiyöz değişiklikler fark edildi. Luxol fast blue ile boyamada bunlar, mavi renk alan miyelinize alanlar arasında, boya almamış boşluklar halinde görüldü. Serebellumda bu bölgeler, ayrıca diffuz dağılım gösteren hafif glial hücre artışı ve damarlar çevresinde de belirgin mononükleer hücre infiltrasyonlarıyla bezenmişti.

Yukarıdaki bulgular dışında, 2 olguda kornu

¹ Dr. Alex Wandeler aracılığı ile Centre of Expertise for Rabies Agriculture Canada Animal Disease Research Institute Nepean, Ontario'dan temin edilmiştir.

ammonisin korteks serebrisinde. 1 olguda kollikulus rostralis meninklerin altında, 3 olguda nukleus kaudatusun substantia alba ve grizeasında. 2 olguda da Gasserian gangliyonundaki aksonlar boyunca kanama alanlarına rastlandı. Ayrıca tüm olgularda Gasserian gangliyonunda değişik şiddette dejeneratif değişiklikler ile bazı sahelerde hem sinir hücreleri etrafında hem de aksonlar boyunca aralarında az sayıda makrofaj ve lek lük de plazmasitlerin bulunduğu yoğun lenfosit infiltrasyonu fark edildi (Tablo 1).

Sekiz olguda paraliste bazı bez lümenlerinin seçilemediği ve epitel hücrelerinin hacimce azaldığı, bez kanallarının eozinofilik kitleyle dolduğu saptandı. Bir hayvanın kanal epitelleri kısmen hiperplazikli ve etraflarında da aralarında nötrofil lökositlerin de bulunduğu lenfosit hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Stroma hafif ödemliydi.

Submandibular tükürük bezlerinde 2 olguda bez ve kanallar çevresinde hafif şiddette lenfosit infiltrasyonuna rastlandı. Bunlardan birinde ayrıca kanal epitelleri de hiperplazikli ve interlober interstitiyumdaki birkaç gangliyon hücresinin kenarlarının düzensiz, sitoplazmasının soluk veya homojen koyu pembe renge boyandığı, çekirdeğinin kaybolduğu, bir kısmının nöronofajiye uğradığı, kısmen sağlam kalanların çevresinde ise satellitosis şekillendiği dikkati çekti.

Yedi köpekte böbreküstü bezlerinin medullasında çoğunlukla lenfositlerden ibaret mononükleer hücre infiltrasyonu karşılaşıldı. Bunlardan ikisinde kortikal ve meduller bölgelerde geniş kanama alanları görüldü. Ayrıca bunların birinde aksesuar kortikal nodüller vardı. Yine 1 hayvanda periadrenal gangliyonlardaki sinir hücreleri arasında da mononükleer hücreler bulundu.

Bunlar dışında, 1 köpekte gözün retinasının optik sinir telleri katında mononükleer hücre artışı ve ödem, farklı 2 köpekte ise lokal kanama alanları görüldü. Bir hayvanda enteritis, mide ve miyokarda lokal mononükleer hücre infiltrasyonu, fokal non-purulent interstitiyel nefritis, idrar kesesi epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon, tonsillerdeki lenfoid folliküllerde kanama ve nekroz, burun submukozasında kanama, 2 olguda da akciğerde ödem, interstitiyel pnömoni, lenf düğümündeki folliküller ile dalaktaki perianteriyel lenfoid dokularda, pankreasta ise akritıcı kanal epitellerinde hiperplaziye rastlanmışsa da bunlar hastalığın tanıtıcı bulguları arasına katılmamıştır.

Immunoperoksidaz Bulgular : Immunoperok-

sidaz boyamalarda, bütün olgularda kornu ammonis (Şekil 7), serebellum (Şekil 8), talamus (Şekil 9), pons serebri, kollikulus rostralis, medulla oblongata (Şekil 10), medulla spinalis ve nukleus kaudatusdaki (Şekil 11) nöronların birçoğunun sitoplazma, akson, dendritleri ile bunların nöropillerinde; 9 olguda da Gasserian gangliyonu (Şekil 12) hücrelerinde viral antijen varlığını gösteren, tuğla kırmızısı-kahverenginde, değişik büyüklükte, granüler yapıda, IP pozitif reaksiyon görüldü. HE ile boyamada bildirilen bölgelerde görülen inkluzyon cisimcikleri ise daha büyük, keskin sınırlı, açık sarı renkli homojen bir matrisle, tuğla kırmızısı granüller içeren yapıda veya granülsüz, diffuz kahverengi renkteydi. Bunun dışında kalan ve az antijen içeren nöron sitoplazması ise homojen solgun sarı renge boyanmıştı.

Kornu ammonisteki IP pozitif hücreler daha çok piramidal polimorf sinir hücreleriyle moleküler tabakadaki küçük hücrelerdeydi. Öte yandan aksonların aksoplazmasında da antijen varlığını belirleyen IP pozitif tesbih tanesi gibi sıralanmış granüller görüldü. Yine bu yöntem aracılığıyla antijen içeren benzeri granüller ve birkaç inkluzyon cisimciği, nöropil ile polimorf sinir hücreleri içinde de saptandı.

Serebellumda da viral antijen varlığını kaptıran IP pozitif reaksiyonla karşılaşıldı. Bunlar Pürkinje hücrelerinde az sayıda, IP pozitif küçük granüler yapıda görülürken solum granülözumdaki sinir hücrelerinin etrafında loz serpilmiş gibi çok sayıda, sınırlı boyamalardan ibaretti. Ayrıca serebellar pedünkül nöronları ile serebellum, talamus, pons serebri, kollikulus rostralisin nöronları ve bazen de substansia albarındaki glia hücrelerinin etrafında ya loz serpilmiş ya da lapa gibi çok sayıda ve sınırlı IP pozitiflik saptandı. Nukleus kaudatus, medulla oblongata ve medulla spinalisteki akson ve dendritlerde görülen pozitiflik, sayı ve boyanma derecesi bakımından orta derecedeydi. Dokuz olguda Gasserian gangliyonundaki nöron ve bazen de sinir tellerinde pozitif reaksiyonla karşılaşıldı. Bunlardan 6 olguda perikaryonda orta şiddette bir reaksiyon karakterindeyken, 3 olguda nöronlarda ve daha çok da sinir telleri boyunca diffuz soluk sarı renkli yayıl IP pozitiflik saptandı (Tablo 1).

Histopatolojik değişikliğe sahip 6 olguda böbreküstü bezlerindeki kromaffin hücrelerinde, göz retinasındaki birkaç nöron sitoplazması ile 1 hayvanın korneasında ve çoğunlukla bazal epitel hücrelerinde, 2 olguda submandibular tükürük bez-

lerindeki seröz bezler ile bunların inter ve intralobuler kanal epitellerinin sitoplazmasında ve ayrıca bunlardan birinin gangliyon hücreleriyle sinir tellerinde. 2 olguda trakeyadaki epitellerin kinosilyumlarında ve bazı epitel hücreleri ile sinaps yapan sinir tellerinde. birer olguda da parotisın bazı bez ve interlobuler kanal epitel hücrelerinde, midenin birkaç prensipal bez hücresi sitoplazmasında, bağırsakta sinir pleksuslarında, idrar kesesinde epitel hücrelerinin sitoplazmasında çekirdeğin bir kenarına yakın yerleşmiş konumda ve üzüm salkımı şeklinde, kufakla kıl follikülü epitel hücrelerinin sitoplazmasında ve sinir demetlerinde; ağız bez epitellerinin sitoplazmasında ve sinir tellerinde, burunun vestibular bölge kutan mukozası epitel hücre sitoplazmalarında ve sinir tellerinde difüz ve/veya granüler şekilde tuğla kırmızısı-kahverengimsi İP pozitif reaksiyona rastlanarak kuduz viral antijeni saptandı.

İmmünofloresan Bulgular : İmmünofloresan boyamalarda 10 olguda kornu ammonisde hem ekstrasellüler hem de piramidal (Şekil 13) ve Oriens katmanındaki sinir hücrelerinin sitoplazması, akson ve dendritlerinde, serebellumda Pürkinje hücreleri (Şekil 14) ile serebellar pedinkül ve stratum granulozum hücrelerinde, ayrıca talamus (Şekil 15), pons serebri, kollikulus rostralis, medulla oblongata (Şekil 16) ve medulla spinalisteki sinir hücrelerinin sitoplazma, akson ve dendritlerinde İP yöntemine göre daha az sayıda, granüler yapıda, parlak yeşil renkle boyanan İF pozitif viral antijenler gözlemlendi. Ancak medulla spinalis ve nukleus kaudatustaki boyanmalar beynin diğer bölgelerine göre daha az ve difüz, soluk yeşil renkte olup medulla spinaliste çoğunlukla çekirdek etrafında yığılım gösteren parlak yeşil renkte ve granüller şeklindeydi. Nukleus kaudatusta (Şekil 17) ise İF pozitif viral antijenler çoğunlukla periferik yakın nöron sitoplazmasında lokalize olmuştu. Sekiz olguda kornu ammonis ve serebellumda, 3 olguda talamus ve nukleus kaudatusta, 1 olguda ise kollikulus rostraliste saptanan inkluzyon cisimcikleri diğer viral antijenlere göre daha büyük, sınırlı ve parlaktı (Tablo 1).

Tüm olgularda serebellumun substansia albasında intra ve ekstrasellüler parlak yeşil renkli, Gasserian gangliyonunda ise sitoplazmada soluk yeşil renkte boyanan granüler yapıda, bunlardan 3 olguda da inkluzyon cisimciği görünümünde parlak yeşil renkli İF pozitif viral antijenler saptandı. Gasserian gangliyonunda benzer granüler antijenler hücre membranına yakın (Şekil 18), adeta bir çit oluşturur şekilde sateellit hücrelerinde de görüldü.

İkişer olguda retinada yer alan birkaç nöronun perikaryonunda, birer olguda da parotisın bez epitel hücrelerinde, kulak ve ağız çevresinden yapılan kesitlerde ise kıl foliküllerinin etrafında parlak yeşil renkte İF pozitif viral antijenler saptandı.

Arşiv doku blokları

Histopatolojik incelemelerde 30 hayvanın 27'sinde kornu ammonis ve serebellumda değişik şiddette ensefalitis ve/veya meningoensefalitis gözlemlendi. Kornu ammonisin piramidal, serebellumun Pürkinje hücre bölgesinde glia hücre proliferasyonu, nöron dejenerasyonları, nöronofaji ve az sayıda Babes nodülü çekti. Olguların 26'sında ise bu hücrelerde Negri cisimciklerine rastlandı. Negri cisimciği görülmeyen, ancak Etilik Veteriner Kontrol ve Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü'nce İF yöntemiyle boyanan birinin serebellumunda Negri cisimciği bulundu.

Arşivden elde edilen kornu ammonis ve serebellumlarla, nekropsileri yapılan hayvanların adı geçen organlarından alınan kesitlerin İP ve İF yöntemi ile boyanan kontrol kesitlerinde immüno pozitif sonuç alınmamıştır.

Tartışma ve Sonuç

Kuduzun histolojik tanısında ilk aşama, santral sinir sisteminde özellikle serebrum, beyin stemi, serebellum, bunun dışında da medulla spinalis ve Gasserian gangliyonunda nonpurulent meningoensefalitis veya ensefalitisten ibaret bir değişikliğin belirlenmesidir (Fischman, 1969; Feiden ve ark., 1988; Zimmer ve ark., 1990; Hamir ve ark., 1992). Değişikliklerin şiddet ve lokalizasyon sırası, karnivorlarda serebrum, kornu ammonis, talamus, kısmen de serebellum, pons ve medulla oblongatada yer alırken, herbivorlarda bunun tam tersi yönde geliştiği bildirilmiştir (Palmer ve ark., 1985). Her iki hayvan türlerinde olayların % 42'sinin pons ve medulla oblongatada daha şiddetli olduğunu belirten bildirimler (Zimmer ve ark., 1990) yanında, bunu tanıma dikkate değer bulmayan görüşler de kaydedilmiştir (Negri, 1903). Veriler çerçevesinde değerlendirilen hayvanların tüm sinir sisteminin her bölgesinde ve özellikle de kornu ammonis, serebellum, talamus, pons, kollikulus rostralis, nukleus kaudatus, medulla oblongata, medulla spinalisin dorsal gangliyonları, ayrıca Gasserian gangliyonunda değişik şiddette yangısal reaksiyonla karşılaşılmıştır.

Nöropildeki vakuollere ilkin 1984'te hastalığın histomorfolojik bulguları arasında değinilmiştir (Charlton, 1984). Deneysel olaylarda kokarca, tilki, doğal olaylarda da bunlara ek olarak at, kedi, inek ve koyunlarda hastalığın 2.-3. günlerinde veya daha erken döneminde sık ve şiddetli olarak beyinin talamus ve serebral korteksinde rastlandığı, ayrıca bölgedeki nöronlarda da vakuoller şekillendiği kaydedilmiştir (Charlton, 1988). Nöropilde luxol fast blue ile daha iyi seçilebilen vakuolleşmeyle karak-terize spongiyöz manzaraya, 2 olguda serebellum, serebellar pedinkül ve kollikulus rostraliste, 3 olguda da nukleus kaudatusda rastlanmıştır. Ayrıca birer olguda kollikulus rostralis ve Gasserian gangliyonlarındaki nöronların perikaryonunda vakuoller görülmüştür.

Benzeri vakuoller, spongiform ensefalopati ve diğer viral enfeksiyonlarda da gözlenmiştir (Johnson, 1983; Bundza ve Charlton, 1988; Foley ve Zachary, 1995). Bu bakımdan incelemede saptanan bu değişikliğin, tanısız değere sahip olmadığı düşünülmüştür. Immunsuprese kokarcalarda da bulunduğundan, etiyolojisinde immun reaktif olayların yer almadığı da bildirilmiştir. Ancak, çeşitli yoldan şekillenen dejeneratif olaylarda, metabolizma faaliyetleri ve sıvı akışını düzenleyen astrositlerin etkilenmesinin beyinde sıvı toplanmasına sebep olduğu ve bu yoldan myelin lamellerinin ayrılarak sekonder demiyelinasyonun şekillendiği klasik bilgiler arasında ifade edilmiştir (Charlton, 1988). İncelemede nöropildeki vakuollerin de böyle bir nedenden kaynaklanabileceği düşünülmüş ve bazı çalışmalarda orta derecede nötrofil infiltrasyonu ile birlikte serebellar nekrozdan da söz edilmesi (Sung ve ark., 1976; Fekadu ve ark., 1988b; Jackson ve ark., 1989) bu izlenimi güçlendirmiştir.

Sistemik incelemeler sırasında, diğer organ ve dokularda da yangısal veya distrofik değişikliklerin bulunacağı, beyinde yangısal değişiklik olmasa da Gasserian gangliyonunda rastlanabileceği belirtilmiştir (Jubb ve ark., 1985; Hamir ve ark., 1992). Yine bu bağlamda parotiste atrofi ve hiperplaziyle birlikte intersitisyumunda mononükleer hücre infiltrasyonundan (Ninomiya, 1955) söz edilmiş, benzeri hücre infiltrasyonunun hafif nekrotik değişikliklerle birlikte submandibular tükürük bezinde (Ninomiya, 1955; Balachandran ve Charlton, 1994) veya hiperemiyle birlikte adrenal bez medullasında da bulunacağı ve yangının göz ile deride belirgin olduğu (Balachandran ve Charlton, 1994) kaydedilmiş, derinin kıl folliküllerinde yangısal hücre infiltrasyonu (Fekadu ve Shaddock,

1984) gözlenmiştir. Çalışmada da parotis, submandibular tükürük bezi ve adrenal medullada buna benzer değişiklikler dikkatli çekmiş özellikle hayvanların tümünde Gasserian gangliyonunda yangısal reaksiyon görülmesi bu verileri destekler nitelikte bulunmuştur. Ayrıca, 1 köpekte göz retinasında ödem ve optik sinir telleri arasında mononükleer hücre infiltrasyonu, bir diğerinde fokal kanama nonspesifik bulgu olarak değerlendirilmiş ve virusun çoğu kez gözde de bulunacağı düşünüldüğünde yukarıdaki değişiklikler arasında hesaplanması gereği araştırmalara bırakılmıştır. Kuduz olaylarında esas hesaba katılmaması gerekenlerin enteritis, karaciğerde nekroz, fokal nonsuppuratif kolangitis ve bronşitis, intersitisyel miyokarditis, pnömoni, böbrekte nefritis ve mineral madde birikimi gibi hastalıkla ilgili olmayan nonspesifik bulgular olduğu bildirilmiştir (Castillon 1973; Fekadu ve Shaddock, 1984; Woolf ve Smith, 1986). Nitekim, inceleme sırasında birer olguda bağırsak, mide, miyokart, böbrek, idrar kesesi, tonsil, burun mukozası, 2 olguda akciğer, lenf düğümleri ve dalakta karşılaşılan değişikliklerin hastalıkla ilgili olmadığı düşünülmüştür. Ancak böyle bulguların dikkatleri başka yöne çekip, tanıyı güçleştirdiğini de göz önüne almak gerekir.

Histolojik tanıyı kesinleştiren patognomonik bulgu, intrasitoplazmik Negri cisimciklerinin görülmesidir (Negri, 1903). Negri cisimciklerinin çoğu kez karnivorlarda pons, medulla oblangata ve özellikle de kornu ammoniste; herbivorlarda ise pons ve medulla oblangata yanında özellikle serebellumda lokalize olduğu, nadiren glia hücrelerinde de görüldüğü ifade edilmiştir (Fekadu ve ark., 1982; Jubb ve ark., 1985; Palmer ve ark., 1985; Hamir ve Rupprecht, 1990; Zimmer ve ark., 1990; Hamir ve ark., 1992). Bildirimlerin aksine Negri cisimciklerinin, incelenen 10 köpekten altısında hem kornu ammonis, hem serebellumda, ikişer olguda yalnız birinde, 3 olguda talamus, birer olguda da nukleus kaudatus ve kollikulus rostraliste bulunduğu gözlenmiştir. İnklüzyon cisimciklerinin serebellumdaki miktarının, kornu ammonisten farklı olmadığı, pons, medulla oblangata ve glia hücrelerinde ise hiç yer almadığı görülmüştür. Bir kısım literatür bildirimlerini (Jubb ve ark., 1985; Zimmer ve ark., 1990; Hamir ve ark., 1992)de destekleyen bu bulgular, histolojik tanı için alınacak beyin örneklerinin seçiminde hayvan türü göz önüne alarak birkaç bölgeye odaklanmanın hatalı olduğunu, özellikle köpeklerde kornu ammonisle birlikte serebellumun da alınması gerektiğini göstermiştir.

Inkluzyon cisimciklerinin sinir sistemi dışında daha çok Gasserian ganglionunda, bazen de pankreas, dil, adrenal bez, paraadrenal bez ganglionları, retina (Jubb ve ark., 1985; Hamir ve ark., 1992) ile duodenumun submukozal pleksusunda (Hamir ve ark., 1992) bulunacağı kaydedilmesine karşılık, incelemede yalnız 2 olguda Gasserian ganglionunda inkluzyon cisimcikleri görülmüştür. Bu sonuçlar da inkluzyon cisimciklerinin sinir sistemi dışında her olguda görülmesinin şart olmadığını ve tanıda fazla önemi bulunmadığını düşündürmüştür. İnsan ve evcil hayvanlardan elde edilen sonuca göre, Negri cisimciklerinin bulunış oranının % 97'ye vardığı, deneysel fare inokülasyonlarında % 99'a çıktığı ve olayların % 80'inde yangının da bulunduğu ilade edilmiştir (Ademoğulları, 1992). Ancak, incelenen köpeklerin 10'unda yangıya rastlanılmasına karşılık, bunlardan 8'inde inkluzyon cisimciği bulunmuş, 30 kuduz olgusu olarak değerlendirilen arşiv bloklarında ise 27 yangısal olayın 26'sında Negri cisimciği görülmüştür. İncelenen materyal sayısının azlığı dikkate alınmakla birlikte, inkluzyon cisimciği miktar ile yangısal olayların her zaman aynı şekilde bağdaşmadığı düşünülmüştür. Nitekim, Negri cisimciklerinin yangısal değişikliklerle birlikte bulunış oranının genelde % 53 olduğu belirlenen veriler (Zimmer ve ark., 1990) de bu durumu destekler niteliktedir.

Çalışma ve literatür bilgilerinden çıkan sonuca göre histopatolojik tanıya yangısal reaksiyonların belirlenmesiyle değil Negri cisimciklerinin saptanmasıyla varılacağı görülmüştür. Yukarıda da belirtildiği gibi bunun da her olayda şekillenmeyeceği, yangısal değişikliklerin de diğer nonspesifik morfolojik değişiklikler yüzünden yanıtıya düşüleceği kanısına varılmıştır. Bu nedenden birçok çalışmada birleşilen ortak nokta, sağlıklı histomorfolojik tarrının immunohistokimyasal yöntemler uygulanarak dokuda virus antijeninin tesbitiyle mümkün olacağıdır (Zimmer ve ark., 1990).

Histokimyasal yonden dokuda spesifik kuduz virus antijeninin tesbiti IP (Levadit ve ark., 1971) ve IF (Goldwasser ve Kissling, 1958) yöntemleriyle sağlanır. Floresan antikor yöntemi, floresin ile bağlanmış antikor aracılığıyla taze olarak tuşe ve dondurulmuş (Goldwasser ve Kissling, 1958; Marie, 1962; Kawamura, 1977), gliserinde saklanmış (Barnard ve Voges, 1992), etanol ya da asetonla likse edilmiş (Goldwasser ve Kissling, 1958; Marie, 1962; Fischman, 1969; Palmer ve ark., 1985) doku kesitlerinde viral antijenin saptanması için uygun bir yöntemdir. Ancak enlekte

taze dokulardan hazırlanan smearlar aktif virus içerdiğinden tehlikeli görülmüştür (Wachendörfer, 1967; Fischman, 1969). Bu nedenle formolde likse edilip parafinde bloklanmış doku kesitlerinde virus antijeninin saptanmasına yönelik çalışmalara yer verilmiştir. Bu, aynı zamanda dokuların uzun zaman saklanmasına da olanak verip retrospektif çalışmalarda avantaj sağlar (Umoh ve ark., 1985; Hamir ve Rupprecht, 1990; Hamir ve ark., 1995). Dokunun morfolojik görünümü seçildiğinden viral antijen veya inkluzyon cisimciklerinin doku ve hücrede dağılımı kolaylıkla belirlenir (Goldwasser ve Kissling, 1958; Atanasiu ve ark., 1971; Fischman, 1969; Kotwal ve Narayan, 1985, 1987; Zimmer ve ark., 1990).

Anjaria ve Jhala (1985) parafin kesitlerde indirekt IF yöntemi uygulayarak pozitif olayların % 87-97 arasında değişeceğini göstermişlerdir. Diğer çalışmalarda bu oran % 98-100'dür (Kotwal ve Narayan, 1985; 1987; Zimmer ve ark., 1990). Nitekim bu çalışmada da tüm hayvanların beyinlerinin çeşitli bölgelerinde ve Gasserian ganglionunda intrasellüler ve/veya ekstrasellüler viral antijen ile bazı olgularda inkluzyon cisimciğinin görülmesi de bunu kanıtlamıştır. Bununla birlikte, rutin olarak fikse edilen materyalden hazırlanan kesitlerde, antijen denatüre olacağından reaksiyon tesbit edilememiş ve fikzasyonun uzunluğu oranında antijenin kaybolacağı bildirilmiştir (Schneider, 1964a; Schaaf, 1968). Palmer ve ark. (1985), 4 yıl boyunca sakladıkları dokuların histopatolojik incelemesinde yangısal reaksiyon ve Negri cisimciği görüp kuduz pozitif kabul etmelerine rağmen, IF ile her zaman pozitif sonuç elde edememişlerdir. Fischman (1969), parafinde bloklanan ve +4°C'de saklanan dokularda virusun 5 aydan fazla antijenlik özelliğini koruduğunu ileri sürmüştür. Çalışmada kullanılan 1980-Ağustos 1996 yıllarına ait 30 adet arşiv doku bloklarının 27 adedinde yangısal reaksiyona ve bunlardan 26 adedinde inkluzyon cisimciklerine rastlanmasına rağmen yapılan IP yöntem ve önceki araştırmalara uyumlu olarak IF yöntem ile viral antijen bulunamamıştır.

İmmunofloresan yöntemi aracılığı ile viral antijenin beyinde komu ammonis, serebellum, medulla oblongata ve postlakti ganglion hücrelerinde yerleştiği belirtilmiştir (Schaaf ve Schaaf, 1968; Schneider, 1964b). Fischman (1969), serebellumun moleküler katı boyunca, komu ammonis, beyin stemi ile medulla spinalis nöronlarında pozitif alanlar bulmuştur. Çalışmada literatür verilerine uygun olarak tüm hayvanların komu ammonisinin piramid ve polimorf sinir hücrelerinde, serebellumun

Pürkinje hücreleri ve stratum granulosum sinir hücrelerinde, serebellar pedünlük, kollikulus rostralis, talamus, pons serebri, nukleus kaudatus, medulla oblongata ve medulla spinalisteki nöronların perikaryon, akson ve dendritlerinde rastlanmıştır. Viral antijenler, genelde tüm beyin kesitlerinde ekstrasellüler olarak da görülmüştür. Ancak literatürdeki gibi serebellumun moleküler katında rastlanmamıştır.

Sinir sistemi dışında IF pozitiflik oranının parotis % 90'a (Schaaf, 1968), özellikle yüz derisi kıl follikül epitellerinde olmak üzere deride % 100'e vardığına (Blenden, 1974; Blenden ve ark., 1983) değinilmiştir. Ayrıca bunların çevresindeki sinir ağlarında da viral antijen varlığından söz edilmiştir (Correa-Giran ve ark., 1970; Blenden ve ark., 1983; Fekadu ve Shaddock, 1984). Farelerde deneysel enfeksiyon sonucuna göre korneada % 36-71,4 olduğu belirtilmiştir (Schneider, 1969; Fekadu ve Shaddock, 1984). Ancak bunun aksini belirten olaylarla da karşılaşmıştır. Zimmermann (1971), sinir sistemi ve tükürük bezleri dışında kornea, diğer doku ve organlarda rastlanmadığını, üstelik ölmüş hayvanlarda nonspesifik floresan veren partiküller yüzünden korneadan yanlış sonuç alınacağını kaydetmiştir. Viral antijenin dil tükürük bezleri sinirlerinde çok seyrek olduğuna dalak, böbrek, karaciğer, meme dokusu, kahverengi pigmentli yağ dokusunda ise hiç bulunmayacağına ilgili kayıtlarla da karşılaşmıştır (Fischman, 1969). İmmüno floresan incelemede, birer olguda kulak derisinin kıl follikülü epitelleri ile parotis bezinde, 2 olguda gözün retinal sinirleri dışındaki organ ve dokularda viral antijenin görülmemesi aynı doğrultudaki araştırmaları düşündürmüştür. İncelenen olgular farklı olmakla birlikte, erken dönemde öldürülen hayvanlarda beyin stemi dışında viral antijenin tesbit edilemeyeceği kaydı da virusun daha çok nerede aranması gerektiğini aydınlatmıştır.

İmmunoperoksidaz yöntemi kuduzda ilk defa Atanasiu ve ark. (1971) tarafından kullanılmıştır. Beyin örneklerinin parafin bloklardan hazırlanan kesitlerde, bu yöntem uygulanarak % 87-96 (Anjaria ve Jhala, 1985), % 95.3 (Kotwal ve Narayan, 1985; 1987), % 98 (Zimmer ve ark., 1990) oranında pozitif sonuç alınmıştır. Fekadu ve ark. (1988a) ile Hamir ve ark. (1992), medulla spinalis ve Gasserian ganglionundan hazırladıkları parafin kesitlerine bu yöntemin değişik bir modifikasyonu olan ABC yöntemini uygulayarak nöron sitoplazmasıyla uzantılarında viral antijen ve inklüzyon cisimcikleri saptamışlardır. Zimmer ve ark.

(1990) kaydedilen bölgelere pons ve medulla oblongatayı, Sinchaisri ve ark. (1992) ise talamus nöronlarını ilave etmişlerdir. Viral antijene komu amonisin özellikle piramidal, serebellumun da Pürkinje hücreleriyle stratum granulosumunda ve glia hücrelerinin etrafında rastlanmıştır (Fekadu ve ark., 1988a; Sinchaisri ve ark., 1992). Bunların tuğla kırmızısı renkte, diffuz, çoğunlukla granüler görünümde viral antijen veya normal ışık mikroskopunda belirlenen formdaki inklüzyon cisimcikleri halinde nöronların perikaryon, dendrit ve aksonlarında lokalize oldukları belirtilmiştir. Bu bulgulara uyumlu olarak çalışmada da IF'de olduğu üzere IP'de de her hayvan beyininin değişik bölgesindeki nöronların sitoplazmasında ve ayrıca IF'den farklı olarak serebellumun glia hücreleri çevresinde ve 9 olayda da Gasserian ganglionunda kuduz viral antijeni ve/veya inklüzyon cisimcikleri saptandı. Ancak literatürlerin (Charlton ve ark., 1988; Feiden ve ark., 1988; Fekadu ve ark., 1988a) aksine leptomeningeal hücreler, ependimal ve pleksus hücreleri, damar endotel hücreleri, perivasküler lenfositler ve spongiyöz değişiklikler saptanan beyin bölümlerinde viral antijenlere rastlanmamıştır.

Bu yöntemle sinir sistemi dışındaki organ ve dokularda da viral antijenler saptanmıştır. Balachandran ve Charlton (1994), viral antijeni submandibular tükürük bezlerinde ve intersitisyel dokudaki ganglionlar ile sinir demetlerinde, adrenlerin kortiko-medullar sınırında ve buradaki kromaffin hücreleri ile intersitisyel sinir fibrillerinde ve ayrıca göz kornea epitelinde özellikle de bazal hücrelerde görmüşlerdir. Yine Balachandran ve Charlton (1994) ağız bölgesi derisinin özellikle stratum bazale hücreleriyle kıl folliküllerinde IP pozitif viral antijenler bulmuşlardır. Ayrıca parotis bezi epitelleriyle ganglion hücrelerinde, pankreas ve bağırsakta da aynı şekilde viral antijen ve inklüzyon cisimciği saptanmıştır (Fekadu ve ark., 1988a). Fekadu ve Shaddock (1984) antijen pozitifliğinin deride % 36.8 olduğunu, fakat tükürük bezlerinde saptanan virusun, deride de her zaman bulunmayacağı kanısına varmışlardır. Çalışmada da literatür verilerini destekler nitelikte 6 olguda adrenal medulladaki kromaffin hücrelerinde, biri intramural ganglionlarında olmak üzere 2 olguda submandibular tükürük bezi epitellerinde ve yine biri korneada olmak üzere 2 olguda göz retinasının sinir hücreleri ve tellerinde, kornea epitellerinde, trakeyanın kinosilyumları ve epitel hücreleri arasında, birer olguda kulak derisi kıl follikülü epitellerinde, parotis tükürük bezi ve kanal epitellerinde, bağırsak

submukozası sinir pleksuslarında, midenin prensipal hücrelerinde, idrar kesesi epitellerinde, burun ve ağız mukozası ile burun respiratorik mukozasının sinir tellerinde rastlanmıştır.

Kuduz tanısı amacıyla sinir sisteminin incelenmesinde yangısal olayların Negri cisimciğinin bulunması halinde değer ifade ettiği görülmüştür. İkişer olayda komu ammonis ve serebellum, 5 olayda talamus, 8 olayda pons, 9 olayda kollikulus rostralis ile nukleus kaudatusta, 10 olayda da medulla oblongata ve medulla spinaliste inklüzyon cisimciklerine rastlanmaması, bunların tek tek incelenmesi halinde kuduz tanısının yapılamayacağını göstermiştir. Ancak bu bölgelerde, IF ve IP yardımıyla değişik derecede kuduz virus antijeni saptanmasıyla hastalığın varlığı tanımlanmıştır. Her iki yöntemin kendi aralarında yapılan karşılaştırılmasında ise komu ammonis, serebellum, talamus, pons, kollikulus rostraliste IP pozitifliğin IF'den daha fazla olduğu dikkati çekmiştir. Medulla spinalis ve nukleus kaudatusta immunpozitiflik ikisinde de orta derecede görülmüştür. Medulla oblongatada IP pozitiflik yine orta derecede elde edilirken, IF zayıf immun reaksiyon tesbit edilmiştir. Buna karşılık Gasserian gangliyonunda IP boyamada zayıf veya orta şiddette reaksiyon elde edilirken IF'de kuvvetli pozitif görülmüştür. Yine aynı dokuda IP negatif çıkan ve Negri cisimciği de görülmeyen bir hayvanda IF ile yeterli oranda pozitif sonuca varılmıştır. Bu son durum, IP boyamada yapılan bir hatayı akla getirmişse de diğer olayların da bu yöntemde zayıf veya orta derecede reaksiyon verdiği göz önüne alınırsa Gasserian gangliyonunun IF yöntemine daha yakın olduğu kanısı uyanmıştır.

Öte yandan, IP ve IF yöntemlerinin diğer organ ve dokulara uygulanmasında, literatür bildirimlerine benzer şekilde çoğunlukla negatif sonuç alınmıştır. İki yöntemin bu açıdan, sağlıklı değerlendirme şansına kavuşulamamıştır. Bununla birlikte 2 hayvanda submandibular tükürük bezi ve parotiste yangısal reaksiyon ile birlikte IP incelemede viral antijen saptanmış, IF'de ise yalnız birinde parotis pozitif bulunmuştur. Yine 1 hayvanda mide, barsak, idrar kesesi, kulak ve ağız çevresindeki deri, ağız ve burun mukozası, trakea ve bunun dışındaki 5 hayvanda da adrenler pozitif bulunurken; IF'de 1 hayvanın kulak ve ağız çevresinde zayıf pozitiflik dışında aynı organ ve dokular negatif bulunmuştur. Birbirine tam örtüşmeyen bu noktalar dikkate alındığında, IF yönteminin IP kadar duyarlı olmadığı görülmüştür.

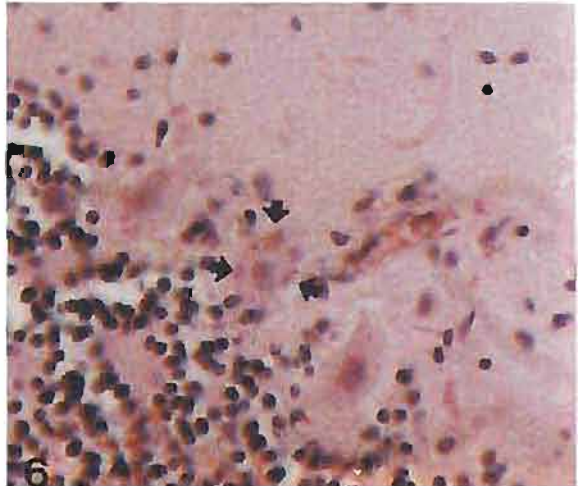
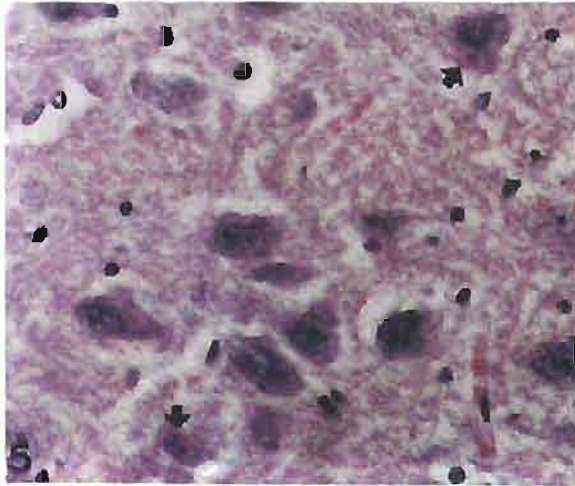
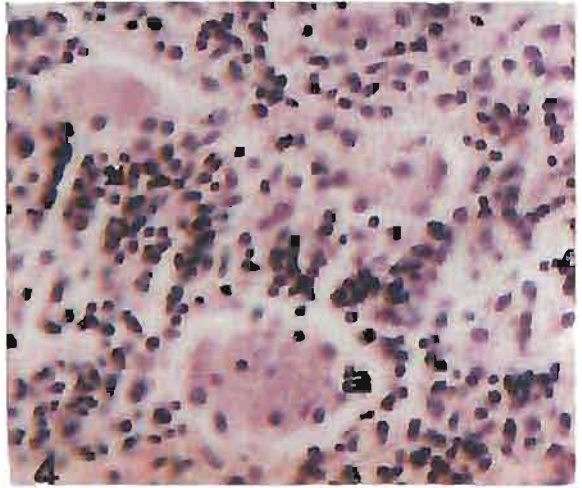
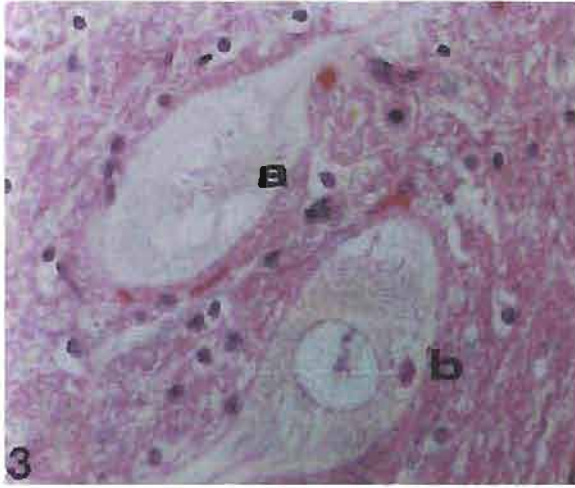
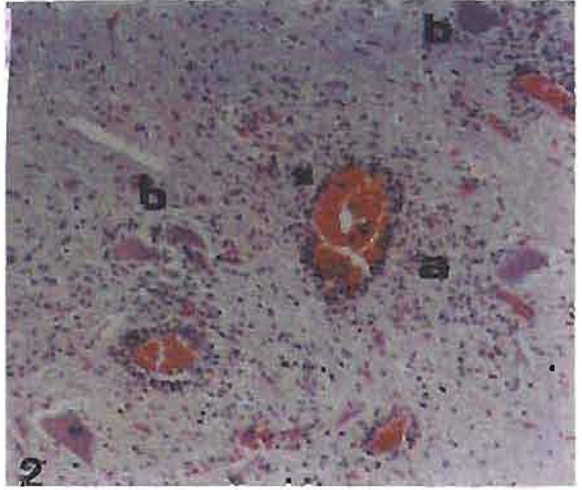
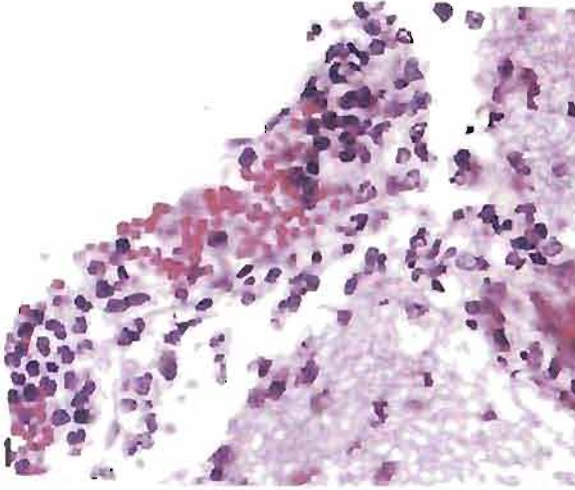
İmmunofloresan yöntemi uygulamak için preparatların tizlikle hazırlanması (Schaaf, 1968) yanında, özel bir mikroskop ve deneyimli bir göze gereksinim olması (Vandeveld ve ark., 1983; Jayakumar ve ark., 1989; Haines ve Clark., 1991), boyanmış preparatların saklanma imkanının olmaması (Haines ve Clark, 1991; Trimarchi ve Debbie, 1991) bu yöntemin dezavantajları arasında yer almıştır. İmmunoperoksidaz yöntemi ise bu dezavantajları ortadan kaldıran bir başka immunhistokimyasal yöntem olarak tanımlanmıştır (Atanasiu ve ark., 1971; Genovese ve Andral, 1978; Anjaria ve Jhala, 1985). Bu yöntemin de post mortem materyallerde kuduzun rutin tanısında spesiflik, kolay ve daha uzun sürede (Genovese ve Andral, 1978) de olsa iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (Heyderman, 1979; Das ve ark., 1985; Jackson, 1991). Yöntemin, immunofloresan kadar hassas olduğu (Genovese ve Andral, 1978) ve bu yöntemin yerini alabileceği (Anjaria ve Jhala, 1985) de vurgulanmıştır. İmmunoperoksidaz yöntemin parafin ve dondurma mikrotomu kesitleri, smearlar ve tuşeler dahil birçok örneklerde yapısal elemanların görülmesine de izin verdiği bilinmektedir. Yöntemde kullanılan reagentler uygulama sırasında yapılan işlemlerden etkilenmez. Normal ışıkta çok daha iyi görülebilen bir renk verir (Bourne, 1983; Noorden ve Polak, 1983). Doku örneklerinde küçük miktarlarda bulunan endojenöz peroksidaz aktivitesi kolaylıkla giderilir (Bourne, 1983). Nitekim bu çalışmada da kesitler % 1.2 ve % 3'lük hidrojen peroksitle tutularak bu aktivite eradike edilmiştir. Avidin-biotin immunoperoksidaz yönteminin ise IP yöntemler içinde daha duyarlı olduğu ve özellikle parafin kesitlerde daha iyi sonuç verdiği kaydedilmiştir (Noorden ve Polak, 1983; Fekadu ve ark., 1988a). Bu çalışmada da avidin-biotin peroksidaz yöntemi kullanılmıştır. Ancak prosedürün uygulanması sırasında hiperimmun serumu ve hidrojen peroksiti iki kere damlatarak ve bütün işlemleri ısıda yaparak daha iyi sonuç alınmıştır.

Sonuç olarak, çalışmada kullanılan üç yöntem kendi arasında karşılaştırıldığında IP yönteminin, dokudaki virus antijeninin zarar görmemesi şartıyla, formol tesbitli parafin dokularda kullanılabilmesi, preparatların uzun süre saklanması ve ışık mikroskopunda incelenmesi, hassas olması ve çok yüksek dilüsyonlarının bile güvenilir sonuç vermesi nedeniyle daha avantajlı olduğu görülmüştür. Kuduzun predileksiyon yeri olan sinir sistemi organlarının dışında, diğer organlardan da pozitif sonuç elde edilmesi patoloji laboratuvarlarında IP yönteminin güvenle kullanılabilmesi kanısını uyandırmıştır.

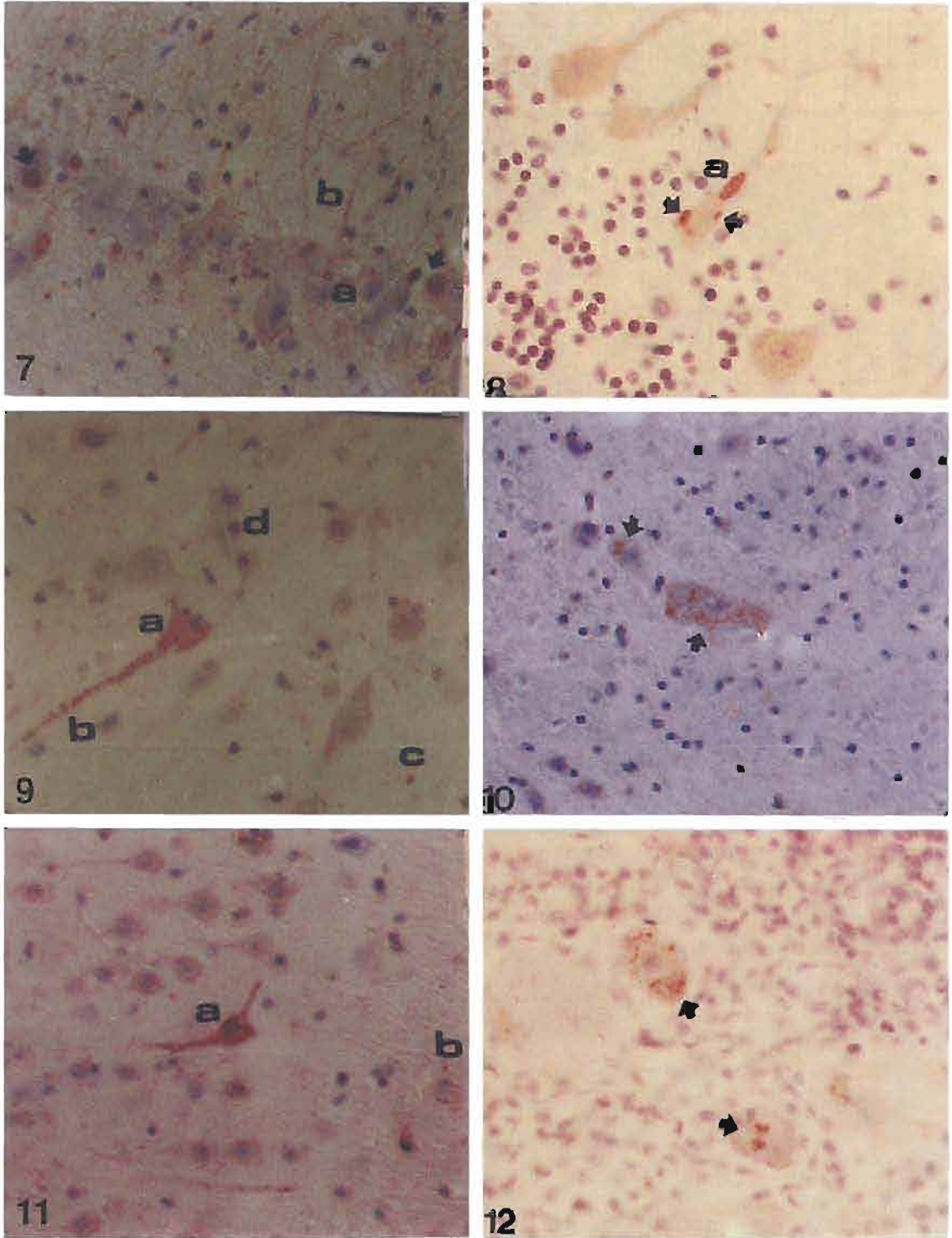
Tablo 1. Sinek sisteminin değişik bulgularından alınan örneklerde histopatolojik (HP), immunoperoksidaz (IP) ve immunofluoresan (IF) yöntemlerinin sonuçları

Beyin bölümleri	Kornu ammonis			Serebellum			Talamus			Pons serebri			Kollikulus rostralis			Medulla oblongata			Medulla spinalis			N.kaudatus			Gasserian gangliyonu		
	HP	IP	IF	HP	IP	IF	HP	IP	IF	HP	IP	IF	HP	IP	IF	HP	IP	IF	HP	IP	IF	HP	IP	IF	HP	IP	IF
1.nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	+3			+1			+1			-			-			-			-			+1			+1		
2.nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	+2			+2			+1			-			-			-			-			-			+1		
3.nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	+2			+1			+1			-			+1			-			-			-			-		
4.nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+1	+2	+2	+3	+1	+3
	+2			+1			-			-			-			-			-			-			-		
5.nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+1	+2	+2	+3	+1	+3
	+2			-			-			-			-			-			-			-			-		
6.nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	+1			-			-			-			-			-			-			-			-		
7.nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	+1			+1			-			-			-			-			-			-			-		
8.nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	+1			+1			-			-			-			-			-			-			-		
9.nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+1	+2	+2	+3	+1	+3
	-			+1			-			-			-			-			-			-			-		
10.nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+3	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+1	+2	+2	+3	-	+3
	-			+1			-			-			-			-			-			-			-		
Hayvan sayısı (adet)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10
	8			8			3			0			1			0			0			1			2		

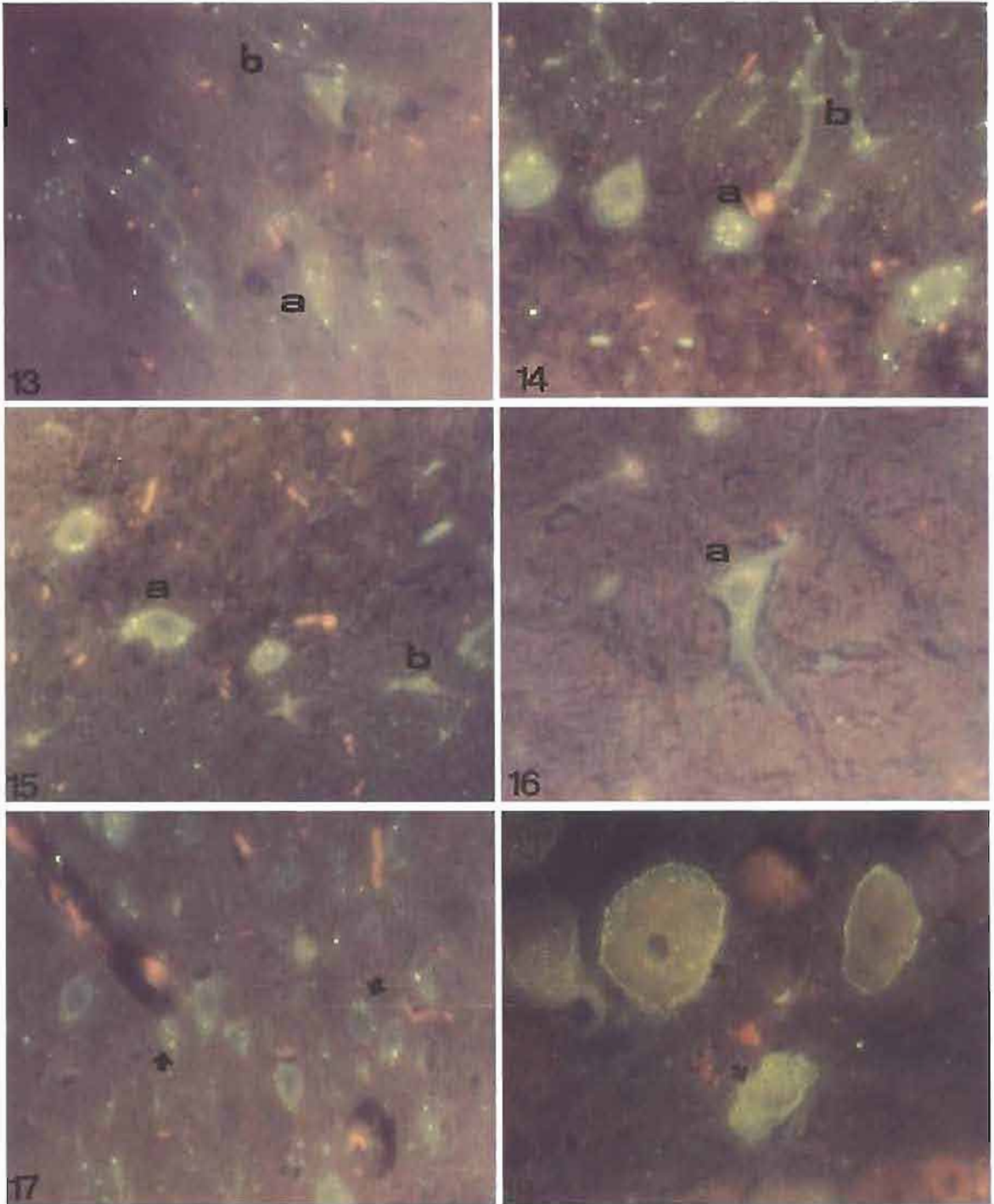
HP : Üst satır : Yangısal ve dejeneratif bulgular
 Alt satır : İnklüzyon cisimcikleri
 +1 : Hafif şiddette : Yangı, inklüzyon cisimciği, viral antijen yoğunluğu
 +2 : Orta şiddette : " " " "
 +3 : Şiddetli : " " " "
 (-) : Yangı, inklüzyon cisimciği ve viral antijen saptanamadı.



Şekil 1. Nukleus kaudatus. Hiperemik leptomeningeal damarlar çevresinde mononükleer hücre infiltrasyonu, HE, X400. Şekil 2. Talamus. Nöröpile gliosis (a), nöron dejenerasyonu ve nekrozu ile nöronofaji (b), perivasküler hücre infiltrasyonları (ok), HE, X100. Şekil 3. Kollikulus rostralis. Dejenere nöronlarda vakuoller (a) ve inklüzyon cisimciği (b), HE, X400. Şekil 4. Gasserian gangliyonu. Nöronofaji (a) ve bağdokuda mononükleer hücre infiltrasyonları (ok), HE, X400. Şekil 5. Korna ammonis. Piramidal hücrelerde inklüzyon cisimcikleri (oklar), HE, X400. Şekil 6. Serebellum. Pürkinje hücrelerinde inklüzyon cisimcikleri (oklar), HE, X320.



Şekil 7. Kornu ammonis. Piramidal hücre sitoplazması (a) ve aksonlarında (b) IP pozitif viral antijenler, sitoplazmada inklüzyon cisimcikleri (oklar), IP yöntem, X250. Şekil 8. Serebellum. Pürkinje hücrelerinde IP pozitif inklüzyon cisimciği (a) ve viral antijenler (oklar), IP yöntem, X400. Şekil 9. Talamus. Nöron sitoplazması (a), uzantıları (b) ve ekstrasellüler (c) IP pozitif viral antijenler, nöropilde inklüzyon cisimciği (d), IP yöntem, X320. Şekil 10. Medulla oblongata. Nöron sitoplazmasında IP pozitif viral antijenler (oklar), IP yöntem, X320. Şekil 11. Nucleus caudatus. Nöron sitoplazması ve uzantıları (a) ile nöropilde (b) IP pozitif viral antijenler, IP yöntem, X250. Şekil 12. Gasserian gangliyonu. Nöron sitoplazmasında IP pozitif viral antijenler (oklar), IP yöntem, X400.



Şekil 13. Kornu ammonis. Piramidal hücre sitoplazması (a) ve aksonlarında (b) IF pozitif viral antijenler, IF yöntem, X320. Şekil 14. Serebellum. Pürkinje hücrelerinin sitoplazma (a) ve aksonlarında (b) IF pozitif viral antijenler, IF yöntem, X320. Şekil 15. Talamus. Nöron sitoplazması (a) ve aksonlarda (b) IF pozitif viral antijenler, IF yöntem, X320. Şekil 16. Medulla oblongata. Nöron sitoplazmasında perinükleer IF pozitif viral antijenler (a), IF yöntem, X320. Şekil 17. Nükleus kaudatus. Nöron sitoplazması ve uzantılarında IF pozitif viral antijenler (oklar), IF yöntem, X320. Şekil 18. Gasserian gangliyonu. Nöron sitoplazmasında IF pozitif viral antijenler (oklar), IF yöntem, X320.

Kaynaklar

- Ademoğulları, N. (1992). Kuduz leşisinde kullanılan metodların (Sellers boyama, floresan antikor tekniği, histopatolojik muayene, fare inokulasyonu) karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- Andrews, C.H., Wallon, J.R. (1990). Viral and Bacterial Zoonoses. In "Animal and Human Health" Ed. Brander, G.C., Bailliere Tindall, London.
- Anjaria, J.M., Jhala, C.I. (1985). Immunoperoxidase reaction in diagnosis of rabies. *Int. J. Zoonoses*, 12, 267-275.
- Atanasiu, P., Dragonas, P., Tsiang, H., Harbi, A. (1971). Immuno-peroxidase nouvelle technique spécifique de mise en évidence de l'antigène rabique intra-et extracellulaire en microscopie optique. *Ann. Inst. Pasteur*, 121, 247-250.
- Balachandran, A., Charlton, K. (1994). Experimental rabies infection of nonnervous tissues in skunks (*Mephitis mephitis*) and foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet. Pathol.*, 31, 93-102.
- Barnard, B.J.H., Voges, S.F. (1992). A simple technique for the rapid diagnosis of rabies in formalin-preserved brain. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 49, 193-194.
- Blenden, D.C. (1974). Diagnosis of rabies in various species by immunofluorescent staining of skin. *JAVMA*, 165, 735.
- Blenden, D.C., Bell, J.F., Tsao, A.T., Umoh, J.U. (1983). Immunofluorescent examination of skin of rabies-infected animals as a means of early detection of rabies virus antigen. *J. Clin. Microbiol.*, 18, 631-636.
- Blood, D.C., Radosiits, D.M., Henderson, J.A. (1983). "Veterinary Medicine", 6th edition, Bailliere Tindall, London.
- Bourne, J.A. (1983). "Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods". Dako Corporation, Santa Barbara.
- Bundza, A., Charlton, K.M. (1988). Comparison of spongiform lesions in experimental scrapie and rabies in skunks. *Acta Neuropathol.*, 76, 275-280.
- Buxton, A., Fraser, G. (1977). "Rhabdoviruses Animal Microbiology." Black Well Scientific Publication, Edinburgh.
- Castillon, J.R.F. (1973). La histopatología del corazón de ratones blancos inoculados con virus rabico. *Rev. Med. Vet.*, 54, 101-102.
- Charlton, K.M. (1984). Spongiform Lesions. *Acta Neuropathol.*, 63, 198-202. Campbell, J.B., Charlton, K.M. (1988). The pathogenesis of rabies. In "Developments in Veterinary Virology". Ed. Campbell, J.B., Charlton, K.M., Kluwer Academic Publishers, Massachusetts (Alınıştı).
- Charlton, K.M. (1988). The pathogenesis of rabies. In "Developments in Veterinary Virology". Ed. Campbell, J.B., Charlton, K.M., Kluwer Academic Publishers, Massachusetts.
- Correa-Giran, E.P., Allen, R., Sulkin, S.E. (1970). The infectivity and pathogenesis of rabies virus administered orally. *Am. J. Epidemiol.*, 91, 203-215.
- Das, S.K., Sarkar, P., Sen, G.P. (1985). Evaluation of immunoperoxidase test in routine diagnosis of rabies in animals. *Indian J. Anim. Sci.*, 55, 979-982.
- Faiden, W., Kaiser, E., Gerhard, L., Dahme, E., Gylstorf B., Wandaler, A., E. (1988). Immunohistochemical staining of rabies virus antigen with monoclonal and polyclonal antibodies in paraffin tissue sections. *J. Vet. Med. B.*, 35, 247-255.
- Fekadu, M., Shaddock, J.H. (1984). Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 724-729.
- Fekadu, M., Chandler, F.W., Harrison, A.K. (1982). Pathogenesis of rabies in dogs inoculated with an Ethiopian rabies virus strain. Immunofluorescence, histologic and ultrastructural studies of the central nervous system. *Arch. Virol.*, 71, 109-126.
- Fekadu, M., Greer, P.W., Chandler, F.W., Sanderlin, D.W. (1988a). Use of the avidin-biotin peroxidase system to detect rabies antigen in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J. Virol. Methods.*, 19, 91-96.
- Fekadu, M., Shaddock, J.H., Chandler, F.W., Sanderlin, D.W. (1988b). Pathogenesis of rabies virus from a Danish bat (*Eptesicus serotinus*): Neuronal changes suggestive of spongiosis. *Arch. Virol.*, 99, 187-203.
- Fischman, H.R. (1969). Fluorescent antibody staining of rabies-infected tissues embedded in paraffin. *Am. J. Vet. Res.*, 30, 1213-1221.
- Foley, G.L., Zachary, J.F. (1995). Brief communications and case reports: rabies-induced spongiform change and encephalitis in a heifer. *Vet. Pathol.*, 32, 309-311.
- Genovese, M.A., Andral, L. (1978). Comparaison de deux techniques utilisées pour le diagnostic de la rage: L'immunofluorescence et l'immunoperoxidase. *Rec. Med. Vet.*, 154, 667-671.
- Goldwasser, R.A., Kissling, R.E. (1958). Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98, 219-223.
- Haines, D.M., Clark, E.G. (1981). Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. *Can. Vet. J.*, 32, 295-302.
- Hamir, A.N., Rupprecht, C.E. (1990). Absence of rabies encephalitis in raccoon with concurrent rabies and canine distemper infections. *Cornell Vet.*, 80, 197-201.
- Hamir, A.N., Moser, G., Rupprecht, C.E. (1992). Morphologic and immunoperoxidase study of neurologic lesions naturally acquired rabies of raccoons. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4, 369-370.

- Hamir, A.N., Moser, G., Fu Z.F., Dietzschold, B., Rupprecht, C.E. (1995). Immunohistochemical test for rabies: identification of a diagnostically superior monoclonal antibody. *Vet. Rec.*, 136, 295-296.
- Heyderman, E. (1979). Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. *J. Clin. Pathol.*, 32, 971-978.
- Jackson, A. (1991). Biological basis of rabies virus neurovirulence in mice: comparative pathogenesis study using the immunoperoxidase technique. *J. Virol.*, 65, 537-540.
- Jackson, A., Reimer, D.L., Ludwin, S.K. (1989). Spontaneous recovery from the encephalomyelitis in mice caused by street rabies virus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 15, 459-475.
- Jayakumar, R., Ramadass, P., Baghavan, N. (1989). Comparison of enzyme immunodiagnosis with immunofluorescence for rapid diagnosis of rabies in dogs. *Zbl. Bakt.*, 271, 501-503.
- Johnson, R.T. (1983). "Viral infections of the nervous system." Raven Press, New York, p.: 271-193. Fekadu, M., Shaddock, J.H., Chandler, F.W., Sanderin, D.W. (1988b). Pathogenesis of rabies virus from a Danish bat (*Eptesicus serotinus*): Neuronal changes suggestive of spongiosis. *Arch. Virol.*, 99, 187-203 (Alınmıştır).
- Jones, T.C., Hunt, R.D. (1983). "Veterinary Pathology". 5th edition. Lea&Febiger, London.
- Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. (1985). "Pathology of Domestic Animals". 2nd edition. Academic Press, London.
- Kawamura, A. (1977). "Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications". 2nd edition. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Koprowski, H. (1973). "The mouse inoculation test. In Laboratory Techniques in rabies". 3rd edition. Ed. Kaplan, M.M. and Koprowski, H., WHO, Geneva.
- Kotwal, S., Narayan, K.G. (1985). Direct immunoperoxidase test in the diagnosis of rabies-an alternative to fluorescent antibody test. *Int. J. Zoonoses.*, 12, 80-85.
- Kotwal, S., Narayan, K.G. (1987). Comparative evaluation of ELISA, FAT and immunoperoxidase tests in the diagnosis of rabies. *Indian J. Anim. Sci.*, 57, 65-71.
- Levaditi, C., Atanasiu, P., Gamet, A., Guillon, J.C. (1971). Rabies diagnosis: Problems raised by immunofluorescence and immunoperoxidase methods. *Arch. Inst. Past. Alg.*, 49, 75-83.
- Luna, L.G. (1960). "Manual of Histologic and Special Staining Technics". McGraw-Hill Book Company, New York.
- Marie, G.S. (1962). A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem.*, 10, 250-256.
- Meerdink, G. (1969). Rabies diagnosis: Fluorescent antibody technique. *Iowa State Univ.*, 1, 20-24.
- Negri, A. (1903). Beitrag zum studium der aetiologie der tollwut. *Z. Hyg. Infektionsker.*, 44, 519. In "Natural History of Rabies" Vol. 1, Chapter 13, p.: 244, Ed. Baer, G.M. Academic Press, N.Y. Anjaria, J.M., Jhala, C.I. (1985). Immunoperoxidase reaction in diagnosis of rabies. *Int. J. Zoonoses.*, 12, 267-275 (Alınmıştır).
- Ninomiyama, S. (1955). Histopathological studies on the salivary glands of rabid dogs with special reference to the parotid and mandibular glands. *Gunma J. Med. Sci.*, 4, 117-127.
- Noorden, S., Polak, J.M. (1983). Immunocytochemistry today. In "Immunocytochemistry". Ed. M. Julia Polak, Susan Van Noorden, Wright-PSG, London.
- Palmer, D.G., Ossent, P., Suter, M.M., Ferrari, E. (1985). Demonstration of rabies viral antigen in paraffin tissue sections: comparison of the immunofluorescence technique with the unlabeled antibody enzyme method. *Am. J. Vet. Res.*, 46, 283-286.
- Schaaf, J. (1968). Technik und Zuverlässigkeit der mikroskopischen Diagnose der Tollwut. II. Antigen-Nachweis mittels Fluoreszenz - Antikörper - Technik. *Zbl. Vet. Med.*, B 15, 249-258.
- Schaaf, J., Schaaf, E. (1968). Die Viruskalisation bei Tollwut. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 75, 315-323.
- Schneider, L.G. (1969). The cornea test: a new method for the intra-vitam diagnosis of rabies. *Zbl. Vet. Med.*, B 16, 24-31.
- Schneider, L.G. (1964a). Erfahrungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei der routinemäßigen Laboratoriumsdiagnose der Tollwut. II. Mitteilung: Die fluoreszierende Antikörpertechnik. *Zbl. Vet. Med.*, B 11, 207-230.
- Schneider, L.G. (1964b). Erfahrungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei der routinemäßigen Laboratoriumsdiagnose der Tollwut. II. Mitteilung. *Tierärztl. Umschau.*, 19, 502-509.
- Shannon, L.M., Poulton, J.L., Emmons, R.W., Woodie, J.D., Fowler, M.E. (1988). Serological survey for rabies antibodies in raptors from California. *J. Wildlife Dis.*, 24, 264-267.
- Sinclair, T., Nagata, T., Yoshikawa, Y., Kei, C., Yamanauchi, K. (1992). Immunohistochemical and histopathological study of experimental rabies infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.*, 54, 409-416.
- Sung, J.H., Hayano, M., Mastri, A.R., Okagaki, T. (1976). A case of human rabies and ultrastructure of the Negri body. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 35, 541-559.
- Tanzer, F. (1976). Kuduz hastalığının teşhisinde floresan antikor tekniği ile histopatolojik yoklamalardan elde olunan sonuçların karşılaştırılması. *Şişli Çocuk Hastanesi Tıp Bülteni*, 2, 134-149. Ademoğulları, N. (1992). Kuduz teşhisinde kullanılan metodların (Sellers boyama,

floresan antikor tekniği, histopatolojik muayene, fare inokulasyonu) karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul (Alınmıştır).

Trinarchi, C.V., Debbie, J.G. (1991). The fluorescent antibody in rabies. In "The Natural History of Rabies". Ed.: George M Baer; CRC Press, Boston.

Ulrich, K., Jacksch, W., Glawischnig, E. (1985). "Grundriss derspeziellen pathologie und therapie der haustiere". Ferdinand Enke Verlag; 11. Auflage, Stuttgart.

Umoh, J.U., Ezekoli, C.D., Okoh, A.E.J. (1985). Immunofluorescent staining of trypsinized formalin by standard methods for 221 suspect animal cases in Nigeria. J. Hyg. (Camb.), 94, 129-134.

Vandevelde, M., Hugl, E., Isler, A. (1983). Histological immunoenzyme techniques in canine tissues: evaluation

of various methods and modifications. Res. Vet. Sci., 34, 193-198.

Wachendörfer, G. (1967). Zur Frage der Überlebensdauer des Tollwutvirus in fixierten und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern "gefarbten" Präparaten. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 80, 127-130.

Woolf, A., Smith, C.G. (1986). Pathologic findings in rabies-suspect, random-source and accidentally killed skunks. JAVMA, 289, 1089-1091.

Zimmermann, T (1971) . Zur Brauchbarkeit des Cornea-Testes bei der Tollwutdiagnose. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 84, 172-174.

Zimmer, K., Weigand, D., Manz, D., Frost, J.W., Reinacher, M., Frese, K. (1990). Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. J. Vet. Med., B 37, 392-400.