

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

80203

**KÖPEKLERDE KUDUZUN TANISINDA  
HİSTOPATOLOJİK, İMMUNOPEROKSİDAZ VE  
İMMUNOFLORESAN YÖNTEMLERİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim  
**Sevil (ATALAY) VURAL**

**PATOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

**DANIŞMAN  
Prof.Dr.Şenay BERKİN**

T 80203

**Bu tez, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından VHAG 1119 /  
ADP proje numarası ile desteklenmiştir.**

**1997 - ANKARA**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Patoloji Anabilim Dalı Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30 / 07 / 1997

  
Prof. Dr. Cemalettin KÖKÜUSLU  
Ankara Üniversitesi  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Şenay BERKİN  
Ankara Üniversitesi

  
Prof. Dr. Rıfka HAZIROĞLU  
Ankara Üniversitesi

  
Prof. Dr. Günay ALÇIĞIR  
Ankara Üniversitesi

  
Prof. Dr. Kemal ÇİFTÇİ  
Selçuk Üniversitesi

## ÖNSÖZ

Kuduz, santral sinir sisteminin akut seyirli, hipersalivasyon, sensorik ve motorik sinir paralizini takiben inkoordinasyon, kuyrukta felç, tenesmus, pupillada genişleme, kas tremorları, konvülsiyonlar, yabancı cisim yeme isteği ve saldırganlık ile karakterize insan ve kuşlar dahil, tüm sıcak kanlı hayvanların öldürücü, viral bir enfeksiyonudur (Buxton ve Fraser, 1977; Blood ve ark., 1983; Shannon ve ark., 1988). Tehlikeli bir zoonoz olduğu için önem taşır.

Hastalığın Afrika, Asya ve Güney Amerika'nın çoğu bölgesinde köpeklerde epizootik, Kuzey Amerika ve Avrupa'nın birçok bölgesinde vahşi hayvan türlerinde (özellikle tilkilerde) (Jones ve Hunt, 1983; Fekadu, 1991; Balachandran ve Charlton, 1994), Türkiye'de ise köpeklerde enzootik seyrettiği bildirilmiştir (Blood ve ark., 1983). Bulaşma da genellikle köpeklerin önemli rol oynadığı (Anon, 1995), vahşi hayvanlardan insan ve evcil hayvanlara geçişin ise sporadik olduğu ve genellikle ölümle sonuçlandığı kaydedilmiştir (Jones ve Hunt, 1983; Balachandran ve Charlton, 1994).

Hastalığın tanısı Seller boyama, histopatolojik inceleme, fare deneme inokulasyonları ve immunohistokimyasal yöntemlerle yapılır. Seller boyama ve histopatolojik incelemelerde, kornu ammonisteki nöronlar ile serebellumdaki Purkinje hücrelerinde intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin 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 vermeleri nedeni ile yeterli bir tanı yöntemi olamayacağı da kaydedilmiştir (Goldwasser ve Kissling, 1958; Atanasu ve ark., 1971; Koprowski, 1973; Tanzer, 1976; Anjaria ve Jhala 1985; Schultz, 1986; Kotwal ve Narayan, 1987). Deneme inokulasyonlarının doğruluk oranı % 94-100 olmakla beraber tanı için uzun bir süreye (6-30 gün) gereksinim vardır (Meerdink, 1969; Kotwal ve Narayan, 1987; Zimmer ve ark., 1990; Ademoğulları, 1992). Birçok laboratuvar da uygulanan immunofloresan ve immunoperoksidaz yöntemleriyle hastalığın tanısında sırasıyla % 87-100 ve % 87-98 oranında pozitif sonuç alınmıştır (Anjaria ve Jhala, 1985; Kotwal ve Narayan, 1985, 1987; Jayakumar ve ark., 1989; Zimmer ve ark., 1990). Floresan antikor yöntemi hastalığın tanısında en uygun yöntem olmakla beraber pahalı ekipmana ihtiyaç duyulması nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle birçok hastalıkta olduğu gibi kuduzun tanısında da immunoperoksidaz yöntemi kullanılmaya başlanmıştır (Genovese ve Andral, 1978, Jayakumar ve ark., 1989).

Ülkemizde sıklıkla rastlanılan kuduzda tanı, immunofloresan yöntemin uygulandığı birkaç laboratuvar hariç Seller boyama, histopatolojik incelemeler ve farelerde deneme inokulasyonları ile yapılmaktadır. Bu çalışmada hastalığın tanısında histopatolojik, parafin blok kesitlerinde immunoperoksidaz ve immunofloresan yöntemlerin değerlendirilmesi ve immunoperoksidaz yöntemin laboratuvarımızda kullanılıp kullanılmayacağına araştırılması amaçlanmıştır. Böylece

immunoperoksidaz yöntem kuduzun tanısında ülkemizde ilk defa kullanılmış olacaktır.

Bu çalışmanın yürütülmesinde değerli yardımlarını gördüğüm Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Cemalettin Köküslü'ya, çalışma konusunu incelemem için bana veren, çalışmalarım süresince her türlü yardımlarını esirgemeyen, çalışmamı ilgi ve uyarıları ile yönlendirerek, sabırla yol göstererek destek olan değerli bilgi ve önerilerinden yararlandığım Hocam ve doktora danışmanım Sayın Prof.Dr.Şenay Berkin'e, Dr. Wandaler ile temas etmemde büyük yardımları olan Sayın Prof.Dr. İ. Ayhan Özkul'a, Dr. Nezihi Ersöz'e, Akın Kösetorunoğlu'na, immunoperoksidaz tekniğinin uygulanmasında değerli bilgilerine başvurduğum Sayın Prof.Dr. Rıfki Hazıroğlu'na, bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesi sırasında yapıcı eleştirileri ile yardımcı olan, immunofloresan tekniğinin uygulanmasında laboratuvar ve bilimsel desteğini esirgemeyen, bu metodun laboratuvarımızda rutin bir test olarak işlevlik kazandırılmasını sağlayan Sayın Prof.Dr. Günay Alçıgır'a, eşim Doç.Dr. Rıfat Vural'a ve aileme, Yrd.Doç.Dr. Yavuz Gülbahar'a, Arş.Gör.Nihat Toplu'ya, Patoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri ve teknik personeline; mali destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na; materyal toplamamda yardımcı olan Pendik Veteriner Kontrol ve Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Patoloji Laboratuvar Şefi Dr. Arıkan Güler ve personeline; Etlik Veteriner Kontrol ve Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Kuduz Aşı Üretim Laboratuvar Şefi Dr.İsmet Yörük'e, Kuduz Teşhis Laboratuvar Şefi Dr. Orhan Aylan'a, teşekkür ederim.



**İÇİNDEKİLER**

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	v
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Tarihçe	1
1.2. Etiyoloji	2
1.3. Epizootoloji	6
1.4. Patogenez	9
1.5. Bulgular	18
1.6. Tanı	22
1.7. Kontrol	26
<b>2. MATERYAL ve METOT</b>	<b>29</b>
<b>3. BULGULAR</b>	<b>34</b>
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>81</b>
<b>5. SONUÇ</b>	<b>95</b>
<b>ÖZET</b>	<b>96</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>98</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>100</b>

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Tarihçe

Hastalık çılgınlık, delilik ya da saldırgan anlamına gelen Yunanca '*lyssa*', Latince '*rabies*', Almanca '*tollwut*' ve Fransızca '*rage*' olarak adlandırılmıştır (Andrewes ve Walton, 1990). Hastalığa ait ilk bilgilere Milattan Önce (M.Ö) 23. asırda Mezopotamya'da yaşayan Babür hükümdarı Hammurabi'nin çıkardığı kanunlarda rastlanmıştır (Baer ve Wandeler, 1987; Andrewes ve Walton, 1990). Democritus, M.Ö. 500 yılında köpek ve evcil hayvanlarda hastalığı tanımlamıştır. Yine M.Ö. 4. asırda Aristo yayınlamış olduğu '*Natural History of Animals*' isimli kitabında delilik semptomları gösteren köpeklerden bahsetmiştir (Steel ve Fernandez, 1991). Daha sonra ise Aristotile (M.Ö.3. asırda) ilk kez saldırgan köpek tarafından ısırılmanın tehlikesine dikkat çekmiştir (Buxton ve Fraser, 1977).

Kuduzun nedeni üzerinde bir asır önceye kadar değişik ve çelişkili teoriler ileri sürülmüştür. Bu teorilerde genel ve ortak kanı, hastalığın spontan olarak ortaya çıktığına inanılmasıdır. 1271 yılında, Fransa'da ilk büyük kuduz salgını olmuştur. 1565 yılında Ali bin Ömer '*Gazaname ve Baytarname*' adlı kitabında hastalığın klinik bulgularını tanımlamıştır (Ömer, 1565). 1586 yılında Avustralya, Macaristan ve Türkiye'de hastalığın köpeklerde epizootik olarak gözleendiği kaydedilmiştir. Zinke ise 1804 yılında ilk kez kuduz bir köpeğin salyası ile sağlıklı bir köpeği enfekte ederek, tükürükte enfektif bir etkenin bulunduğunu kaydetmiştir (Fekadu, 1991). Zinke'nin bu teorisi diğer araştırmacılar tarafından da doğrulanınca, 1826 yılında İskandinav ülkeleri bu hastalıkla ilgili olarak ilk karantina kurallarını ve alınması gereken diğer önlemleri açıklamışlardır. Kuduzun tarihçesinde bir sonraki önemli gelişme ise Pasteur ve arkadaşlarının 1881-1889 tarihleri arasında, kuduzun enfektif bir ajan tarafından oluşturulduğu ve bunların vücutta yerleşim yeri olarak santral sinir sistemini seçtiklerinin ileri sürülmesidir. Ayrıca etkenin merkezi sinir sisteminde saf ve yoğun miktarda bulunduğunun açıklanması yanında bir dizi hayvan pasajları ile etkeni

modifiye ederek, canlılarda hastalık belirtileri gözlenmeksizin bağışıklığın sağlanabileceğini de göstermişlerdir. Pasteur, 1885 yılında ilk defa saldırgan bir köpek tarafından ısırılan bir çocuğu kuduza karşı aşıl原因arak bağışıklığı sağlamış ve çocukta kuduz semptomları şekillenmemiştir. Daha sonra, 1903 yılında, Rıfat Bey ve Remlinger hastalık etkenin filtre edilebileceğini ileri sürmüştür (Berke, 1974; Buxton ve Fraser, 1977). Aynı yıl Negri ise saldırgan bir hayvanın beyinindeki nöronlarda tanı açısından önemli bir yere sahip olan ve daha sonra kendi adı ile isimlendirilen intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerini saptamıştır (Negri, 1903; Buxton ve Fraser, 1977). Günümüzde de hastalığın mikroskopik tanısında, Negri cisimciklerinin aranması sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir.

## 1.2. Etiyoloji

Kuduz virusu Rhabdoviridae familyası'na ait Rabies (Lyssa) virus genusunun bir elemanı olan, kurşun kapsülüne benzeyen tek zincirli bir RNA virusudur (WHO, 1973; Jones ve Hunt, 1983; Rupprecht ve ark., 1987; Andrewes ve Walton, 1990; Coulon ve ark., 1993; Tordo ve Kouknetzoff, 1993). Virus 130-300 nm uzunlukta ve 75-80 nm genişliğindedir (Shope ve ark., 1970; WHO, 1973; Ulrich ve ark., 1985). Çeşitli memeliler, balıklar, insektler, protozoalar ve sürüngenlerden izole edilebilir (King ve Turner, 1993). Kimyasal yapısının yaklaşık % 74'ü protein, % 22'si lipidler, % 3'ü karbonhidratlar ve % 1'i RNA'dan oluşur (WHO, 1973). İnternal grup spesifik nükleoprotein ve glikoprotein yüzey antijeni olmak üzere iki temel antijeni vardır. Bunlardan yüzey antijeni, öncelikle hedef hücreyi keşfederek virusun hücreye karşı tropizmini saptar. İkinci olarak antijeni nötralize eden antikorların salınımını sağlar (WHO, 1973; Ulrich ve ark., 1985; Coulon ve ark., 1993). Ayrıca glikoproteinin içerdiği aminoasitlere göre de çeşitli laboratuvar suşları (CVS, ERA, SAD, B 19, HE, PV) vardır. İlk kez monoklonal kuduz antikorunu Wistar Enstitüsü'nde Wiktor tarafından üretilmiştir (Coulon ve ark., 1993).

Klasik kuduz virusu “sokak virusu” ve “fiks virus” olmak üzere iki grupta incelenir (Jubb ve ark., 1985; Ulrich ve ark., 1985; Andrewes ve Walton, 1990; King ve Turner, 1993).

**Sokak virusu**, doğal olarak enfekte olmuş hayvanlardan izole edilen virustur. Bu virus ile enfeksiyonda inkübasyon süresi, virusun miktarı ve enfeksiyonun bulaşma şekline bağlı olarak değişkendir. Birkaç gün ya da birkaç ay olabileceği gibi bu sürelerden daha da uzun olabilir (Blood ve ark., 1983; Jones ve Hunt, 1983; Baer ve Wandeler, 1987; Fekadu, 1993; Balachandran ve Charlton, 1994). Virusun tükürük bezlerine karşı özel bir affinitesi vardır ve tükürükten izole edilebilir (Schaaf ve Schaal, 1968; Jubb ve ark., 1985; Ulrich ve ark., 1985; Andrewes ve Walton, 1990). Çeşitli organlarda Negri cisimcikleri şekillendirir (Jubb ve ark., 1985).

**Fiks virus**, sokak virusunun intraserebral pasajlarla laboratuvar hayvanlarına (fare, kobay, rat ve tavşan) adapte edilmesi ile oluşur (Blood ve ark., 1983; Ulrich ve ark., 1985; Baer ve Wandeler, 1987; Andrewes ve Walton, 1990). İnkübasyon süresi 4-6 gündür. Deneysel olarak enfekte edilen köpeklerde inkübasyon süresi ve morbiditesi kullanılan fiks virusun dozuna göre 9-69 gün olarak saptanmıştır (Fekadu ve ark., 1988b). Bir köpek için intramusküler letal doz % 32 iken fare için bu doz intraserebral kullanımlarda % 50 dir (Fekadu ve ark., 1982). Kural olarak, fiks virus tükürük bezlerine yayılmaz (Jubb ve ark., 1985; Andrewes ve Walton, 1990) ve histopatolojik incelemelerde Negri cisimciklerine rastlanılmaz (Jubb ve ark., 1985). Ancak deneysel olarak yüksek dozlarda fiks virus verilen köpeklerin % 25-40'ının tükürük bezlerinde virus saptandığı kaydedilmiş (Fekadu ve ark., 1988b) ve klinik olarak bu hayvanlarda sıklıkla paraliz (Andrewes ve Walton, 1990), seyrek olarak da saldırgan form gözlenmiştir (Blood ve ark., 1983).

Sokak virusunun civciv embriyosunda yapılan pasajlamalarıyla **Flury virus**, hücre kültürlerinde ise sitoplazmik cisimcikler oluşturan aşı suşları elde edilmektedir (Ulrich ve ark., 1985).

Birbirlerinden kros immunizasyon, monoklonal N antikor (Mab-N), komplement fikzasyon ve nötralizasyon testleri ile ayrılan (Jones ve Hunt, 1983; Ulrich ve ark., 1985; Bourhy ve ark, 1990, King ve Turner 1993) aynı genusta yer alan kuduz virusu benzeri 5 adet virus daha tespit edilmiştir (WHO, 73; Sureau ve ark., 1975; Bussereau ve Sureau, 1989; Andrewes ve Walton, 1990; King, 1993). Bu viruslar :

**Lagos yarasa virusu (LBS)**, kas dokusunda bulunur(Schaaf ve Schaal, 1968; Schneider, 1991). Nijerya'da Lagos yarasa-1, Orta ve Güney Afrika'da Lagos yarasa-2 olmak üzere iki grup virus, meyve yiyen (frugivorous) yarasalardan izole edilmiştir (Shope ve ark., 1970; Andrewes ve Walton, 1990). Mokola virusu ile birlikte parenteral enfeksiyonlarda düşük mortalite yaparak yüksek titreli nötralizan antikorlar şekillendirirlerken(Schaaf ve Schaal, 1968; Schneider, 1991) intraserebral olarak köpek ve maymunlarda öldürücüdürler(Percy ve ark., 1973). Zimbabwe'de bir kediden de Lagos yarasa-3 virus tipi izole edilmiştir(King, 1993). Her üç gruba ait viruslar inkluzyon cisimcikleri oluşturmazlar (Shope ve ark., 1970)

**Mokola virus (MOK)**, Afrika kırsal faresinden (*Croardura* spp) Mokola-3, iki insan ile son yıllarda kedi ve köpeklerden Nijerya (Percy ve ark, 1973) ve Kamerun'dan Mokola-2, Zimbabwe'den Mokola-5 virusu olmak üzere üç grup halinde izole edilmiştir (King, 1993). Nijerya'da MOK ile ilgili sığır, keçi, domuz ve kuş serumlarında nötralizan antikorları saptanmıştır. Bu viruslar fareler için patojendir (Percy ve ark., 1973). Viseral organlarda bulunurlar(Schaaf ve Schaal, 1968; Schneider, 1991).

**Duvenhage virusu (DUV)**, Güney Afrika'da insanlardan Duvenhage-1 (Andrewes ve Walton, 1990; King, 1993) ile yarasalardan Duvenhage-2, Zimbabwe'den ise Duvenhage-3 virusu olmak üzere üç grup halinde izole edilmiştir. MOK ile DUV insan hastalıklarına ve bazı vakalarda da ölümlere neden oldukları için ayrı bir öneme sahiptirler(Andrewes ve Walton, 1990).

**Kotokan virusu (KOT)**, Nijerya'da sivrisineklerden izole edilmiştir. Bu virusla ilgili insan, sığır, rodent, koyun ve at serumlarında nötralizan antikorlar saptanmıştır (Ulrich ve ark., 1985; Andrewes ve Walton, 1990). KOT virusu ise sığırlarda 40.5-41°C ateş, iştahsızlık, kaslarda titreme ve klonik kasılmalar ile karakterize ve Rhabdoviruslar tarafından oluşturulan Ephemeral fever'a benzer bir hastalığa neden olmaktadır (Andrewes ve Walton, 1990).

**Obodhiang virusu(OBOD)**, Sudan'da sivrisineklerden (*Mansania uniformis*) izole edilmiştir.

Fare, hamster, köpek ve maymunların intraserebral inokulasyonlarda Afrika viruslarına (Lagos yarasa ve MOK virusu) karşı duyarlı oldukları gözlenmiştir. Bu viruslar enfekte hayvanların beyin ve tükürük bezlerinden izole edilebilir. Kır farelerinden izole edilen OBOD'nın da intraserebral olarak süt emen farelere verildiğinde patojenik etkili olduğu görülmüştür (Andrewes ve Walton, 1990).

King (1993) ve Bourhy ve ark. (1990) ise Latin Amerika'da kan emen yarasalar ile Kuzey Amerika'da insektlerle beslenen yarasalardan ve memelilerden izole ettikleri virusa klasik kuduz virusu diyerek etkeni tek tip virus olarak sınıflandırmışlardır.

Ayrıca attenüe edilmiş olan LEP (Low egg passage), HEP (High egg passage) ve SAD (Street Alabama Dufferin) viruslarının apatojen oldukları ve periferal yoldan verilmeleri halinde bağışıklık sağladıkları, fakat LEP ve SAD virus suşlarının intraserebral verilmelerinde ise öldürücü oldukları bildirilmiştir (Baer ve Wandeler, 1987).

Kuduz virusu, çok hassas olup lipidi eriten alkol, eter, kloroform gibi maddelerden, asit, ultraviyole ışınlar ve ısıdan etkilenir(Ulrich ve ark., 1985; Baer ve Wandeler, 1987). 70-80 °C'de birkaç dakika içinde, 56 °C'de 4-6 saatte, 37 °C'de 5 günden fazla ve 18 °C'de yaklaşık 23 günde inaktive olur. Buna karşılık soğuk ve

kuru ortamlarda çok dayanıklıdır (Ulrich ve ark., 1985). Dondurulmuş dokularda yıllarca etkinliğini korur (Clark, 1988). Otoliz ve putrefaksiyona da çok dayanıklıdır, otolitik bir beyinde 7-10 gün, kadavrada ise 90 güne kadar canlı bulunur. Virus, 0-8 °C'de 2 ay, kuru toprak zeminde 5 hafta süreyle enfeksiyöz etkisini korur. Bu virus için % 70'lik alkol, iyotlu alkolik dezenfektanlar, iyot bağlantılı ve amonyaklı solusyonlar, % 1-2 NaOH (sodyum hidroksit), kuvvetli asitle % 0.25-0.9'luk formalin solüsyonu iyi bir dezenfektandır. Fenol türlerine karşı dayanıklılık gösterir (Buxton ve Fraser, 1977; Ulrich ve ark., 1985).

### 1.3. Epizootoloji

Kuduz ada ülkeleri ile sıkı karantina kuralları uygulayan ve köpek girişini yasaklayan ülkeler hariç, dünyanın birçok yerinde görülür (Blood ve ark., 1983; Jubb ve ark., 1985; Andrewes ve Walton 1990). Avustralya ve Yeni Zelanda'da hastalık hiç görülmemiştir (Blood ve ark., 1983; Jubb ve ark., 1985). Finlandiya, Yunanistan, İrlanda, İzlanda, Norveç, Portekiz, İsveç, İngiltere ve Kuzey İrlanda hastalığın eradike edildiği ülkelerdir (Anon, 1995; Anon, 1996). Danimarka, İtalya, Lüksemburg ve Hollanda'da son yıllarda kuduz vakasına rastlanmamıştır (Anon, 1996). Kuduz Avusturya, Çekoslovakya ve Fransa'da süratle azalırken, Belçika, Almanya, Slovenya ve İsviçre'de artmıştır (Anon, 1995; Anon, 1996). Dr. Müller tarafından hazırlanan Avrupa Kuduz Bülteni'ne göre 1977 yılında en fazla kuduz olgusuna sırasıyla Almanya, Avusturya, Fransa, Polonya, İsviçre, Türkiye, Macaristan ve Çekoslovakya'da rastlanırken, 1996 yılında bu tablonun değişerek ilk sırayı Polonya'nın aldığı bunu daha sonra Rusya, Macaristan, Slovakya, Çekoslovakya ve Slovenya'nın takip ettiği belgelenmiştir (Anon, 1996). Hastalığın eradikasyonu için başlatılan oral immunizasyon çalışmalarında ve vahşi hayvan eliminasyonunun yapılmasında (Irvin, 1970; Barrat ve Aubert, 1993; Anon, 1996) ülkelerin elde ettikleri başarı oranına bağlı olarak bu sıralama yıllar içinde değişmektedir.



Kuduz özellikle vahşi hayvanlar arasında hızla yayılan bir zoonozdur. Bütün memeli hayvanlar (özellikle karnivorlar), Chiroptera aileleri ve kanatlıları kapsayan bir enfeksiyon spektrumu vardır (Ulrich ve ark., 1985). Yabani köpek ırkları (tilki, kurt, çakal, kokarca-*Mephitis mephitis*, sırtlan), kediler, çeşitli rat türleri, hamsterler, tarla fareleri, rakunlar (*Procyon lotor*), insanlar ile meyve ve böcek yiyen yarasalar bu enfeksiyon spektrumu içinde önemli yer tutarlar (Buxton ve Fraser, 1977; Russel ve ark., 1984; Schroder, 1989; Krebs ve ark., 1992; Fischman ve ark., 1992; Forman, 1993; Krebs ve ark., 1993). Kuduz epizootolojisinde evcil kanatlı türlerinin rolü açık değildir. Uzun yıllar vahşi kuşların kuduz virüsü için hem taşıyıcı hem de rezervuar olduğu sanılmıştır (Shannon ve ark., 1988).

Avrupa'da ilk kuduz istatifi 1850 yılında yapılmış ve 1170 kuduz vakasından 690'ı tilki, 105'i porsuk, 112'si köpeklerde görülmüştür (Akan, 1994). Schroder (1989), Almanya'da yapmış olduğu 10 yıllık bir taramada hastalığın özellikle tilki (*Vulpes fulva*, *Urocyon cinereoargenteus*) ve kedilerde yaygın olduğunu saptamıştır. Ayrıca Avrupa'da kırmızı tilkiler (*Vulpes vulpes*), kutup tilkileri (*Alopex lagopus*), köpekler ve böcek yiyen yarasalar (özellikle *Eptesicus serotimus*) (Tabel ve ark., 1974; Barrat ve Aubert, 1993), Doğu Avrupa'da rakun köpekler (*Nyctereutes procyonoides*) (King ve Turner, 1993), Alaska'da kuzey kutbu tilkileri (*Alopex lagopus*), Türkiye'de köpekler (Anon, 1995; Anon, 1996), Beyaz Rusya sınırları içinde, Afganistan, İran ve Irak'da ise tilki ve köpeklerin en önemli taşıyıcılar olduğu belirlenmiştir. Kuzey Amerika'da son 5 yıl içerisinde yapılan kedi-köpek aşılama programları ile "köpek kuduzu" azalmasına rağmen kurt, kokarca ve rakunlarda hastalık hala enzootik olarak gözlenmektedir (King ve Turner, 1993). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde böcek yiyen yarasalar tüm kuduz hastalığının görüldüğü hayvanların % 10-15'ini oluşturmaktadır (Ulrich ve ark., 1985).

Hastalığın yayılışı vahşi hayvanların çiftleşme ve yiyecek arama dönemi olan yaz sonu ve sonbahar başı dönemlerine rastlamaktadır (Blood ve ark., 1983). Jenkins ve Winkler (1987), en yüksek oranı (% 80-92) ağustos, kasım, ocak aylarında, en düşük oranı (% 9) ise mart ve haziran aylarında saptamıştır. Fishman ve ark. (1992)



ise rakunlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada kuduzun kış sonunda artmaya başlayarak, mart ayında en yüksek noktaya ulaştığını kaydetmişlerdir. Jenkins ve Winkler (1987) hastalığa % 52 erkek, % 62 dişi hayvanlarda rastlamışlardır.

Kuduz yayılışına ve genel konakçısına göre epizootolojik olarak;

1. Köpek kuduzu (Urbanen form)
2. Tilki kuduzu (Silvatik form)
3. Yarasa kuduzu

olmak üzere üç grupta incelenmiştir (Ulrich ve ark., 1985).

**1. Köpek kuduzu (Urbanen Form) :** Doğu Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde bulunmuş olup gelişmekte olan ülkelerde önemli bir şehir problemi (Ulrich ve ark., 1985; Baer ve Wandeler, 1987). Kedi ve köpekler % 90 esas portördür. Enfeksiyon kedi ve köpeklerden diğer hayvanlara, özellikle de sığır ve insanlara geçer (Ulrich ve ark., 1985).

**2. Tilki kuduzu (Silvatik Form) :** Son yıllarda Avrupa'da % 60 oranında kırmızı tilkilerde saptanmıştır. Bu tilkiler başlıca portördür (Blood ve ark., 1983; Ulrich ve ark., 1985). Doğu Avrupa'da özellikle sansarlarda, ABD'de su ayıları ve kokarcalarda, Asya'da tilki ve kurtlarda, Afrika'da çakal ve Mongusto ırkı bir kedide görülmüştür. Tilki kuduzu, köpek kuduzuna göre daha yavaş yayılır (Ulrich ve ark., 1985).

**3. Yarasa Kuduzu :** Orta ve Güney Amerika'da bulunmuştur. Kan emen yarasalar hastalığın merkezi olup insanlar ve evcil hayvanlar için tehlike kaynağıdır (Ulrich ve ark., 1985). Türkiye'de ise 1956 yılında tek bir yarasada (*Rhinolophus ferrum-equinum*) kuduz bildirilmiştir (Tunçman, 1958).

Anabilim Dalımızda 1933-1960 yıllarında nekropsileri yapılan tüm köpeklerin içinde kuduzun bulunuş oranı % 20 (Pamukçu ve Ertürk, 1961), 1961-1972 yıllarında

% 15.6 (Ertürk ve Tanzer, 1973), 1973-1984 yıllarında % 35.9'dur (Berkin ve Alçıgır, 1986). 1996 yılında, Avrupa ülkelerinden 38'inde saptanan 8080 adet insan, evcil ve vahşi hayvan kuduz olgusundan 125 adeti (% 1.54) Türkiye'de gözlenmiştir. Bu oran ile ülkemizin, Avrupa ülkeleri arasında 11'inci sırada yer aldığı görülmüştür. Türkiye'deki bu 125 adet kuduz vakasının 103'ü köpek, 4'ü kedi, 14'ü sığır, 4'ünün de koyun ve keçiden oluştuğu bildirilmiştir. Ekim-Aralık 1996'da rastlanan 23 adet kuduzun 21'i köpekte olup bunların 15'i İstanbul ilinde, diğerleri ise 1'er adet olmak üzere Adıyaman, İzmir, Kırşehir, Kahramanmaraş, Ordu ve Sakarya illerinde kaydedilmiştir. Sığırlardaki 2 olgu ise İstanbul ve Batman illerinde saptanmıştır (Anon, 1996).

#### 1.4. Patogenez

Kuduzun patogenezinde rol oynayan en önemli hayvanlardan köpek, kedi, yabani etçiller, tarla fareleri ve yarasalar hastalığın esas portörleri olup enfeksiyon siklusunu üzerlerine almışlardır. Kuduz her zaman öldürücüdür (Blood ve ark., 1983) ve genellikle hasta hayvanın ısırmasında enfekte salya ile bulaşır. Bulaşmada bazen de virus ihtiva eden salyanın, defekt bulunan deri ve mukozalarla kontaminasyonu da rol oynar (Buxton ve Fraser, 1977; Blood ve ark., 1983; Jones ve Hunt, 1983; Jubb ve ark., 1985; Ulrich ve ark., 1985). Ayrıca spontan konjunktival ve aerogen enfeksiyonlar da kaydedilmiştir (Anon, 1981; Akan, 1994; King ve Turner, 1993). Temasin ya da ısırığın tehlikeli olması salyadaki ya da diğer maddelerdeki virusun virülensi ve miktarı (Ulrich ve ark., 1985; Fekadu ve ark., 1988b), ısırılan yerin derinliği, genişliği, kanlı olup olmaması, lenf damarlarından ve sinirsel dokulardan zenginliği, yaranın medulla spinalis ve beyine yakın ya da uzak olması gibi faktörlere bağlıdır (Ulrich ve ark., 1985). Örneğin başta oluşan bir ısırıkta hastalığın inkübasyon süresi bacadakine göre oldukça kısadır (Murphy ve ark., 1973; Blood ve ark., 1983).

### 1.4.1 İnkübasyon süresi

Hastalığın inkübasyon süresi insanlarda genellikle 3-12 hafta olmakla birlikte hayvan türleri arasında değişkenlik göstermektedir. Deneysel olarak arka ayak tabanına virus enjekte edilen farelerde inkübasyon süresi 17-20 gün olarak saptanmıştır. Bu süre köpeklerde 10 gün-2 ay, kedilerde 2-10 gün, sığırlarda 25-150 gün, vahşi hayvanlarda ise 10 gün - 6 ay arasında değişmektedir (Baer ve Lentz, 1991). İnokulasyonları izleyen 18. güne kadar yapılan nörektomi, amputasyon ve koterizasyon çalışmaları sonrası mortaliteye rastlanılmaması, virusun inkübasyon periyodunun büyük bir kısmını ısırık bölgesinde geçirdiğini ve daha sonra hızla periferel sinirler boyunca medulla spinalise yayıldığını göstermiştir (Baer, 1988). Ayrıca insanlarda ısırılmayı izleyen çok kısa zaman süreci içinde yapılan aşı, spesifik serum uygulamaları ve yara bölgesinin yıkanması işlemlerinde yanıt alınması; bu inkübasyon periyodu süresince vücudun immunolojik açıdan çok iyi korunduğunu ve virusun, periferel sinir hücreleri içine girmeden uzaklaştırılabileceğini ya da nötralize edilebileceğini ispatlamıştır (King ve Turner, 1993).

### 1.4.2. Isırma ve periferel sinire deneysel enjeksiyonlar sonrası oluşan kuduz olgularının seyri.

Kuduz virusunun kas ve sinir hücrelerine bağlanması ve penetrasyonuna ait bilgiler, invitro olarak hücre kültürleri ile yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Etken ısırma veya enjeksiyonlar sonrası öncelikle kas hücrelerine tutunmaya ve replike olmaya çalışır (Murphy ve ark., 1973). Virusun glikoprotein molekülleri kas hücresi yüzeyindeki reseptörlere bağlanır. Virus özellikle asetilkolin reseptörlerinin yoğun bir şekilde bulunduğu sinapslara, hücre yüzeyindeki fibrillere veya filamentöz materyale bağlanmayı tercih etmektedir (King ve Turner, 1993). Asetilkolin reseptörlerinin yetersiz olduğu ortamlarda ve hücrelerde ise karbonhidratlar, fosfolipidler, sialat gangliosid ve siyalik asit de asetil kolin reseptörleri gibi işlev görebilirler. Bu reseptörlere bağlanma sonrası virus hücre içine ya doğrudan plazma membranının

füzyonu ya da hücre yüzeyindeki asidik endozomlardaki veziküllerce sarılı reseptör-virus kompleksinin endositozisi yolu ile girer.  $\text{NH}_2\text{Cl}$  (amonyum klorür) ve klorquin gibi kimyasal ajanlarla endozomların pH'sı alkaliye dönüştürüldüğünde virusun hücre içine girişinin önlendiği gözlenmiştir (Tsiang ve ark., 1989; Baer ve ark., 1990; Baer ve Lentz, 1991; Tsiang ve ark., 1991).

Asidik pH altında, füzyon veya endositoz yolu ile hücre içine giren virus sarkolemma ve sarkoplazmik retikulumda replike olur. Replikasyon sonrası virus tomurcuklanma yolu ile plazma membranından ekstrasellüler boşluğa bırakılır (Baer ve Lentz, 1991; King ve Turner, 1993). Murphy ve ark. (1973), kuduz virusunun kaslardaki replikasyon aşamasının, periferal sinir sistemini işgal edecek yeterli virus sayısını elde etmede mutlaka gerekli bir aşama olduğunu vurgulamaktadırlar. Kuduz hastalığının inkübasyon periyodunun uzunluğuna; inokulasyon bölgesi, inoküle edilen virus partiküllerinin miktarı ve enfekte kas fibrilleri sayısının yanısıra bu kaslarda replikasyon aşamasının da önemli bir yeri vardır. Baer ve Lentz (1991), sokak virusunun tamamen tersine, fiks virusun kas hücrelerinde replike olmaksızın sensorik ve motorik hücrelere geçebileceğini belirtmişlerdir.

Virus nöromusküler kavşağa yakın kas fibrillerindeki replikasyonunu ve ekstrasellüler boşluğa bırakılmasını takiben nöromusküler uçtaki sensorik terminallere ve nöromusküler kavşaktaki motor terminallere asetilkolin reseptörleri vasıtası ile bağlanır. Virus kas hücrelerinde olduğu gibi füzyon ve endositoz yolu ile periferal sinir hücresine girerek aksoplazmada membranöz vakuoller içinde bulunur (King ve Turner, 1993).

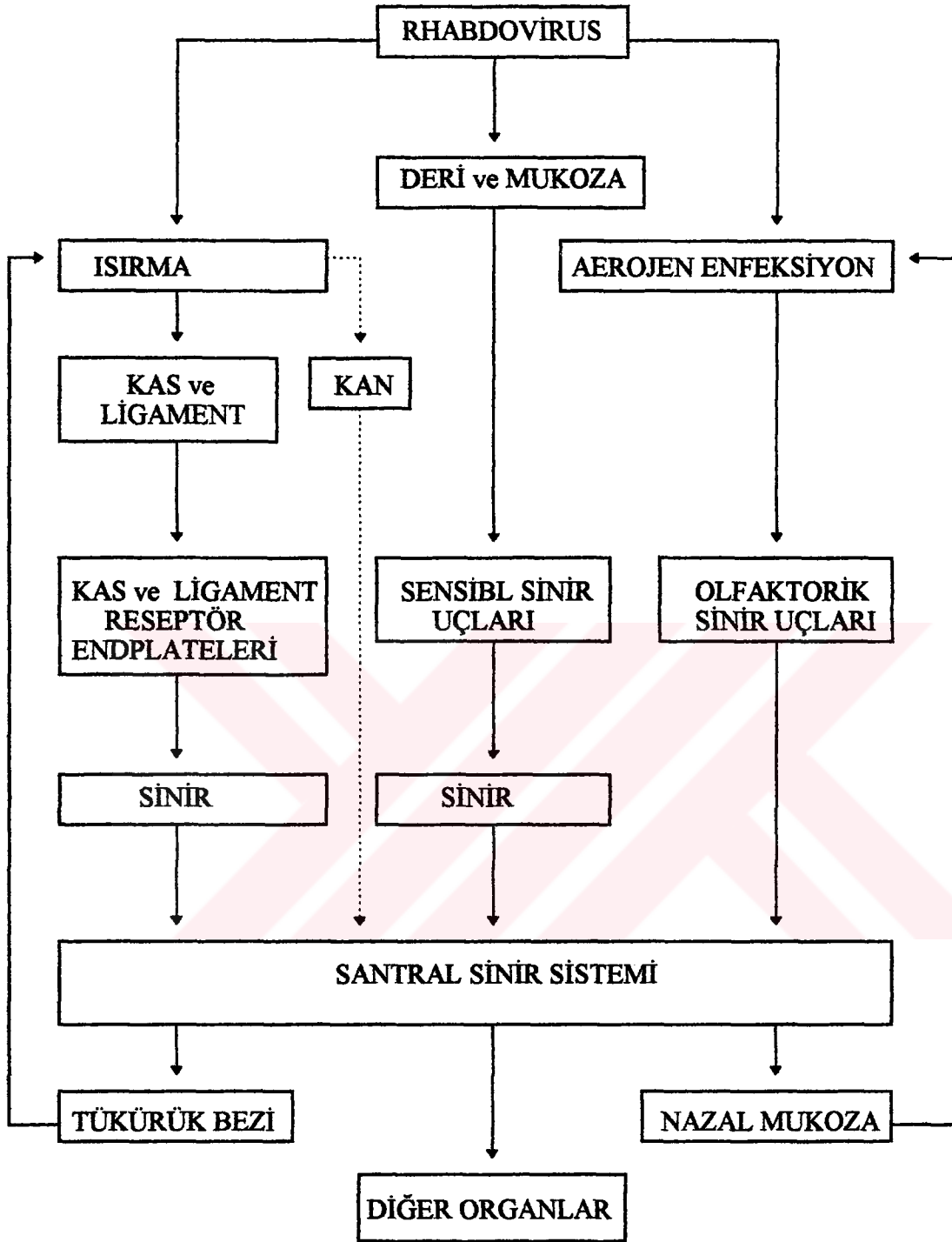
Periferal sinir sisteminde, aksoplazmada membranöz vakuoller içinde bulunan virus, füzyonlaşma ve retrograd aksoplazmik yol ile dorsal spinal gangliyon hücrelerine, bunu takiben de diğer gangliyonlara ve medulla spinalise yayılır (Baer ve Lentz, 1991; Weiland ve ark., 1992; King ve Turner, 1993). Ratlarda perinöral dokuların (epinöyrium, perinöyrium) uzaklaştırılmasını takiben mortalite oranlarında, kontrol grubuna göre herhangi bir değişkenliğin olmaması virusun

pasajlanmasının perinöyriyal olmayıp aksonal olduğunu göstermiştir . Virus, spinal ve dorsal root ganglion hücreleri aracılığı ile subaraknoidal boşluğa dolayısıyla serebrospinal sıvıya ve merkezi sinir sistemine ulaşır(Tsiang ve ark., 1989; Tsiang ve ark., 1991). Santral sinir sisteminde virusun taşınması aktif ve pasif olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Beyin ve medulla spinalis nöronları ile merkezi sinir sisteminin glial hücreleri, multiplikasyon ile virusun aktif yayılımına yardımcı olur. Kuduz virusu, etkisi altına aldığı nöronların değişik noktalarında (perikaryon, dendrit, akson) replikasyonu gerçekleştirir. Bundan sonra virus, esas olarak sinaptik alanlarda görülür. Ancak santral sinir sisteminin doku aralıklarına geçmesinin de mümkün olduğu düşünülmelidir. Santral sinir sisteminde virusun pasif taşınımı ise serebrospinal sıvı veya kan yolu ile olmaktadır. Serebrospinal sıvıyı saran ependimal ve glial hücreler nadiren enfekte olmalarına rağmen pasif taşınım bu hücrelerin yardımı ile gerçekleşmektedir (Murphy ve ark., 1973; Schneider, 1991).

Viral antijen çoğunlukla beyin dokusundaki nöronlarda lokalize olmalarına rağmen interfaziküler oligodendrositler, özellikle korona radiata, internal kapsül, optik kanal ve bazı astrositleri de yerleşim yeri olarak seçtikleri kaydedilmektedir (Iwasaki, 1991). Beyin dokusunun rhinensefalon bölgesindeki nöronlarda yoğun bir şekilde viral antijenlere rastlanırken, medulla spinalis, beyin korteksi, diensefalon ve hipotalamik bölgede düşük oranda belirlenmiştir (Johnson ve ark., 1980; Ceccaldi ve ark., 1989; Schneider, 1991). Yapılan immunofloresan çalışmalarda glial, meningeal, ependimal ve vasküler hücreler gibi nöronal olmayan hücrelerde antijen belirlenmemiştir (Johnson ve ark., 1980; Jackson ve Reimer, 1989). Hücre bazında, periferik sinir sisteminde asetilkolin reseptörlerine bağlanan virus santral sinir sisteminde, nörotransmitter bir madde olan glutamat, gama-amino butirik asit (GABA) ve glisin reseptörlerine bağlanır. Virusun merkezi sinir sisteminde bu reseptörlere bağlanması ve replikasyonu sonucu, sinaptik bölgelerde, özellikle de akso-dendritik sinapslarda tomurcuklanma, interselüler boşluklarda serbest pasajlanma ve retrograd aksoplazmik akım ile diğer hücrelere geçiş sağladığı bildirilmiştir (Iwasaki, 1991).

Virus, beyinde yaşamsal öneme sahip sinir merkezlerine yakın noktalardan köken alan sinirler vasıtası ve aksoplazmik akım ile tükürük bezlerine, santral sinir sistemindeki ve serebrospinal gangliyonlardaki nöronal perikaryondan vücudun tüm sinir hücrelerine ve nöronal olmayan dokularına anterograd geçiş sağlar (Gillet ve ark., 1986; Charlton ve ark., 1987; Schneider, 1991; King ve Turner, 1993). Kehl (1981) virusun organizmada yayılışını şematize ederek özetlemiştir(Şema 1).

Virus beyin ve tükürük bezlerinin dışında kornea, trakeal mukus, trakea, faringeal ve oral mukoza, dil, dil papillaları, olfaktorik nöroepitelyum, submaksillar bezler, parotis, kalp, akciğerler, karaciğer, safra kesesi, böbrekler, adrenal bezlerin özellikle kromafin hücreleri, pankreas, dalak, sidik kesesi, testisler, ovaryumlar, barsaklar, skapular kaslar, yarasaların kahverengi yağ dokuları ve kıllarla ilişkili periferel sinir sonları, süt, fötus, kan ve gaita da bulunmuştur. Bu durum etkenin santral sinir sistemi dışında da replike olabileceğini göstermektedir. Ancak önemli olan virusun her zaman tükürük bezlerinde ve santral sinir sisteminde bulunmasıdır(Silva ve ark., 1967; Silva ve Souza, 1968a; Silva ve Souza, 1968b; Silva ve Souza, 1968c; Silva ve Souza, 1968d; Silva ve ark., 1968a; Silva ve ark., 1968b; Murphy ve ark., 1973; Blood ve ark., 1983; Ulrich ve ark., 1985; Andrewes ve Walton, 1990).



Şema 1. Kuduz virusunun organizmada yayılışı (Gabriele Kehl, Hannover 1981).



### **1.4.3. Hastalığın klinik gelişimi**

Klinik bulgular, virusun beyin dokusunda replikasyon veya olgunlaşma evresi geçirdikten sonra ortaya çıkmaktadır. Virus nöronlarda lizis ve nöronofajiye neden olur. Virusun geçirdiği olgunlaşma süreci boyunca hücre içindeki endoplazmik retikulum depolarını tükettiğini dolayısıyla da hücre fonksiyonlarını etkisiz hale getirerek klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (Schneider, 1991). Bunun yanı sıra Iwasaki (1991), kuduz virusunun nöron yüzeyinde bulunan GABA ya da glisin gibi nörotransmitter maddelere bağlanarak, nörotransmitter maddelerin salınma ve geçişini engelleyerek bu hücrelerde fonksiyon bozukluğuna neden olması sonucu klinik bulguların ortaya çıkabileceğini bildirmiştir. Kuduz olgularında saldırgan davranışların oluşumu, saldırgan davranışların baskılandığı merkez olan orta beyinin rafe nüklei hücreleri ile medial hipotalamusun virus tarafından fonksiyon yapamaz duruma getirilmesine bağlanmaktadır (King ve Turner, 1993). Ayrıca hipotalamus ve adenohipofize yayılan virus, büyüme hormonunun salınımını etkileyerek timusun atrofisine ya da kaybolmasına ve T lenfositlerine bağlı immunitenin de supresyonuna neden olmaktadır (Torres-Anjel ve ark., 1988). Paralitık formun; beyin ve medulla spinaliste hücre yıkımlanması, mikrogliyal proliferasyon ve perivasküler infiltrasyon sonucu, sakin formun ise yangısal ve vasküler değişikliklerin daha çok serebral korteks, talamus ve hipotalamusta şekillenmesi sonucu ortaya çıktığı bildirilmiştir (King ve Turner, 1993). Ölüm, virusun beyin dokusunda yaşamsal öneme sahip sinir merkezlerini etkisi altına alması ve asfeksi sonucu şekillenmektedir (Schneider, 1991).

### **1.4.4. Hastalığın intraserebral inokulasyonlardan sonra gelişimi**

Farelerde yapılan çalışmalarda intraserebral enjeksiyonları takiben 2. günde nöronlarda antijenlere rastlanılmıştır. Virus öncelikle yoğun bir şekilde rhinensefalon nöronlarında, sınırlı oranda ise diensefalon ve hipotalamustaki motor nöronlarda



yayılır. Etken beyin dokusunda medulla spinalisin ventral kornusundaki nöronlara ve dorsal spinal gangliyonlarına anterograd aksonal akım ile yayılır (Schneider, 1991).

#### **1.4.5. Hastalığın intranasal uygulamalardan sonra gelişimi**

Kuduz virusunun nazal enfeksiyonu olfaktorik bölgelerde bulunan mukoza yüzeyine kadar uzanmış sinirler aracılığı ile oluşur. Ancak mukozada virusun girebileceği bir portantrenin olması şarttır. Çok sayıda yaralarının bulunduğu mağaralara giren insanlarda nazal yolla enfeksiyon olabilir (Kehl, 1981). İntranasal inokulasyonlar sonrası virusun nazal mukozanın epitel hücrelerinde ekstrasöronal olarak multiplikasyona uğradığı kaydedilmiştir. Multiplikasyon sonrası çok kısa bir sürede olfaktorik yolla olfaktorik bulbuslara, kornu ammonis ve bu bölgeleri takiben korteks nöronlarında, serebellum ve medulla spinalisin anterior kısımlarında virus antijenleri belirlenmiştir (Schneider, 1991).

#### **1.4.6. Hastalığın intravenöz uygulamalardan sonra gelişimi**

Kuduz virusu antijeni kuyruk veninden inokule edilince önce santral sinir sisteminin sonra spinal gangliyonların enfekte olduğu gözlenmiştir (Schneider, 1991).

#### **1.4.7. Hastalığın korneal inokulasyonlar ve transplantasyonlardan sonra gelişimi**

Tavşanlarda kuduz virusu antijeninin korneal inokulasyonları sonrasında yapılan histopatolojik çalışmalarda, erken dönemde mikrogliyal reaksiyonlara, daha sonra ise medulla spinalisin kanalis sentralisini döşeyen endim hücrelerine yakın nöronlarda dejenerasyonlara rastlanılmıştır (Schneider, 1991). Ayrıca insanlarda kuduz virusu ile enfekte korneal transplantasyonları takiben de kuduz hastalığının şekillendiği kaydedilmiştir (Anon, 1981; King ve Turner, 1993). Ratlarda korneaya yapılan kuduz

virusu antijeni inokulasyonları sonucunda, inokulasyonları izleyen 2'inci saatte siliar gangliyon, 48'inci saatte Edinger-Westphal ve medial preoptik nukleus'ta ve sonrasında ise beynin birçok bölgesinde virus antijeni belirlenmiştir (Iwasaki, 1991). İntravital kuduz teşhisinde önemli rol oynayan korneal antijen, tükürük bezindeki antijenden önce saptanamadığı kaydedilmiş ve ayrıca her iki kısımda da aynı anda virusun bulunması tükürük bezi innervasyonunu sağlayan N. facialis ve N. trigeminus'un ponsta yanyana bulunan nukleuslarıyla açıklanmıştır(Schneider, 1969).

#### **1.4.8. Deri yolu ile bulaşmada hastalığın gelişimi**

Enfeksiyonun şekillenmesi için ya ısırma olması ya da portantreli deri kısmının enfektif salya ile temas etmesi gerekmektedir. Etken derinin sensorik sinirleri aracılığı ile santral sinir sistemine ve oradan diğer organlara yayılabilir (Kehl, 1981).

#### **1.4.9. Oral yolla bulaşmada hastalığın gelişimi**

Dil papillalarının bulunduğu bölgelerde ve ağız mukozasında yer alan çok sayıda sensible sinir uçları vardır. Defektli yüzeyden etken girerek bu sinir uçları aracılığı ile sentrifugal olarak santral sinir sistemine ulaşır. Retrograd yolla da diğer organlara yayılabilir(Kehl, 1981).

#### **1.4.10. Hastalığın kronik veya abortif enfeksiyonlardaki seyri**

Deneysel veya doğal olarak, kuduz virusu ile enfekte hayvanların karakteristik kuduz hastalığı belirtilerini gösterdikten sonra iyileşmesi veya yaşamını devam ettirmesi olgusu kronik ya da abortif virus enfeksiyonu olarak tanımlanmaktadır (Schneider, 1991).

Bir insanı ısırıldıktan sonra karantina altına alınan ve herhangi bir klinik semptom göstermeyen köpeğin salyasından 37 ay süre ile virus izole edilmiştir (Reid ve ark., 1983). Fekadu ve Shaddock (1984), deneysel olarak Etiyopya sokak virusu ile enfekte ettikleri köpeklerin ikisinin klinik bulgulardan sonra iyileştiğini gözlemişlerdir. Fekadu ve ark. (1988b), yaptıkları çalışmada deneysel olarak enfekte ettiği köpeklerden birinin hastalığın klinik olarak görülmesinden sonra iyileştiğini fakat 305 gün salyasında virus bulunduğunu belirlemiştir. Bu köpeğe yapılan nekropsi sonucunda virus, sadece damak tonsillerinden izole edilebilmiştir. Fekadu (1991), deneysel enfeksiyonlardan iyileşen köpeklerde oranın % 0-20'ye kadar çıktığını ve iyileşmenin etkenin suşu ile dozuna bağlı olduğunu vurgulamıştır.

Abortif veya kronik enfeksiyonlarda santral sinir sistemi içinde virusun replikasyonu ve yayılımı öncelikle interferonlar vasıtası ile önlenmekte ve daha sonra devreye spesifik antikorların girdiği düşünülmektedir (Schneider, 1991).

## **1.5. Bulgular**

### **1.5.1. Klinik Bulgular**

Hastalığın inkübasyon periyodu, genellikle 3 hafta olmakla beraber 2 hafta ile birkaç ay arasında değişebileceği belirtilmektedir. Bazı hayvan türlerinde, özellikle sığır ve köpeklerde 5-6 aya kadar uzayabilir (Blood ve ark., 1983; Balachandran ve Charlton, 1994).

Etkenin giriş yerine bağlı olarak 10-250 gün arasında ortaya çıkan klinik bulgular, hastalığı şekillendiren virusun tipine, titresine, inkübasyon periyoduna ve hastalığın süresine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Genelde klinik bulgular üç devre şeklinde seyreder (Ulrich ve ark., 1985; İmren ve Şahal, 1990). Devreler arasında kesin bir sınır olmamakla birlikte yine de ayrılık gözlenebilir (İmren ve Şahal, 1990)

1. **Melankolik devre (Prodromal devre, Stadium prodromorum) :** Üç gün sürer. Genel bulgu olarak sersemlik, durgunluk ve yutmada zorluk gözlenir (Ulrich ve ark., 1985). Üçüncü göz kapağı düşer, pupillalar genişler (Fekadu, 1993).

Köpeklerde bu devre ya tam oluşur ya da hiç oluşmaz. Hayvan huysuzdur, verilen komutları yapmaz ya da isteksizdir. Fizyolojik etkilere yanıt vermez, karanlık bir yere çekilir (Ulrich ve ark., 1985; Fekadu, 1991). Aç olsa bile yemek yemez, yutma güçtür, salya artmıştır (Ulrich ve ark., 1985; Fekadu, 1991; Blancou, 1994). Pupillalar eşit değildir, myosis veya midriyasis, kaşıntı ve ısırma isteği vardır (İmren ve Şahal, 1990). Aerofobi-hidrofobi gözlenir (Anon, 1989; Petrovic, 1989).

2. **Saldırgan devresi (Eksitasyon devresi, Stadium exitationis) :** Melankolik devri takiben 2 gün sürer. Huysuzluk, hareketlerde artış, ısırma isteği, paraliz, koma ve ölüm belirgin klinik bulgulardır (Ulrich ve ark., 1985; Fekadu, 1993). Hasta hayvan insanlara ve diğer hayvanlara sebepsiz yere saldırır, ısırmaya çalışır. Demir yeme isteği gibi pika hastalığına benzer bulgular gösterir. Bu devrenin sonuna doğru larinks kaslarının paralizi sonucunda köpeğin ses tonu değişerek boğuklaşır (Blood ve ark., 1983; Ulrich ve ark., 1985; Andrewes ve Walton, 1990; Fekadu, 1991; Blancou, 1994). Farinks kaslarının spazm ve paralizine bağlı olarak şekillenen yutma güçlüğü, salya akışına neden olur (Fekadu, 1991). Seksüel istek ve libido artmıştır. Vücut ısısı normal olmakla beraber, genellikle 39.5-40.5 °C bulunmuştur (Blood ve ark., 1983; Tollis ve Civardi, 1989).

3. **Paralitik devre (Stadium paralyticum) :** Diğer devreleri takiben, periferik sinirleri de kapsayan miyelinli motor nöronların dejenerasyonu sonucunda (Weiland ve ark., 1992) baş, yutma ve göğüs kasları ile eklemlerde 4-5 gün süren bir paraliz oluşur ve hayvan ölür (Ulrich ve ark., 1985; Fekadu, 1993; Blancou, 1994).

Bu devrede masseter, dil ve göz kasları, arka kısımlar ve anüs paralizedir (Blood ve ark., 1983; Ulrich ve ark., 1985; Andrewes ve Walton, 1990). Masseter kasının paralize olması sonucu şekillenen çene düşmesi karakteristik bulgulardandır

(Fekadu, 1991). Hayvan sallantılı yürür, kuyruk deviasyonu ve tenesmus vardır. Hayvan zayıflar, beden ısı normaldir (Ulrich ve ark., 1985). Solunum ve nabız artmıştır, köpüklü bir salya vardır, sudan korkar (Anon, 1989). İdrarda şeker tesbit edilir (Rajan ve Padmanaban, 1987). Vakaların % 55-90'ı akut paralitik kuduz şeklindedir (Gribencha ve ark., 1989). Türkiye'de 1900-1923 yıllarında paralitik kuduz yaygın iken daha sonraki yıllarda saldırgan tipteki kuduz bunun yerini almaya başlamıştır(Tunçman, 1952).

Eksitasyon devresi hayvanlarda belirgin olarak ortaya çıkmaz ve hastalık birden melankolik formdan paralitik döneme geçerse, hastalık **sakin kuduz** olarak isimlendirilir(Ulrich ve ark., 1985; İmren ve Şahal, 1990). Sakin kuduz, *Mustelidae* ve *Viverridae* familyasına ait yarasalarda oluşur. Hayvanlar 3-4 gün içinde ölürler (Ulrich ve ark., 1985).

Bunların dışında hiperestezi, motilite bozukluğu, depresyon (İmren ve Şahal, 1990), intestinal bulgular (Ulrich ve ark., 1985) ve intersitisyel miyokarditis ile seyreden **atipik kuduz** olgularında görülebilir (Castillon, 1973). Hastalık bazen 3 ay kadar devam edebilir(İmren ve Şahal, 1990). Batı Afrika'da köpeklerde kuduzun "**Oulou fato**" adı verilen özel bir şekli saptanmıştır. Bunun atenüe edilmiş kuduz virusu aracılığı ile oluşturulduğu sanılmaktadır. Hastalığın saldırgan formu görülmeksizin **sakin kuduzla** karakterizedir. Kısa bir inkübasyon periyodu, ishal ve progresif bir paraliz vardır. Şekillenen inklüzyon cisimcikleri Negri cisimciklerinden farklıdır(Andrewes ve Walton, 1990).

## 1.5.2. Patolojik Bulgular

### 1.5.2.1. Makroskopik Bulgular

Nekropsisi yapılan kuduz hayvanlarda damarların dolgun olması dışında dikkat çekici bulgular bulunmamaktadır (Baer ve Wandeler, 1987; Fekadu ve ark., 1988b). Ancak, mide de sindirilemeyen yabancı cisimler ve bazı saldırma olgularında kadavrada taze ısırık yarası görülebilir (Baer ve Wandeler, 1987).

### 1.5.2.2. Histopatolojik Bulgular

Kuduzun histolojik tanısında ilk bulgu Babes nodüllerinin saptanmasıdır (Babes, 1892). Bu bulguyu 1900 yılında proliferatif ve infiltratif lezyonların bulunuşu takip etmiştir ve Babes nodülüne de **rabidic tüberkül** adı verilmiştir (van Gehuchten ve Nelis, 1900). Histopatolojik incelemelerde patognomonik bulgu, 1903 yılında Negri tarafından kornu ammonisteki nöronlarda ve serebellumun Purkinje hücrelerinde, Gasserian gangliyonu ve beyin stemindeki büyük nöronlarda tanımlanan pembe renkli, 2-10 mikron büyüklüğündeki intrasitoplazmik Negri cisimcikleridir (Negri, 1903; Irvin, 1970; Buxton ve Fraser, 1977; Baer ve Wandeler, 1987; Fekadu, 1988; Andrewes ve Walton, 1990). Histopatolojik incelemelerdeki diğer bulgular nöronal dejenerasyonlar (santral kromatoliz, sitoplazmik vakuolizasyon, piknoz ve karyoreksis), serebellumun moleküler katı hücrelerinde artış, hem beyinde hem de leptomeninklerde özellikle lenfosit ve plazmositlerden ibaret mononükleer hücre infiltrasyonları ile karakterize dissemine nonpurulent meningoensefalitistir (Percy ve ark., 1973; Blood ve ark., 1983; Jubb ve ark., 1985; Baer ve Wandeler, 1987; Fekadu ve ark., 1988b; Jackson ve ark., 1989; Hamir ve ark., 1992a). Çoğu kapillarlar, arterioller ve venüllerde akut vaskülitis de fark edilmektedir (Percy ve ark., 1973). Gasserian gangliyonundaki değişiklikler gangliyon hücrelerinin dejenerasyonu, kapsuler hücre proliferasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonları ile karakterize

gangliyo-nöritisten ibarettir (Percy ve ark., 1973; Jackson ve ark., 1989). Gözlerde gangliyon hücrelerinde dejeneratif değişikliklerin yanısıra Negri cisimcikleri ve perivasküler infiltrasyonlar dikkati çeker. Akciğerlerde alveol lumenlerinde ödeme ve eritrosit kümelerine rastlanmaktadır. Kalpte intersitisyel miyokarditis bazen de özellikle sağ ventrikülde bazı arteriollerde fibrinoid nekroz oluşmaktadır (Percy ve ark., 1973). Adrenal medullada damarlar dilate olup yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları fark edilmektedir (Balachandran ve Charlton, 1994). Dalak korpuskülleri piknotik ve karyorektik lenfositler içerir. Kırmızı pulpanın retikulo-endotelyal hücreleri hiperplaziktir (Percy ve ark., 1973). Atrofik olan parotis bezlerinin lumenleri daralırken bazılarının epitel hücreleri hiperplaziktir. Submandibular bezlerde, bez epitelleri dejenere ya da nekrotik olup stromada mononükleer hücre infiltrasyonları vardır (Ninomiya, 1955).

## 1. 6. Kuduz Hastalığında Tanı

**1.6.1. Klinik tanı :** En iyi teşhis kuduzdan şüphelenilen hayvanın bekletilip ölüp ölmeyeceğini saptamaktır. Eğer bir hayvanda hastalıktan şüphelenilmiş ve insanlarla temas etmişse 10 gün karantina altına alınır. Bu süre içinde ölürse hayvanla temas eden herkes aşılır (Ulrich ve ark., 1985).

Rajan ve Pradmanaban (1987) klinik olarak kuduzdan şüpheli hayvanların % 67'sinde glikozüri saptamışlar ve bunun hastalığın teşhisinde faydalanılabilecek ikinci dereceden önemli bir bulgu olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca kan, idrar ve gaitadan yapılan virus nötralizasyon testleri ile etken değerlendirilebilir. Ancak kuduzun teşhisi için nötralizan antikorların varlığı gerekli değildir. Pasif hemaglutinasyon, komplement fikzasyon, radyoimmunoassay ve indirekt floresan antikor boyamaları da yardımcı olabilir. Ancak bu testler hastalığın varlığını saptamadan ziyade immun yanıtı tesbit etmede kullanılmaktadır (Blood ve ark., 1983).



İntravital dönemde korneadan hazırlanan korneal tuşeler; korneanın santral sinir sistemi ile kısa nervöz bağlantısının bulunması ve diğer organların aksine sinirlerden zengin olması nedeni ile hastalığın tanısında yardımcıdır (Schneider ve Ludwig, 1968). Ayrıca baş ve kulak derisinden biyopsiler, burun biyopsisi ve serolojik testler yapılmasına rağmen canlı hayvanlarda kuduz hastalığının teşhisi çoğunlukla mümkün değildir (Blenden, 1974; Blenden ve ark., 1983, Fekadu ve Shaddock, 1984; Clark, 1988).

**1.6.2.Seller boyama :** Hastalığın tanısında kullanılan ilk yöntemdir. Negri cisimciklerinin saptanmasında kullanılan bu metot, 1927 yılında Seller tarafından tanımlanan ve onun adıyla bilinen metottur (Anjaria ve Jhala, 1985). Bu metotta sahada pembe renge boyanmış, değişik büyüklük ve şekillerde (oval, yuvarlak, mekik), kesin sınırlı ve bazofilik granüller içeren inklüzyonlar görülmektedir. Ancak hazırlanan preparatların kalın olması, erken ölme durumlarında Negri cisimciğinin az olması ya da yapılan tuşelerin, nöronların bol olduğu yerlerden yapılmaması gibi faktörler testi olumsuz yönde etkilemektedir.

**1.6.3.Histopatolojik incelemeler :** Rutin formol fikzasyonu ve parafin bloklamayı takiben hematoksilin-eosin (HE) ya da diğer histolojik boyamalar, morfolojik ayrıntıları çok iyi gösterirler, ancak kuduzun spesifik yapısının identifikasyonu intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri (Negri cisimcikleri) ile sınırlı kalmaktadır (Moulton, 1954; Levaditi ve ark., 1971; Sung ve ark., 1976; Loreto ve ark., 1988).

**1.6.4. Deneme hayvanı inokulasyonları :** İlk kez 1934 yılında bir fareye kuyrukiçi verilerek yapılmıştır. İnokulasyonda en az 6 tane 21-30 günlük ve 9-15 gr ağırlığındaki fareler tercih edilir ve şüpheli materyalden 0.03 ml intraserebral olarak verilir (Sureau ve ark., 1975). Klinik semptomları takiben ölen hayvanlarda sırasıyla Seller boyama, histopatolojik incelemeler, immunohistokimyasal testler ve deneme



hayvanı inokulasyonları yapılır. Kulonen ve ark. (1991), bu inokulasyonların FAT'ni doğrulamak amacı ile yapıldığını belirtmişlerdir. Oysa Wilsnack ve Parker (1966), fare inokulasyonu testlerinde kullanılan tükürük bezleri ve beyinde *Rabies Inhibiting Substance* (RIS)'ının bulunmasının kuduz antijeninin saptanmasını engellediğini ileri sürmüşlerdir. Çünkü intraserebral inokulasyonlarda bu substansın varlığının farelerde virusun öldürücü etkisini ortadan kaldırdığını bildirmişler ve immunofloresan yöntemlerde RIS'nin varlığında dahi kuduz antijenini kolaylıkla gözlemlemişlerdir.

**1.6.5. İmmunoperoksidaz yöntemi :** Atanasiu ve ark. (1971), 1971 yılında ilk defa hastalığın tanısında immunoperoksidaz yöntemini denemişlerdir. Son yıllarda Palmer ve ark. (1985)'da kuduzla enfekte hayvanların formolde tespit edilmiş ve parafinde bloklanmış dokularında, viral antijenleri göstermek için enzimle işaretli antikorlar kullanarak immunoperoksidaz yöntemini denemişlerdir. Santral sinir sistemi'nde subkortikal ve ak maddede yerleşen glia hücrelerinde özellikle interfaskikular oligodendrositler, kornu ammoniste yer alan nöronlar (Das ve ark., 1985; Feiden ve ark., 1988), serebellar kortekste granüler ve moleküler katta yer alan küçük sinir hücrelerinin yanısıra özellikle Purkinje hücreleri, bazı kapillar endotel hücreleri, müköz hücreler, submandibular tükürük bezleri, adrenal medulladaki kromafin hücreleri, derinin epidermal hücreleri, kıl foliküllerinin etrafını çevreleyen vagina pili eksterna hücreleri ve korneal epitel hücrelerinin içerdiği antijenler bu metotla sarı-kahverengi partiküller şeklinde saptanmıştır(Das ve ark., 1985; Feiden ve ark., 1988; Fekadu ve ark., 1988a; Balachandran ve Charlton, 1994)

**1.6.6. İmmunofloresan yöntemi :** Kuduzun tanısında 1958 yılına kadar Seller boyama ile histopatolojik incelemelerin dışına çıkılamamıştır. Bu yıllarda Goldwasser ve Kissling (1958) tarafından hastalıkların tanısında immunofloresan yöntemi ilk defa kullanılmaya başlanması, kuduzun incelenmesinde farklı bir teşhis yöntemini gündeme getirmiştir(Carski ve ark., 1962). Bu yöntem, kuduz ve kuduz benzeri virusların nükleoproteinlerine karşı özel spesifik monoklonal ve poliklonal antikor kullanmak suretiyle yapılır (Smith ve ark., 1972; Zimmer ve ark., 1990; Kulonen ve ark., 1991; Balachandran ve Charlton, 1994). Floresan antikor tekniği (FAT) olarak da bilinen bu yöntemle, taze enfekte dokulardan hazırlanan smear ve tuşe preparatlarda; dondurma mikrotomu ile alınmış veya formolde tesbit edilmiş dokulardan elde edilen kesitlerde kuduz viral antijenini kısa sürede ortaya koymak mümkündür. Antijen tesbitine dayandığından rutin tanıda kullanılan, doğruluğu ve spesifikliğı kanıtlanmış en uygun yöntemdir (Carski ve ark., 1962; McQueen ve ark., 1960; Trimarchi ve Debbie, 1974; Kissling, 1975). Bu yöntemde özellikle orta beyin, beyincik, beyin stemi ve medulla spinalisin servikal kısımlarındaki glia hücreleri ile nöronlarında, Gasserian gangliyonundaki gangliyon hücrelerinde ve sinir uzanımlarında parlak yeşil renkte granüler tarzda floresan veren viral partiküller gözleneir (Fekadu ve ark., 1988a). Benzer görünümdeki viral antijene ağız ve kulak derisi, kas hücrelerinin sarkolemmal hücreleri ile perimisyumda; parotisin bez ve kanal epitelleri ile lumeninde; pankreas, meme, böbrek, dalak, ovaryum, testis, sindirim sistemi, solunum sistemi, üriner sistem, kan, kalbin özellikle ventrikül ve koroner sulkusların bulunan sinir fibrillerinde de rastlanılabilir (Blenden, 1974; Blenden ve ark., 1983; Fekadu ve Schaddock, 1984). Spontan ve deneysel araştırmalarda canlı ve ölmüş hayvanlardan elde edilen sonuçlara göre bazı kuduz enfeksiyonları hariç viral antijenin göz korneasında da sıklıkla saptandığı ifade edilmiştir (Zimmerman, 1971).

Yukarıda sözü edilen yöntemler dışında hastalığın tanısını kuvvetlendirmek için daha az sensitiviteye sahip **Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)** ve **Rapid Enzyme Immunodiagnosis (RREID)** testlerinin de yapılabileceğı bildirilmiştir (Kulonen ve ark., 1991)

## 1.7.Kontrol

Kuduza yakalanan insan ve hayvanların kurtulması pek mümkün olmadığından özellikle korunmaya önem verilmiştir. Bilhassa ülkeden ülkeye hayvan geçişi söz konusu ise birkaç hafta karantina uygulanarak kanda antikor aranması salık verilir(Mackenzie, 1990). Korunma 2 şekilde olur.

**1.7.1.Kuduz virusu ile temas etmeden önce korunma :** Kuduz veya kuduzdan şüpheli hayvanları yakalayanlara, muayene eden veteriner hekimlere, teşhis laboratuvarlarında çalışan teknisyen ve veteriner hekimlere koruyucu olarak aşılama yapılabilir(Baer ve Wandeler, 1987).

**1.7.2. Kuduz virusu ile temas ettikten sonra korunma :** Kuduz veya kuduzdan şüpheli hayvan tarafından ısırılan ya da salyası ile teması olan kişiler bu bölgeleri bol sabunlu su veya dezenfektanlar ile iyice yıkamalı ve aşı yaptırmalıdır(Baer ve Wandeler, 1987).

Hastalığın tedavisi mümkün olmadığından, insanlara virus ile temas edince, hayvanlara ise koruyucu nitelikte aşılama uygulanır (Buxton ve Fraser, 1977; King, 1993). İnsanlarda ilk aşılama 1885 yılında Pasteur tarafından *attenüe pasteur aşısı* ile yapılmış olup daha sonra Fermi ve Semple aşısı kullanılmaya başlanmıştır (Buxton ve Fraser, 1977). Fakat Burkhardt ve ark. (1950), yaptıkları bir dizi çalışmada, aşılamaı takiben köpeklerde nörolojik bozukluklar, paraliz ve ölen hayvanların santral sinir sistemlerinde demyelinasyon alanları gözlenmiştir. Ancak son yıllarda bu olumsuz etkilere sahip olmayan doku kültürü aşıları geliştirilmiştir(Buxton ve Fraser, 1977).

Aşılama prosedürleri insan ve hayvanlarda farklılık göstermektedir. Hayvanlar 3 aylık olmadan aşılama yapılmaz. Anneden yavruya geçen maternal antikolar göz önüne alınarak erken yapılan aşılamada immunité kazandıracak antijenlerin bunlarla inaktive olacağı kabul edilir. Birinci aşılamadan sonra aşının birer kez tekrarlanması ile bağışıklık devam eder (WHO, 1973). Son yıllarda insanlarda Pasteur Merieux tarafından insan diploid hücrelerinde Wistar rabies PM/WI 38-1503-3M tipi kullanılarak elde edilen inaktif aşılar kullanılmaktadır. Isırılma ya da salya ile temas varsa bu aşı 5 doz halinde intramuskuler yoldan D0., D3., D7., D14. ve D30. günlerde aşı uygulanır. Eğer bir yıl içinde tekrar etkene maruz kalırsa tek doz; bir yıldan daha kısa sürede maruz kalırsa D0., D3. ve D7. günde tekrarlanmak üzere 3 doz aşı yapılır. Olağanüstü bir durum söz konusuysa, ısırılan bölgenin derinliği çok fazla ise D0'ıncı günde 20 I.U./kg insan orijinli spesifik kuduz immunoglobulinleri ek olarak verilebilir.

Korunmada önemli bir yol hayvan sahiplerini bilinçlendirilerek hayvanlarını yılda birkez aşılatırmalı ve kayıtlarının tutulmasıdır. Sahipsiz hayvanlar ise ya kontrol altında tutularak aşılanmalı ya da öldürülmelidir. Hastalığın kontrolü vahşi hayvan popülasyonunun yoğun olduğu yerlerde, evcil hayvanlara göre daha zordur. Hayvanları tuzaklarla yakalamak ya da zehirlemek suretiyle vahşi hayvan popülasyonunun azaltılması düşünülebilir. Ancak bu hem pratik yönden hem de maliyet açısından çözüm değildir (Clark, 1988; King, 1993). Son yıllarda İsviçre ve Almanya'da özellikle tilkilere, attenüe canlı kuduz aşısı ( SAD suşu ve bununla ilgili SAD-Bern, SAD-B 19, ERA ve Vnukova 32 suşları) içeren beytler yedirerek immunizasyon çalışmaları yapılmaktadır (Meyer, 1980; Schneider ve ark., 1988; Mackenzie, 1990; Wandaler, 1991; Meehan, 1995). Bunların istenilen sonucu vermesi için bu şekilde yutulan aşı antijeninin bağırsaklara geçerken mide de inaktive olmaması gerekmektedir (Tolson ve ark., 1990).

Türkiye’de köpeklerin kontrol altında tutulduğu semtlerde benzer denemeler uygulanmaktaysa da, henüz deneme aşamasındadır.



## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Materyal

Çalışma materyalini; 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 blokları oluşturmuştur.

Nekropsileri yapılan hayvanların beyinlerinden resim 1 ve resim 2'de gösterildiği üzere nukleus kaudatus (resim 1-2-a), *diensefalondan* talamus (resim 1-b,c), *mezensefalondan* kollikulus rostralis (resim 1-d) hizası; *rombensefalondan* pons serebri (resim 1-g), serebellumun vermisi (resim 2-c), medulla oblangata (resim 1-e); *telensefalondan* kornu ammonis (resim 1-f ve resim 2-b ) ve medulla spinalise (resim 1-h) koronal kesitler yapılarak 1-3 adet doku örneği alındı. Bu doku örnekleri ile Gasserian gangliyonu (trigeminal gangliyon), parotis ve submandibular tükürük bezleri, mukoza ve deriden geçecek şekilde ağız ve burun kanadı, tonsiller, göz, kulak ve ağız çevresi derisi, larinks, trakea, akciğerler, kalp, dalak, karaciğer, safra kesesi, böbrekler, adrenler, pankreas, mide, ince bağırsaklar, retrofaringeal ve mezenteriyel lenf düğümleri, idrar kesesi ve testislerden alınan birer adet doku örnekleri %10'luk tamponlu formolde tespit edildi ve parafinde bloklandı. Her parafin bloktan 4-6 mikron kalınlığında alınan kesitler (aynı bloktan 4 kesit) histopatolojik incelemeler, immunohistokimyasal yöntemler ve kontrol için kullanıldı.





## 2.2. Metot

### 2.2.1. Histopatolojik metot

Adı geçen organlardan hazırlanan kesitler bilinen yöntemle göre **hematoksilen-eosin (HE)**; beyindeki spongiyöz değişikliklerin myelin yıkımından ileri gelip gelmediğinin değerlendirilmesi amacıyla da sadece bu şekildeki değişiklikleri kapsayan kesitler **Luxol fast blue** ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi (Luna, 1960).

### 2.2.2. İmmunohistokimyasal metotlar

Işık mikroskopik yöntem için hazırlanan aynı doku kesitlerinin diğerlerine ise immunoperoksidaz ve immunofloresan metodu uygulandı.

**İmmunoperoksidaz 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 4-6 mikron kalınlığında alınan kesitler önce 40 °C'lik su banyosuna atılıp dokunun açılması sağlandı ve eter-alkol (1:1) karışımında temizlenmiş, dokunun yapışması için jelatinli krom alum sürülmüş lamalar üzerine alınıp 10 dakika 48 °C 'lik etüvde kurutuldu; sonra da ksilollerde deparafinize ve 100, 96, 80 ve 70 °'lik alkol serilerinden de geçirilerek dehidre yapıldı. Üç kez 5'er dakika phospat buffer saline (PBS) 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 pronase solüsyonuna konularak 45 °C'lik etüvde 30 dakika bekletildi. Üç kez 5'er dakika PBS içinde yıkandı. Bundan sonra endojenöz peroksidaz aktivitesini azaltmak için kesitler, oda ısısında 5 dakika % 3'lük hidrojen peroksitte tutuldu ve iki kez PBS içinde 5'er dakika yıkandı. Doku çevresi kurulandıktan sonra kesitler nemli kamaraya alındı ve üzerlerine birer damla normal keçi serumu damlatılıp 20 dakika 45



°C'lik etüvde bekletildi. Serum dökülerek primer antikorla<sup>1</sup> yani tavşanda kuduz virus ribonukleoproteinine karşı hazırlanmış hiperimmun serum (1/500 sulandırma) ile 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 5'er dakika iki defa yıkanan kesitler, üzerlerine % 1.2'lik hidrojen peroksit damlatılarak bu kez oda ısısında 20 dakika bekletildi. Bundan sonra Streptavidin-peroksidaz damlatılıp 45° C'lik etüvde 20 dakika tutularak yeniden PBS'te yıkandı. Nihayet kesitler 5 ml deionize su, 2 damla konsantre bufer, 2 damla % 3'lük hidrojen peroksit ve 2 damla konsantre 3 - amino - 9 - etilkarbazol ( AEC )'den oluşan kromojende 7 dakika tutulduktan sonra 2 kez 5 dakika deionize suda yıkandı ve Mayer's hematoksilen boyasında 1 dakika karşıt boyamaya tabi tutulup çeşme suyu altında yıkandı. Jelatinli yapıştırıcı damlatılarak lamelle kapatıldı.

İmmunoperoksidaz yöntem için hazırlanan kontrol preparatlar da aynı prosedüre göre boyandı. Ancak primer antikor yerine normal tavşan serumu kullanıldı. İmmunoperoksidaz yöntem ile boyanan preparatlar Olympus binoküler mikroskopta (CHT model- 9L0354, 220-240 V) incelenerek değerlendirildi.

**İmmunofloresan incelemeler.** Kuduz virusu antijeninin doku kesitlerinde saptanması için indirekt immunofloresan yöntemi uygulandı. Kesitlerin boyamaya hazırlanmasında uygulanan deparafinizasyon, dehidrasyon ve tripsinizasyon işlemleri burada da peroksidaz yöntemindeki aynı sırayı izledi. Kesitler tavşanda kuduz virus ribonukleoproteinine karşı hazırlanmış hiperimmun serum<sup>1</sup> (1/100 sulandırma) ile 45° C'lik etüvde 2x20 dakika inkube edildi. Serumla inkube edilen kesitler inkubasyon süreleri sonunda 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkayıp doku çevreleri kurulandıktan sonra yeniden nemli kamaralara alındı ve üzerlerine keçide tavşan IgG'sine karşı hazırlanıp fluoresceinisothiocyanate (FITC) ile işaretlenmiş anti-tavşan

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

hiperimmunerum konjugatından (Sigma- F 6005) damlatıldı. Yeniden 45° C'lik etüvde 30 dakika tutuldu. Bu ikinci inkubasyondan sonra PBS ile yıkanan ve kurulan kesitlerin üzerine 1 damla gliserinli PBS karışımı damlatılıp lamelle kapatıldı. Çevreleri parafin ile kaplanarak inceleninceye kadar buzdolabında saklandı. Kesitlerin incelenmesi üstten ışıtmalı floresan mikroskobu ( Leitz Laborlux D, BP 450-490 filtre sistemli, civa buhar lambalı, karanlık sahalı) ile yapıldı.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. MAKROSKOBİK BULGULAR

Nekropsileri yapılan 10 adet köpeğin kalvaryumları uzaklaştırıldığında bütün hayvanların, özellikle meningeal damarları hiperemikti. İki hayvanda retrofaringeal ve mezenteriyel lenf düğümleri şişkin, kesit yüzü nemli ve koyu renkte idi. Diğer organlarda makroskopik olarak seçilebilen bir bulguya rastlanmadı.

#### 3.2. MİKROSKOBİK BULGULAR

##### Santral Sinir Sistemi

**Kornu ammonis** : *Histopatolojik incelemelerde*, bütün olgularda leptomeningeal ve parankimal damarların çoğu hiperemikti. Parankimde bu damarların bir kısmında perivasküler hafif veya orta şiddette; meninkslerde ise sadece birkaç alanda çoğunluğu lenfosit, tek tük plazmosit ve makrofajların bulunduğu nonpurulent meningoensefalitis görüldü. Olguların tümünde serebral kortekste glia hücrelerinde değişen derecede artış, 2 olguda da küçük kanama alanlarına rastlandı. Bunlara ilaveten özellikle piramidal hücre bölgesinde, birkaç bölgede diffuz veya fokal glial hücre proliferasyonu, nöron dejenerasyonları ve nekroz ile çevrelerinde glial proliferasyon (satellitosis) ve birkaç alanda değişik şiddette makrofajlardan zengin nöronofaji ile birkaç glial nodüle (Babes nodülleri) rastlandı. Sekiz olguda ise bazı nöron sitoplazmalarında (perikaryon) 1-2 adet, değişik büyüklükte, belirgin pembe renkli, yuvarlak veya oval şekilli inklüzyon cisimcikleri görüldü (Resim 3). Bu cisimciklerin hücredeki yerleşim yerleri her olayda farklı idi. Bu cisimciklere nekrotik

nöron bölgelerinde, nöropilde serbest olarak da rastlandı. Kalan 2 köpekte bu inklüzyon cisimcikleri bulunamadı, ancak bunların serebellumlarında inklüzyon cisimcikleri vardı. Histopatolojik incelemelerde saptanan bulgular Tablo-1'de özetlenmiştir.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda*, bütün olgularda nöronların birçoğunda sitoplazma, akson ve dendritlerde tuğla kırmızısı-kahverenginde, değişik büyüklükte, granüler yapıda, immunoperoksidaz (IP) pozitif viral antijenler saptandı (Resim 4 ve 5). Aksonlardaki IP pozitif antijenler bazen tesbih tanesi gibi bir sıralanma gösteriyordu. Benzer antijenler ile birkaç inklüzyon cisimciği nöropil içinde (Resim 5) ve polimorf sinir hücrelerinde (Resim 6) görüldü. Sekiz olguda saptanan inklüzyon cisimcikleri ise bu viral antijenlere oranla daha büyük, keskin sınırlı, açık sarı renkli, homojen matrikste, tuğla kırmızısı granülleri bulduran bir yapıda, bazıları ise granül ihtiva etmeksizin diffuz kahvemsiz renkte (Resim 4 ve 5) veya az antijenle içeren nöron sitoplazmaları, homojen solgun sarı renge boyanmıştı. Kontrol boyamalarda sitoplazmanın rengi mavimsiz idi. Bu renk farklılığı enfeksiyon için tipik bulgu idi. İmmunoperoksidaz boyamada saptanan sonuçlar Tablo-1'de özetlenmiştir.

*İmmunofloresan boyamalarda* 10 olguda hem ekstrasellüler hem de piramidal (Resim 7) ve Oriens katmanı'ndaki sinir hücrelerinin sitoplazma ve uzantılarında (akson ve dendrit) immunoperoksidaz yöntemine göre daha az sayıda, granüler yapıda, parlak yeşil renkte boyanan immunofloresan (IF) pozitif viral antijenler gözlemlendi. Sekiz olguda saptanan inklüzyon cisimcikleri diğer viral antijenlere göre daha büyük, sınırlı ve parlaktı. İmmunofloresan boyamada saptanan sonuçlar Tablo-1'de özetlenmiştir.

**Serebellum** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-1), tüm köpeklerin bu bölgeden yapılan doku kesitlerinde diffuz hiperemi, birkaç leptomeningeal ve birçok parankimal damarlar çevresinde (Virchow Robin boşluklarında) orta veya şiddetli derecede çoğunluğu lenfosit, az sayıda makrofaj ve tek tük plazmosit hücre infiltrasyonları ile karakteristik nonpurulent meningoensefalitis dikkati çekti. Bir

köpekte substansia grizea'da fokal kanamalar görüldü. Sekiz köpekte Purkinje hücrelerinde dejenerasyon ve nekroza rastlandı. Bu hücrelerde sitoplazma homojen solgun pembe renkli, kenarları kıvrımlı görünümde idi ve çoğunlukla da çekirdekleri seçilemiyordu. Aynı sahalarda nöropilde yer yer diffuz glia hücre proliferasyonları ile nöronofajik nodüller görüldü. Purkinje hücrelerinin birkaçında 1-2 adet, değişik büyüklükte, belirgin pembe renkli, oval ya da yuvarlak, etrafı dar bir halka ile çevrili intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri saptandı (Resim 8). Diğer 2 adet köpekte bu inklüzyonlar görülemedi, ancak bunların kornu ammonislerinde inklüzyon cisimcikleri vardı (Tablo-1). İki olguda ise substansia alba'da bir bölgede, genişçe, sınırlı ve içleri boş spongiyöz değişikliklere (Resim 9) rastlandı. Luxol fast blue ile boyanmada bu bölgeler mavi renge boyanmış miyelinize alanlar arasında, boya almamış boşluklar halinde görüldü. Ayrıca bu bölgelerde diffuz fakat hafif glial hücre artışı saptandı. Bu bölgede damarlar çevresinde de belirgin mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü (Resim 9). Olguların hepsinde pedinkulus serebride birkaç nöronda dejenerasyon, gliosis, nöronofaji ve Babes nodülleri saptandı. Nöronofajiyeye uğrayan nöronların sitoplazmaları homojen pembe renkte, bazen çekirdeği gözden silinmiş ve büzüşük durumdaydı.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-1), tüm olgularda birçok Purkinje hücrelerinin ve birçok serebellar pedünkül nöronlarının sitoplazma ve uzantıları soluk sarı renkte boyanmıştı. Bu hücrelerde ve nöropilde bulunan viral antijenler de tuğla kırmızısı renginde ufak granüler yapıda idi. Purkinje hücrelerinde ufak granüler yapıdaki IP pozitif viral antijen sayısı çok azdı. Sekiz olguda görülen inklüzyon cisimcikleri ise daha koyu boyanma özelliği gösterdi (Resim 10). Buna ilaveten stratum granulozumda sinir hücrelerinin, substansia albada ise glia hücrelerinin etrafında (Resim 11) toz serpilmiş gibi çok sayıda, sınırlı IP pozitif boyanan viral antijenlere rastlandı.

*İmmunofloresan boyamalarda* (Tablo-1), 10 köpeğin hepsinde Purkinje hücreleri ile serebellar pedünkül nöronlarında ve ayrıca stratum granulosum hücrelerinin sitoplazma ve uzantılarında diffuz, soluk yeşil renkli zemin üzerinde

parlak yeşil renkte, granüler yapıda IF pozitif viral antijenler görüldü(Resim 12). Sekiz olguda nöron sitoplazmasında büyük ve parlak yeşil renkli inklüzyon cisimciklerine de rastlandı. Substansia albada da intra ve ekstrasellüler parlak yeşil renkli granüler yapıda IF pozitif viral antijenler görüldü.

**Talamus** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-1), bütün olgularda değişen derecede hiperemi ve fokal nonpurulent meningoensefalitis vardı. Substansia albada fokal olarak dağınık glial hücre proliferasyonu ve satellitosis görüldü. Bazı nöronlar çekirdeklerini kaybetmiş, düzensiz kenarlı ve soluk pembe renkli sitoplazmaya sahipti. Bu dejenerere ve kısmen nekroze olan nöronların bir kısmında nöronofaji başlamışken, bir kısmında da merkezinde nöron kalıntısı bulunan ya da bulunmayan Babes nodülleri şekillenmişti (Resim 13). Üç adet köpekte, nöron sitoplazmasında, değişik büyüklükte, pembe renkli, 1-2 adet inklüzyon cisimciği görüldü (Resim 14).

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-1) olguların hepsinde bazı nöronların çoğunlukla sitoplazma, akson ile nadiren dendrit başlangıçlarında ve nöropilde granüler yapıda, tuğla kırmızısı renginde IP pozitif viral antijenler ile 3 olguda ayrıca inklüzyon cisimcikleri saptandı (Resim 15). İnküzyon cisimciklerinin yapısı granüler görünüşte veya lapa şeklinde diffuz boyanma özelliğinde idi. Birkaç glia hücresinin etrafında da düzensiz dağılım gösteren benzer granüllere rastlandı (Resim 16).

*İmmunofloresan boyamalarda* (Tablo-1) ise tüm olgularda zemini diffuz soluk yeşil renkte boyanan nöronların sitoplazma, akson ve bazı dendritlerinde değişik büyüklükte, granüler yapıda, parlak yeşil renkli IF pozitif viral antijenler görüldü (Resim 17). Üç olguda sitoplazmada aynı renkte inklüzyon cisimciklerine rastlandı.

**Pons serebri** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-1), olguların hepsinde leptomeningeal ve parankimal damarlarda hiperemi ile fokal nonpurulent meningoensefalitis, olguların tümünde birkaç nöron çevresinde gliosis (satellitosis), değişik derecede nöron dejenerasyonu ve nekrozu, nöronofaji ile glial nodüller gözlemlendi.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-1), tüm olgularda nöronların çoğunun sitoplazma, akson ve dendritlerinde granüler yapıda, tuğla kırmızısı renginde IP pozitif viral antijenler vardı (Resim 18). Substantia albada serbest halde ve glia hücrelerinin etrafında da lapa şeklinde boyanan IP pozitif alanlara rastlandı.

*İmmunofloresan boyamalarda* (Tablo-1), tüm köpeklerin motor nöronlarının diffuz olarak soluk yeşil renkte boyanan sitoplazma, akson ve dendritlerinde yaygın ve çok sayıda farklı büyüklükte, granüler yapıda, parlak yeşil renkte IF pozitif viral antijenler bulundu (Resim 19).

**Kollikulus rostralis** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-1), olguların hepsinde leptomeningeal ve parankimal damarlarda hiperemi ile fokal nonpurulent meningoensefalitis dikkati çekti. İki hayvanda substantia alba'da geniş bir sahada spongiyöz değişikliklere rastlandı. Luxol fast blue ile yapılan boyamada serebellumdakine benzer olarak bu sahaların boyanmadığı dikkati çekti. Bu olgulardan birinde meninkslerin altında kanama alanları görüldü (Resim 20). Olguların tümünde değişik derecede nöron dejenerasyonları, glia hücre proliferasyonu ve Babes nodülleri saptandı. Dejenere nöronlar çekirdeklerini kaybetmiş ve soluk pembe renkliydi. Bir olguda bu nöronların bazılarının sitoplazmasında vakuoller, bazılarında ise 1'er adet değişik büyüklükte, pembe renkli, inklüzyon cisimcikleri saptandı (Resim 21).

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-1), viral antijenler tüm olgularda nöronların çoğunda açık sarı renkli boyanan sitoplazmasında, akson ve dendritlerinde granüler yapıda boyandı (Resim 22). Bir olguda bu hücrelerde granüler veya diffuz boyanma özelliğinde inklüzyon cisimciklerine de rastlandı. IP pozitif viral antijenler substantia albada serbest halde, glia hücrelerinin etrafında da lapa şeklinde görüldü.

*İmmunofloresan boyamalarda* (Tablo-1), tüm köpeklerde nöronlarının çoğunun perikaryon, akson ve dendritlerinde diffuz olarak soluk yeşil renkli zemin



üzerinde çok sayıda, granüler, parlak yeşil renkte IF pozitif viral antijenler bulundu (Resim 23). Bir hayvanda bir sahada nöron dışında benzer granüllere rastlandı. Bir olguda rastlanan inklüzyon cisimcikleri ise sınırlı, daha parlak yeşil renkte boyandı.

**Medulla oblongata** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-1), tüm olgularda hiperemi ve fokal nonpurulent meningoensefalitis görüldü. Bu bölgede fokal glia hücre proliferasyonu, nöron dejenerasyonları ve sayıca az ve ufak Babes nodülleri seçiliyordu.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-1), olguların hepsinde nöronların çoğunda diffüz açık sarı renkte boyanan sitoplazmada, daha az olarak da akson ve dendritlerde tuğla kırmızısı renginde boyanan, değişik büyüklükte, granüler yapıda IP pozitif viral antijenler saptandı (Resim 24).

*İmmunofloresan boyamalarda* (Tablo-1) beynin diğer bölgelerine göre daha az olarak, soluk sarı renkte boyanan sitoplazmada, çoğunlukla çekirdek etrafında yığılım gösteren parlak yeşil renkte ve granüler yapıda IF pozitif viral antijenler bulundu (Resim 25).

**Medulla spinalis** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-1), tüm olgularda leptomeningeal ve parankimal damarlarda hiperemi ve fokal nonpurulent meningoensefalitise rastlandı. Bu kesitlerde özellikle dorsal kornularda nöronal dejenerasyon, glial hücre proliferasyonu ve diğer beyin kesitlerine göre sayıca daha az ve ufak olarak Babes nodüllerine rastlandı.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-1), olguların hepsinde çoğunlukla açık sarı renkte boyanan nöron sitoplazmasında, daha az olarak da akson ve dendritlerinde değişik büyüklükte, granüler yapıda IP pozitif viral antijenler saptandı (Resim 26).

*İmmunofloresan boyamalarda* (Tablo-1) beynin diğer bölgelerine göre daha az olarak özellikle diffuz olarak soluk yeşil renkte boyanan nöron sitoplazmasında, çoğunlukla çekirdek etrafında yığılım gösteren parlak yeşil renkte ve granül şeklinde IF pozitif viral antijenler bulundu (Resim 27).

**Nukleus kaudatus** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-1), bütün olgularda leptomeningeal ve parankimal damarlar orta şiddette hiperemikti. Bu damarların bir kısmının çevresinde hafif veya orta şiddette; meninkslerde ise sadece birkaç alanda nonpurulent meningoensefalitis görüldü (Resim 28). Bütün köpeklerde bazı nöronlarda değişen şiddette satellitosis, nöronal dejenerasyonlar, bazı alanlarda da merkezinde çoğunlukla çekirdeğini kaybetmiş, soluk pembe renkli ve kenarları düzenli olmayan bir nöron parçası içeren ya da içermeyen multifokal nöronofaji alanları ve glial hücre proliferasyonları ile Babes nodüllerine rastlandı. Yalnız bir hayvanda aynı bölgedeki birkaç nöron sitoplazmasında değişik büyüklükte, birer adet inklüzyon cisimciği görüldü. Diğer 9 hayvanın bu bölgesinde inklüzyon cisimciği yoktu. Üç hayvanda ise substansia alba ve grizeada spongiyöz değişiklikler ve kanama alanları vardı. Spongiyöz değişiklikler luxol fast blue ile serebellum ve kollikulus rostralistikine benzer şekilde boya almadı.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-1), incelenen 10 hayvanın aynı beyin kesitlerinden yapılan, bütün olgularda nöronların birçoğunda sitoplazma, akson ve dendritlerde tuğla kırmızısı renginde, değişik büyüklükte, granüler yapıda IP pozitif viral antijenler saptandı. Benzer granüler yapılar nöropil içinde de görüldü. Histopatolojik incelemede 1 olguda görülen Negri cisimcikleri IP boyamada açık sarı renkli homojen matrikste tuğla kırmızısı renginde granüller veya granül ihtiva etmeyen diffuz kahvemsî renkteydi (Resim 29).

*İmmunofloresan boyamalarda* olguların hepsinde (Tablo-1), diffuz olarak soluk yeşil renkte boyanan tüm nöronların sitoplazma, akson ve dendritlerinde (Resim 30) IF pozitif viral antijenler parlak yeşil renkli, granüler yapıda ve 1 olguda da inklüzyon cisimciği özelliğinde boyanmıştı. Ancak beynin bu bölgesindeki nöronlarda

saptanan IF pozitiflik diğer bölgelere göre daha az ve zayıftı; çoğunlukla perifere yakın nöron sitoplazmasında lokalize olmuştu.

**Gasserian Gangliyonu:** *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-1) 10 köpeğe ait bütün kesitlerde bazı sinir hücrelerinde dejeneratif değişikliklerin yanısıra 2 köpekte birkaç nöron içinde değişik büyüklükte, pembe renkli, oval ya da yuvarlak ve etrafı açık renkli dar bir halka ile çevrili birer adet inklüzyon cisimciği görüldü (Resim 31). Bazı sahalarda hem sinir hücreleri etrafında (Resim 32) hem de aksonlar boyunca (Resim 33) yoğun lenfosit ile tek tük plazmosit ve makrofajlardan ibaret infiltrasyonlar fark edildi. Dejenere olan nöronların bir kısmı çekirdeğini kaybetmiş, soluk pembe renkli ve düzensiz kenarlı, büzüşmüş olup, bazılarında vakuoller dikkati çekti. Bu sahalarda fagosite edilme aşamasında nöronlara rastlandı. Aksonlar boyunca ise birkaç sahada fokal kanama odakları görüldü.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-1), 9 adet köpeğin sinir hücrelerinin diffüz soluk sarımsı boyanan sitoplazmalarında, koyu kahverengi IP pozitif, granüler yapıda viral antijenler saptandı (Resim 34). Bazılarının sitoplazmasında ise bulut şeklinde ancak dağınık yerleşimli açık kahverenkli yapılar dikkati çekti. Bunların nonspesifik bir boyanma olabileceği ihtimaline karşılık hazırlanan kontrol preparatları ile mukayesesinde IP pozitif viral antijenler olduğu kanıtlandı. İki olguda görülen inklüzyon cisimcikleri daha koyu renkli, büyük ve çeperi ince koyu kahverenkli bir halka ile sınırlı görünüme sahipti. Sinir telleri boyunca da diffüz soluk sarı renk değişimleri gözlemlendi.

*İmmunofloresan boyamalarda* (Tablo-1), tüm olgularda soluk yeşil renkte boyanan sitoplazmada granüler yapıda, bunlardan 3 olguda da inklüzyon cisimciği görünümünde parlak yeşil renkli IF pozitif viral antijenler saptandı (Resim 35). Benzeri granüler antijenler hücre membranına yakın, adeta bir çit oluşturur şekilde satellit hücrelerinde de görüldü.

**Göz** : *Histopatolojik incelemelerde*, 10 adet hayvanın retinasındaki tüm damarlar hiperemikti. Bunlardan 1 hayvanın 2 gözüne ait kesitlerde özellikle sinir tellerinin bulunduğu nöro-epitel katında ödem, fokal lenfosit ve histiyosit infiltrasyonu, 2 hayvana ait farklı kesitlerde de fokal kanama odakları gözlemlendi.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-2), 2 adet köpeğin retinasının sinir hücreleri katında (Resim 36a ve 36b) yer alan birkaç nöronun diffüz açık sarı boyanan sitoplazmasında ve bu hayvanlardan birinin korneasında (Resim 37a ve 37b), çoğunlukla bazal epitel hücrelerinde az sayıda, tuğla kırmızısı renğinde IP pozitif granüler viral antijenler kontrol preparatları eşliğinde saptandı.

*İmmunofloresan boyamalarda* (Tablo-2), 2 hayvanın retinasının sinir hücreleri katında yer alan birkaç nöronun perikaryonunda parlak yeşil renkte, granüler yapıda IF pozitif viral antijenlere rastlandı.

**Parotis** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2), olguların 8'i şiddetli olmak üzere hepsinde tüm damarlar hiperemikti. Sekiz olguda bazı bezlerin lumeni seçilememekteydi (Resim 38). Epitel hücreleri hacımca küçülmüştü. Ancak, dikkat çekici dejeneratif ya da nekrotik lezyonlar gözlenmedi. Lumeni görülen bezler ve akıtıcı kanallarda ise değişen derecede homojen eozinofilik bir içerik dikkati çekti (Resim 38). Bir hayvanın akıtıcı kanal epitellerinin bir kısmı hiperplazik olup etraflarında, aralarında nötrofil lökositlerin de bulunduğu lenfosit hücre infiltrasyonları gözlemlendi (Resim 39). Stroma hafif ödemli olup burada görülen gangliyon hücreleri ve sinir tellerinde belirgin bir değişiklik yoktu.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-2), 1 olguda bazı bez ve interlobuler kanal epitel hücrelerinde az sayıda, diffüz dağılımlı, tuğla kırmızısı görünümlü, granüler yapıda IP pozitif viral antijenler dikkati çekti.

*İmmunofloresan boyamalarda* (Tablo-2) 1 hayvanın kanal bez epitel hücrelerinde parlak yeşil renkte, granüler IF pozitif viral antijenlere rastlandı.

**Submandibular tükürük bezleri** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2), 2 olguda tüm damarlar hiperemik görünümdeydi. Bu kesitlerde bezler arasında ve akıtıcı kanalların etrafında hafif şiddette lenfosit hücre infiltrasyonlarına rastlandı. Bunlardan bir olguda kanal epitel hücreleri hiperplazikti ve interlober intersitisyumda yer alan gangliyon hücrelerinin birkaçı çekirdeğini kaybetmiş bazısı soluk, bazısı koyu pembe renkli, homojen, kenarları düzensiz bir görünüme sahiptiler. Bu hücreler çevresinde satellitosis ve nöronofaji fark edildi. İntramural gangliyon hücrelerinde inklüzyon cisimcikleri saptanmadı.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-2), 2 olguda seröz bezlerin ve interlobuler kanal epitellerinin sitoplazmalarında diffuz ya da çit şeklinde, hücre membranını çevreleyen, kahverengi IP pozitif alanlar bulundu (Resim 40). İntralober kanal epitellerinin sitoplazmasında şekillenen açık sarı renkli boyanma da kontrol preparatlarla karşılaştırmada pozitif kabul edildi. Bunlardan bir olguda gangliyon hücrelerinde ve sinir tellerinde homojen veya granüler yapıda sarı-kahverengimsi boyanan IP pozitif viral antijenler görüldü (Resim 41).

*İmmunofloresan boyamalarda* (Tablo-2) viral antijenler görülmedi.

**Trakea** : *Histopatolojik incelemeler ve immunofloresan boyamalarda* (Tablo-2) dikkat çekici bir bulgu saptanamadı.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* 2 köpekte epitel hücreleri üzerinde yer alan kinosilyumlarda ve bazı epitel hücreleri ile sinaps yapan sinir tellerinde, diffuz yerleşimli, tuğla kırmızısı renginde boyanmış IP pozitif viral antijenler görüldü (Resim 42a). Bu diffuz boyanmanın viral antijenlere ilgili olduğu kontrol boyama preparatları ile anlaşıldı (Resim 42b).

**Akciğerler** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2), 1 hayvanın tüm damarları hiperemikti. Çoğunlukla lumenleri boş olan alveoller genişleyerek

amfizematöz görünüm almıştı. Aynı hayvanın bazı alveol lumenlerinde ve intersitisyel dokusunda ödem dikkati çekti. Yine 1 olguda intersitisyel dokuda çoğunluğu lenfositlerden ibaret mononükleer hücre infiltrasyonları vardı.

*İmmunoperoksidaz ve immunofloresan boyamalarda* (Tablo-2), dikkat çekici bir bulguya rastlanılmadı (Tablo-2).

**Kalp** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2), 2 hayvanda diffuz hiperemi ve bunlardan birinde intermuskuler bağdokuda eritrositler ve çoğunluğu makrofajlardan oluşan mononükleer hücrelere rastlandı.

*İmmunoperoksidaz ve immunofloresan boyamalarda* dikkat çekici bir bulgu saptanamadı (Tablo-2).

**Dalak** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2), 2 olguda damarların hiperemik, foliküllerin ise hiperplazik olduğu gözlemlendi.

*İmmunoperoksidaz ve immunofloresan boyamalarda* dikkat çekici bir bulguya rastlanılmadı (Tablo-2).

**Karaciğer** : *Histopatolojik incelemeler, immunoperoksidaz ve immunofloresan boyamalarda* (Tablo-2) dikkat çekici bir bulguya rastlanılmadı.

**Safra Kesesi** : *Histopatolojik incelemeler, immunoperoksidaz ve immunofloresan boyamalarda* (Tablo-2) dikkat çekici bir bulguya rastlanılmadı.

**Böbrekler** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2), 2 hayvanın tüm damarları hiperemikti. Bunlardan birinde tubul lumenlerinde ve glomeruler boşluklarda hiyalin silindirleri ile kireç odaklarının yer aldığı dikkati çekti. Aynı hayvanda birkaç proksimal tubulde fokal epitel hiperplazisi saptandı. Ayrıca korteksinde fokal alanlar halinde mononükleer hücre infiltrasyonları ve bu alanlardaki glomeruler yumağın

pariyetal yapraklarında kalınlaşmalar dikkat çekiciydi. Pelvis renalis epitellerinde de hidropik dejenerasyon gözlemlendi.

*İmmunoperoksidaz ve immunofloresan boyamalarda* dikkat çekici bir bulguya rastlanılmadı (Tablo-2).

**Pankreas** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2), 6 adet köpeğin tüm damarlarında hiperemi, bunlardan 2 adet köpeğin akitıcı kanal epitellerinde fokal hiperplazi ve çevre bağdoku da ödem görüldü.

*İmmunoperoksidaz ve immunofloresan boyamalarda* dikkat çekici bir bulguya rastlanılmadı (Tablo-2).

**Böbreküstü bezleri(Adrenler)** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2), 6 olguda kortekste tüm damarlar hiperemikti. Bunlardan iki olguda kortikal ve meduller bölgelerde geniş kanama alanları, bu köpeklerden birinde de kapsulada medulla ve kortekse ait yapılar bulunan aksesör kortikal nodüller fark edildi. Medullada yer alan damarlar genişlemiş olup genellikle lumenleri boştu. Bu 6 köpekte de medullada özellikle lenfositlerden oluşan yoğun mononükleer hücreler dikkati çekti (Resim 43). Bir hayvanda periadrenal gangliyonlarda da sinir hücreleri arasında mononükleer hücreler görüldü.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-2), lezyonlu 6 köpekte medullada yer alan kromaffin hücrelerinde altın sarısı-kahverengimsi renkte, sitoplazmada diffuz görünümde nadiren granüler yapıda IP pozitif viral antijenler fark edildi (Resim 44).

*İmmunofloresan boyamalarda* IF pozitif viral antijenlere rastlanılmadı (Tablo-2).

**Mide** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2), 2 köpekte lamina propria damarlarda hiperemi, bunlardan birinde submukozaya yakın fokal bir odak halinde mononükleer hücrelere rastlandı.



*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-2) 1 hayvanda submukozaya yakın yer alan birkaç bezin prensipal hücrelerinin sitoplazmasında diffuz sarımsı oldukça az granüller şeklinde IP pozitif viral antijenler fark edildi (Resim 45).

*İmmunofloresan boyamalarda* dikkat çekici bir bulguya rastlanılmadı (Tablo-2).

**Bağırsaklar** : *Histopatolojik incelemeler, immunofloresan boyamalarda* (Tablo-2) dikkat çekici bir bulguya rastlanılmadı.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-), 1 adet köpekte submukozada yer alan sinir plexuslarında IP pozitif viral antijenlere rastlandı.

**Lenf Düğümleri** : *Histopatolojik incelemelerde,* 2 adet köpeğin retrofaringeal ve mezenteriyel lenf düğümlerinde lenfoid foliküllerin hiperplazik, trabeküllerin ise hipertrofik olduğu görüldü.

*İmmunoperoksidaz ve immunofloresan boyamalarda* dikkat çekici bir bulguya rastlanılmadı (Tablo-3).

**İdrar Kesesi** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2), 1 olguda epitel hücrelerinde fokal hidropik dejenerasyon alanları dikkati çekti.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-2), hidropik dejenerasyona uğrayan köpeğin epitel hücrelerinin sitoplazmasında, çekirdeğin bir kenarına yakın yerleşmiş üzüm salkımı şeklinde, ince granüler yapıda IP pozitif viral antijenlere rastlandı (Resim 46).

*İmmunofloresan boyamalarda* dikkat çekici bir bulgu saptanmadı (Tablo-2).

**Kulak ve Ağız Çevresi Derisi** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2) bir bulguya rastlanmadı.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-2) 1 hayvanda kulak derisi kıl follikülü epitel hücrelerinin sitoplazmalarında diffuz, kahverengimsi boyanma özelliği gösteren IP pozitif viral antijenler kontrol preparatları eşliğinde görüldü (Resim 47 ve 48). Ayrıca submukozasında bulunun sinir demetlerinde de diffuz kahverengimsi boyanmalar şeklinde viral antijenler saptandı.

*İmmunofloresan boyamalarda* (Tablo-2) IP pozitif olan aynı hayvanın kıl folliküllerinin etrafında da IF pozitif viral antijenler saptandı (Resim 49).

**Ağız** : *Histopatolojik incelemeler ve immunofloresan boyamalarda* (Tablo-2) bir bulguya rastlanmadı.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-2), 1 olguda bez epitellerinin sitoplazmasında kahverengimsi, diffuz boyanan IP pozitif viral antijenler kontrol preparatları eşliğinde saptandı (Resim 50 ve 51). Ayrıca submukozada bulunun sinir tellerinde de diffuz kahverengimsi boyanmalar şeklinde viral antijenler dikkati çekti.

**Burun** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2), 1 olguda lamina propria da fokal kanama alanları görüldü.

*İmmunoperoksidaz boyamalarda* (Tablo-2), 1 olguda vestibular bölge kutan mukozası epitel hücre sitoplazmalarında (Resim 53 ve 54) ve bez epitel hücre sitoplazmalarında (Resim 52a ve 52b) granüler yapıda, kahverenkli IP pozitif viral antijenler kontrol preparatları eşliğinde saptandı. Ayrıca lamina propriasında bulunan sinir tellerinde de diffuz kahverengimsi boyanmalar şeklinde viral antijenler dikkati çekti (Resim 55 ve 56).

*İmmunofloresan boyamalarda* bir bulguya rastlanmadı (Tablo-2).

**Larinks** : *Histopatolojik incelemeler, immunoperoksidaz ve immunofloresan boyamalarda* (Tablo-2) bir bulguya rastlanmadı.

**Tonsiller** : *Histopatolojik incelemelerde* (Tablo-2), 1 olguda bir kısım damarlar hiperemik olup merkezinde yoğun eritrosit bulunan lenfoid folliküller hiperplazikti. Aynı hayvanın epitel hücrelerinde fokal nekroze alanlara rastlandı.

*İmmunoperoksidaz ve immunofloresan boyamalarda* (Tablo-2) bir bulguya rastlanmadı.

**Testisler** : *Histopatolojik incelemeler, immunoperoksidaz ve immunofloresan boyamalarda* (Tablo-2) bir bulguya rastlanmadı.

**Skapular Kaslar** : *Histopatolojik incelemeler, immunoperoksidaz ve immunofloresan boyamalarda* (Tablo-2) bir bulguya rastlanmadı.

#### **Kontrol dokular :**

Kontrol amacıyla yukarıda adı geçen organlardan alınarak immunoperoksidaz ve immunofloresan yöntemi ile boyanan kesitlerde immunopozitif sonuç alınamamıştır.

#### **Arşiv doku blokları**

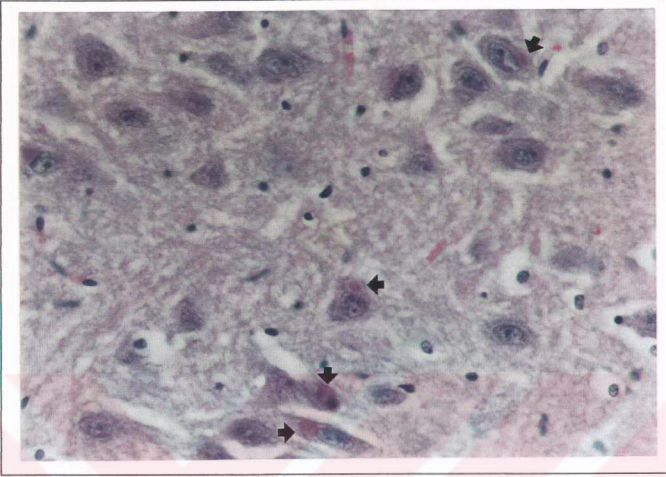
**Kornu ammonis** : *Histopatolojik incelemelerde* saptanan bulgular Tablo-3'te özetlenmiştir. Otuz hayvanın 27'sinde değişik şiddette ensefalitis ve/veya meningoensefalitis gözlemlendi. Piramidal hücre bölgesinde glia hücre proliferasyonu, nöron dejenerasyonları, nöronofaji ve az sayıda Babes nodülü dikkati çekti. Olguların 26'sında ise bu hücrelerde Negri cisimciklerine rastlandı. Negri cisimciği görülmeyen 4 olgunun 3'ünde serebellumda da Negri cisimciği yoktu. Birinde ise serebellumda Negri cisimciği bulundu.

Bu kesitlerde yapılan *immunoperoksidaz* (Resim 57) ve *immunofloresan boyamalarda* pozitif viral antijenlere rastlanamadı.

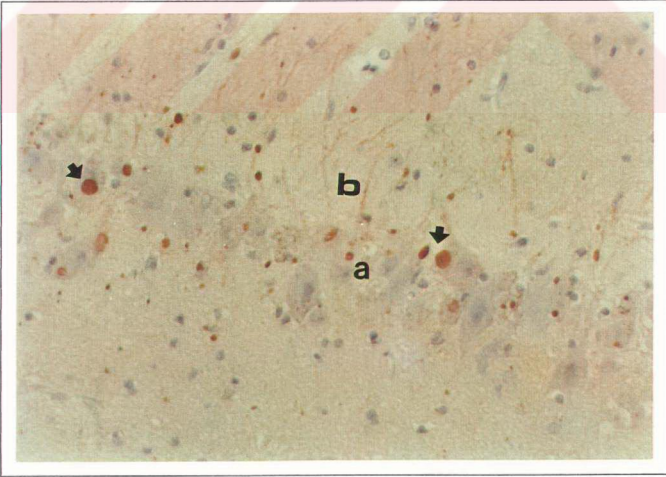
**Serebellum** : Buradaki yangısal ve dejeneratif *histopatolojik bulgular* (Tablo-3) kornu ammonistekinin benzeri idi. Burada da 30 köpeğin 26'sında Purkinje hücrelerinde Negri cisimciği görüldü. Bu 4 olgunun 3'ünde kornu ammoniste inklüzyon yokken, 1'inde vardı.

Bu kesitlerden yapılan *immunoperoksidaz* (Resim 58) ve *immunofloresan boyamalarda* viral antijenin varlığını belirtecek herhangi bir pozitiflik saptanamadı.

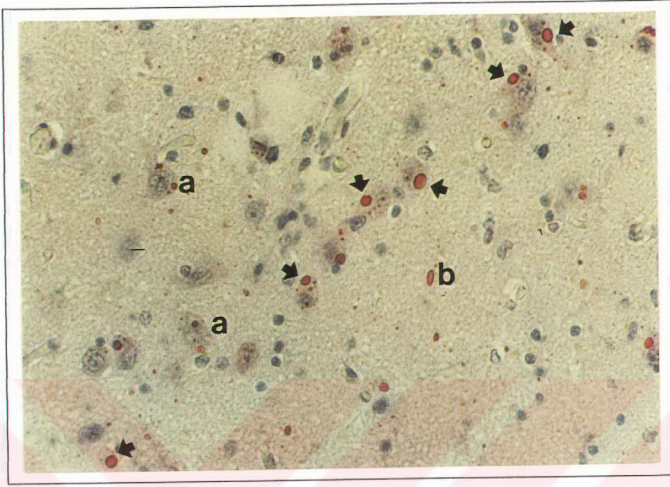




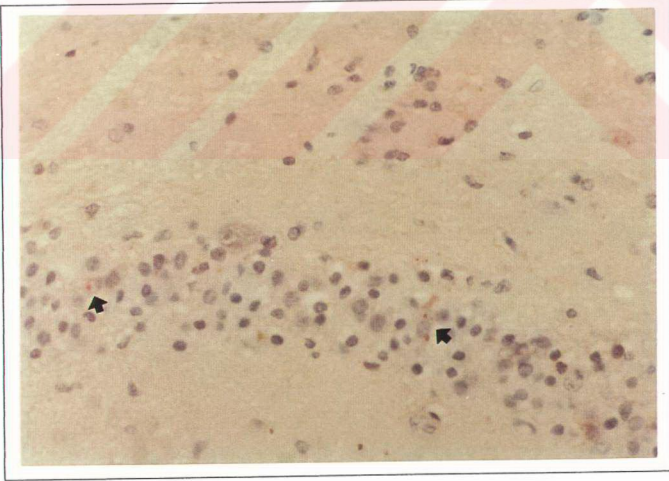
**Resim 3.** Kornu ammonis. Piramidal hücrelerde inklüzyon cisimcikleri (ok), HE, X400.



**Resim 4.** Kornu ammonis. Piramidal hücre sitoplazması (a) ve aksonlarında (b) IP pozitif viral antijenler, sitoplazmada inklüzyon cisimcikleri (b), immunoperoksidaz yöntemi, X250.

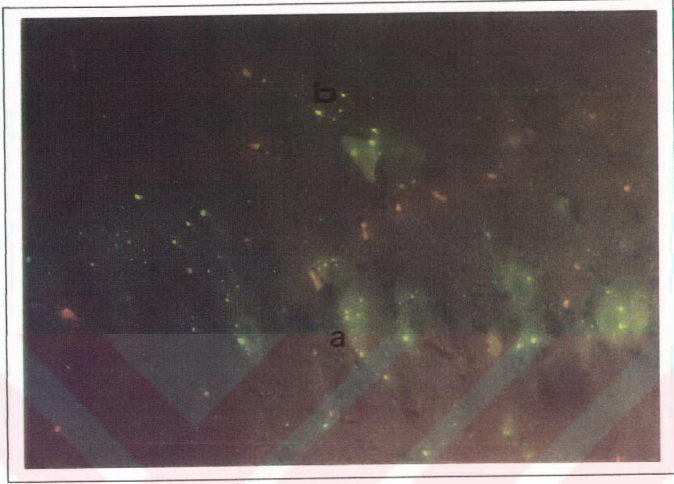


**Resim 5.** Kornu ammonis . Piramidal hücre sitoplazmasında (a ) IP pozitif viral antijenler, sitoplazmada (ok) ve nöropilde serbest inklüzyon cisimcikleri (b), immunoperoksidaz yöntem, X250.

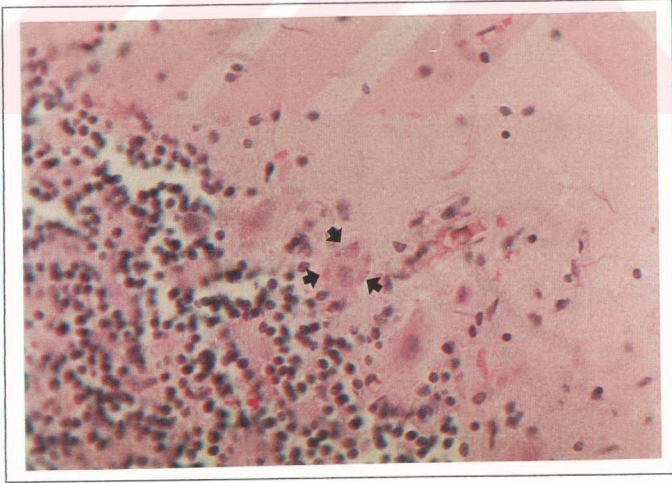


**Resim 6.** Kornu ammonis. Polimorf sinir hücrelerinde IP pozitif viral antijenler (ok), immunoperoksidaz yöntem, X320.



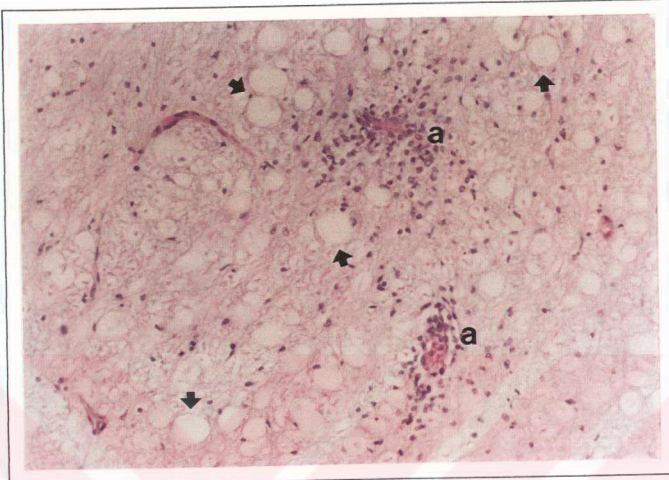


**Resim 7.** Kornu ammonis. Piramidal hücre sitoplazması (a) ve aksonlarında (b) IF pozitif viral antijenler, immunofloresan yöntem, X320.

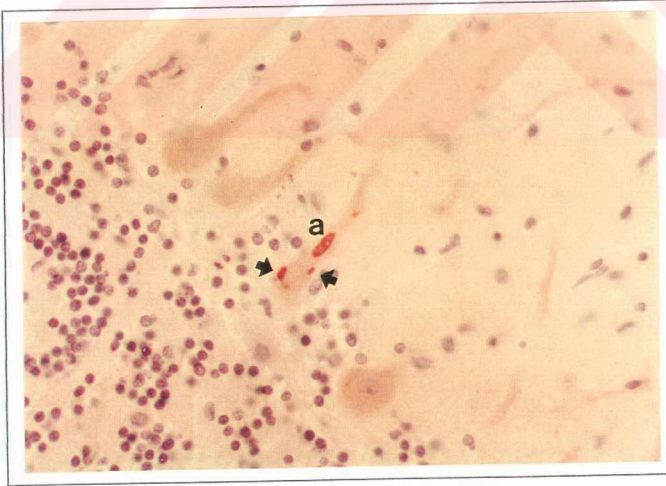


**Resim 8.** Serebellum. Purkinje hücrelerinde inklüzyon cisimcikleri (ok), HE, X320.

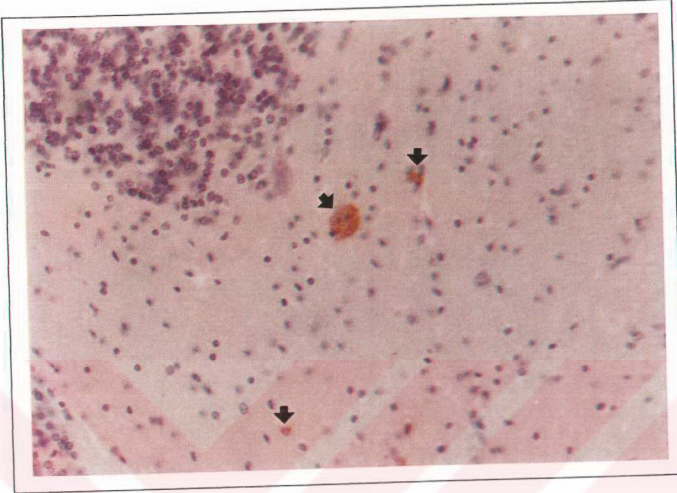




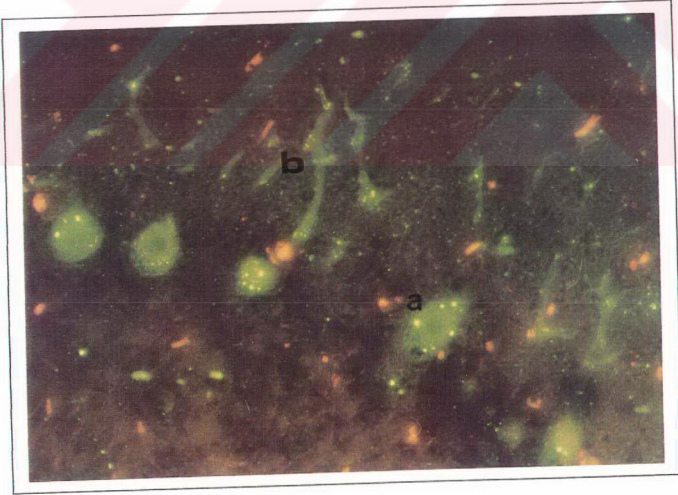
**Resim 9.** Serebellum. Substantia alba da demiyelinasyon alanları (ok) ve perivasküler hücre infiltrasyonları (a), HE, X200.



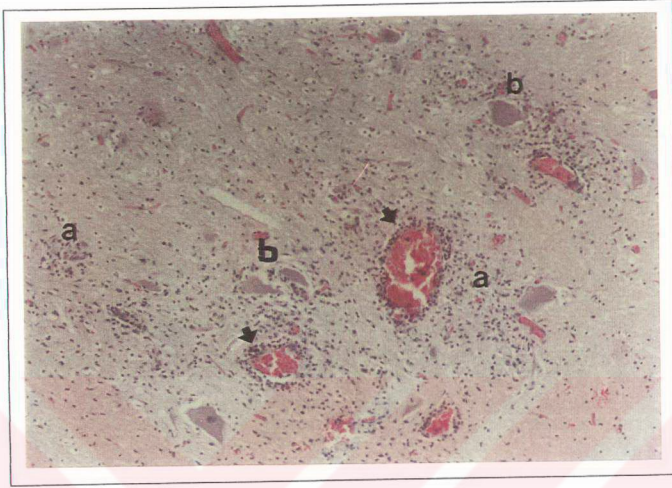
**Resim 10.** Serebellum. Purkinje hücrelerinde IP pozitif inklüzyon cisimciği (a) ve viral antijenler (ok), immunoperoksidaz yöntemi, X400.



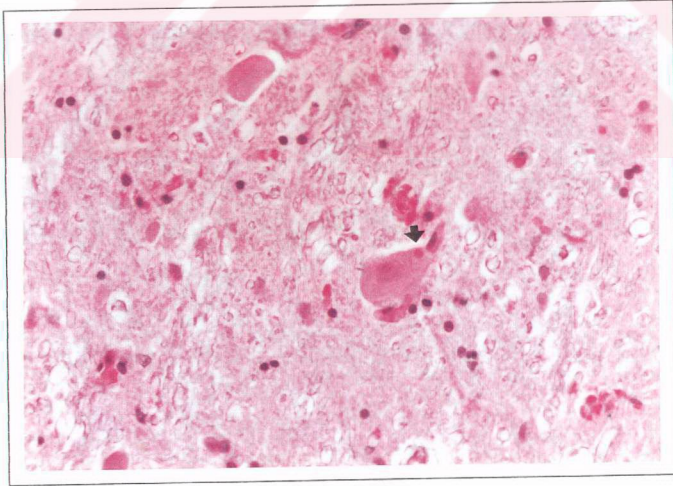
**Resim 11.** Serebellum. Substantia albada IP pozitif viral antijenler (ok), immunoperoksidaz yöntem, X250.



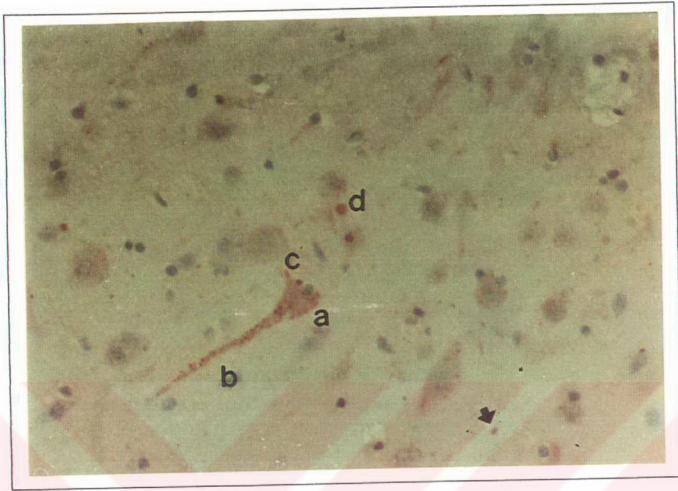
**Resim 12.** Serebellum. Purkinje hücrelerinin sitoplazma (a) ve aksonlarında (b) IF pozitif viral antijenler, immunofloresan yöntem, X320.



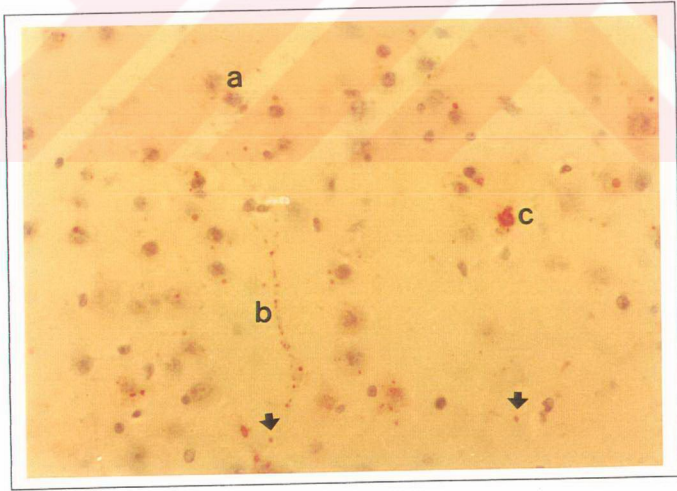
**Resim 13.** Talamus. Nöropilde gliosis (a), nöron dejenerasyonu ve nekrozu ile nöronofaji (b), perivasküler hücre infiltrasyonları (ok), HE, X100.



**Resim 14.** Talamus. Perikaryonda inklüzyon cisimciği (ok), HE, X400.

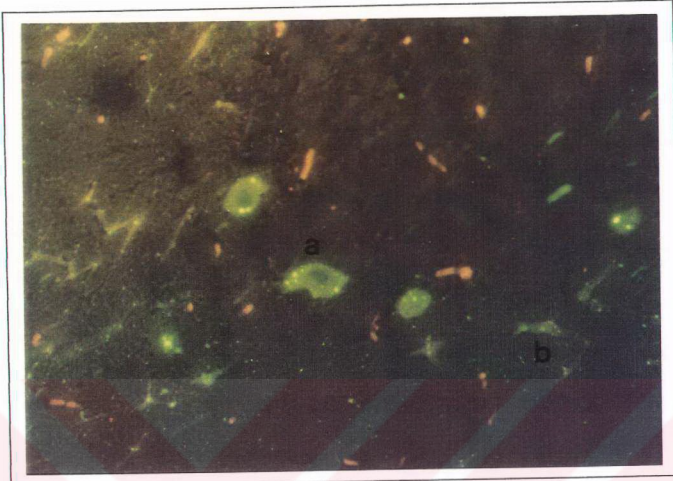


**Resim 15.** Talamus. Nöron sitoplazması (a), akson (b) ile dendritte (c) ve ekstrasellüler (ok) IP pozitif viral antijenler, nöropilde inklüzyon cisimciği (d), immunoperoksidaz yöntem, X320.

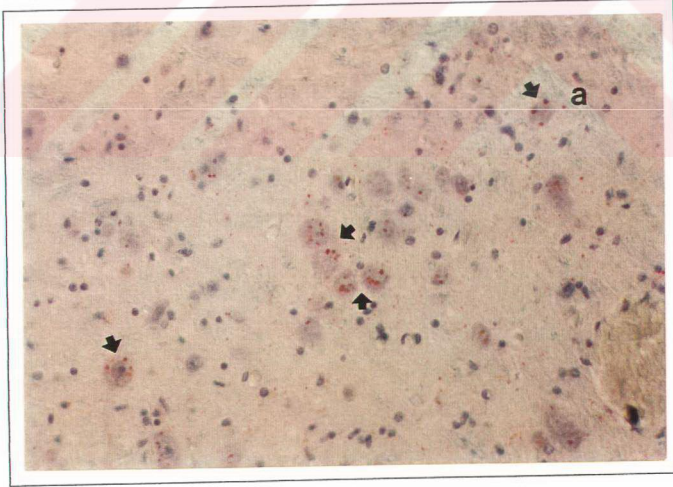


**Resim 16.** Talamus. Nöron sitoplazması (a), akson (b) ile nöropilde glia hücresi etrafında (c) ve serbest (ok) IP pozitif viral antijenler, immunoperoksidaz yöntem, X250.

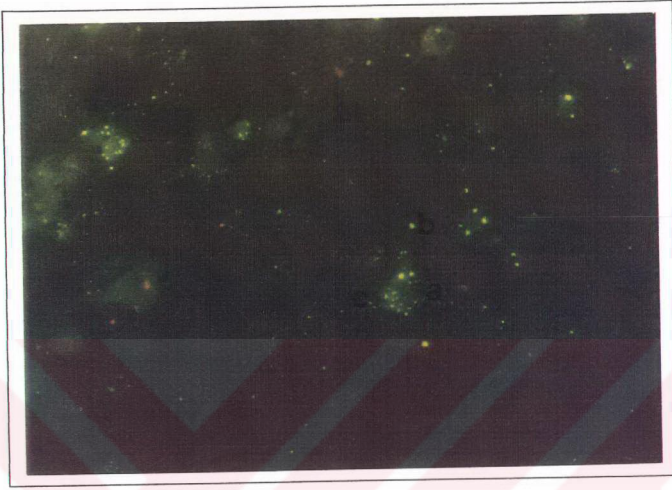




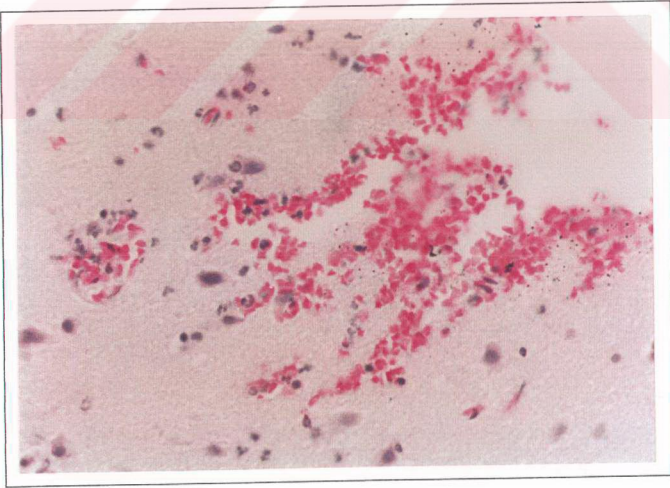
**Resim 17.** Talamus. Nöron sitoplazması(a) ve aksonlarda (b) IF pozitif viral antijenler, immunofloresan yöntem, X320.



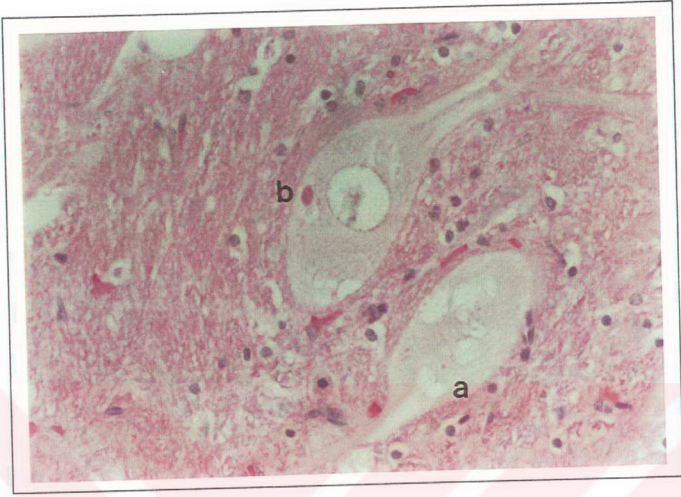
**Resim 18.** Pons serebri . Nöron sitoplazmasında (ok ) ve nöropilde (a) IP pozitif viral antijenler, immunoperoksidaz yöntem, X250.



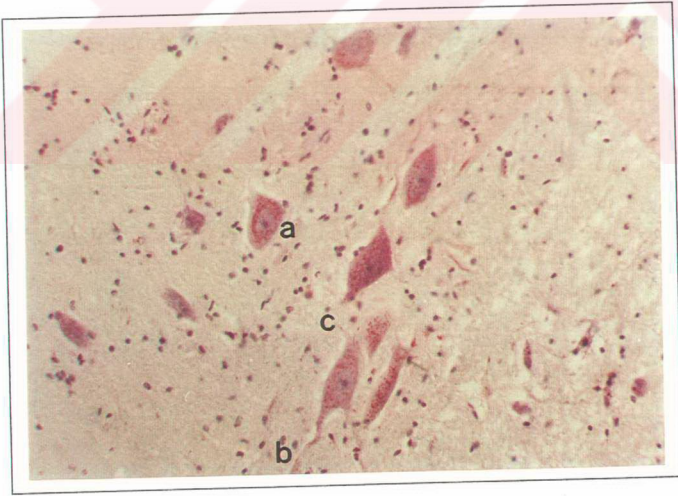
**Resim 19.** Pons serebri . Nöron sitoplazması(a), akson (b) ve dendritlerde (c ) IF pozitif viral antijenler, immunofloresan yöntem, X320.



**Resim 20.** Kollikulum rostralis. Fokal kanama alanı, HE, X400 .

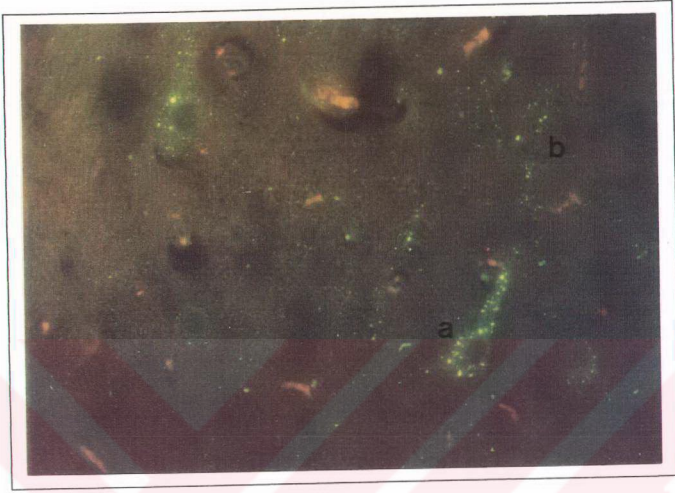


**Resim 21.** Kollikulus rostralis. Dejenere nöronlarda vakuoller (a) ve inklüzyon cisimciği (b), HE, X400.

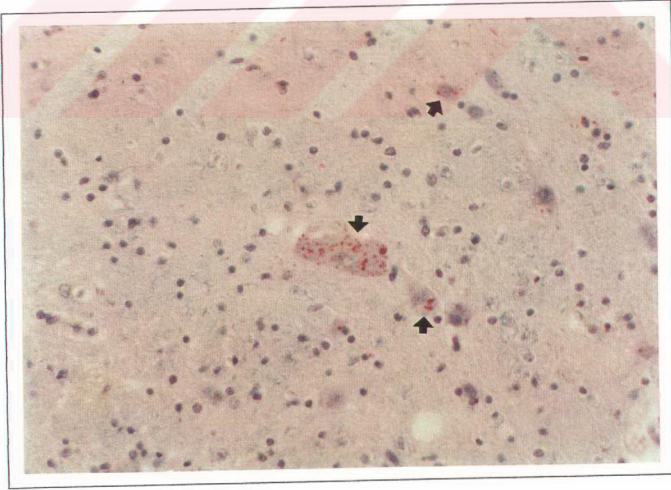


**Resim 22.** Kollikulus rostralis. Nöron sitoplazması (a) ve aksonlarda (b) yoğun, dendritte (c) az sayıda IP pozitif viral antijenler, immunoperoksidaz yöntem, X200.

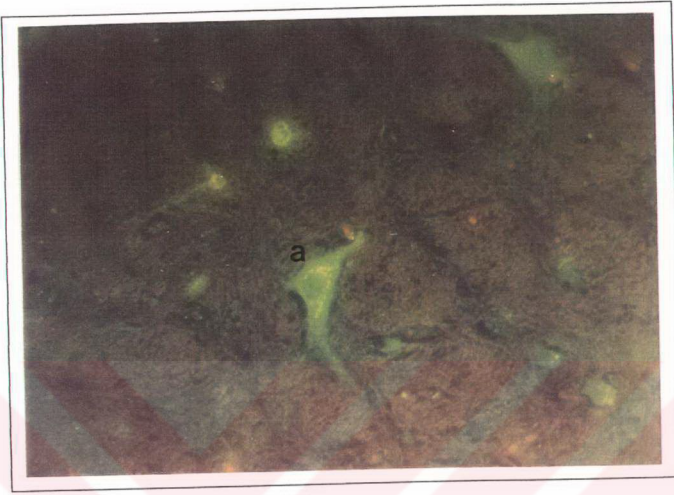




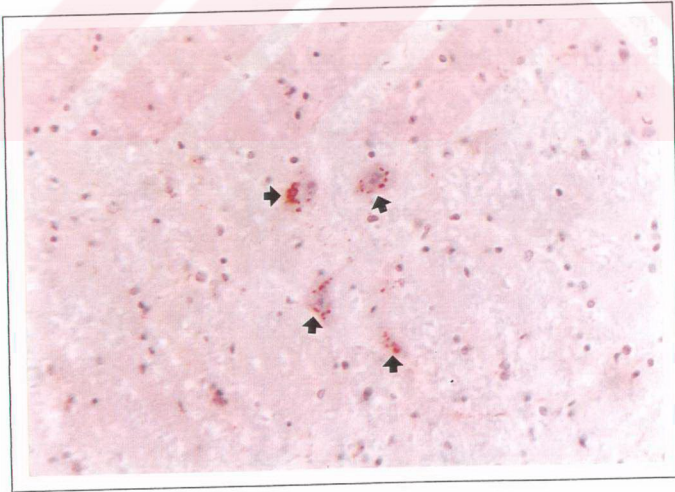
**Resim 23.** Kollikulum rostralis. Nöron sitoplazmasında(a) ve aksonlarda (b) IF pozitif viral antijenler, immunofloresan yöntem, X320.



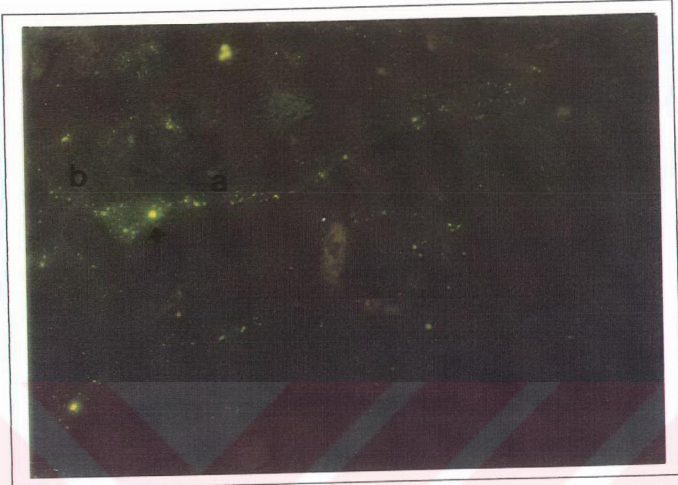
**Resim 24.** Medulla oblongata. Nöron sitoplazmasında (ok) IP pozitif viral antijenler, immunoperoksidaz yöntem, X320.



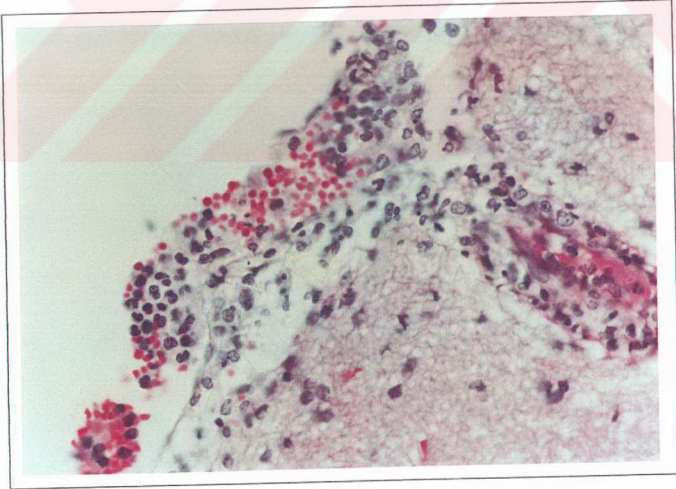
**Resim 25.** Medulla oblongata. Nöron sitoplazmasında (a ) perinükleer IF pozitif viral antijenler, immunofloresan yöntem, X320.



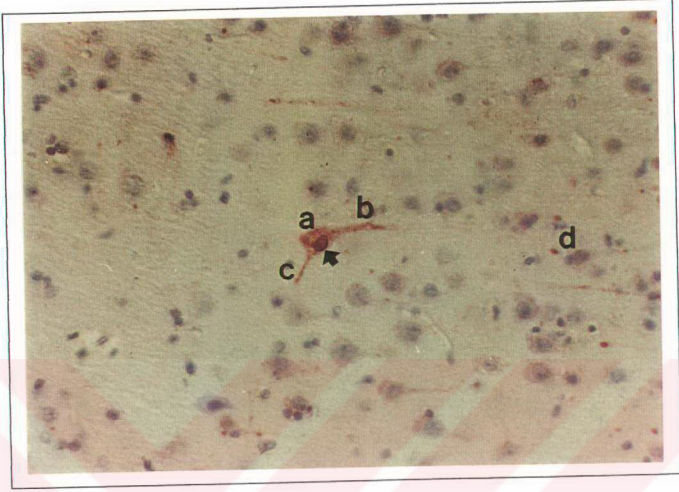
**Resim 26.** Medulla spinalis. Nöron sitoplazmasında (ok) IP pozitif viral antijenler, immunoperoksidaz yöntem, X200.



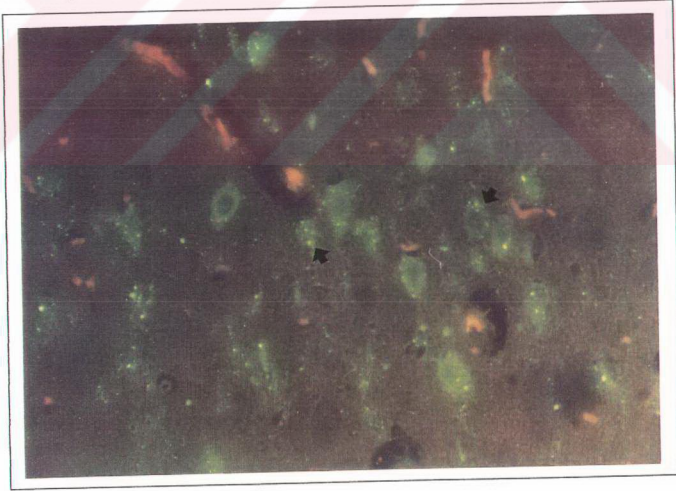
**Resim 27.** Medulla spinalis. Nöron sitoplazmasında (ok) , akson (a) ve dendritte (b) IF pozitif viral antijenler, immunofloresan yöntem, X320.



**Resim 28.** Nukleus kaudatus. Hiperemik leptomeningeal damarlar çevresinde mononükleer hücre infiltrasyonu, HE, X400.

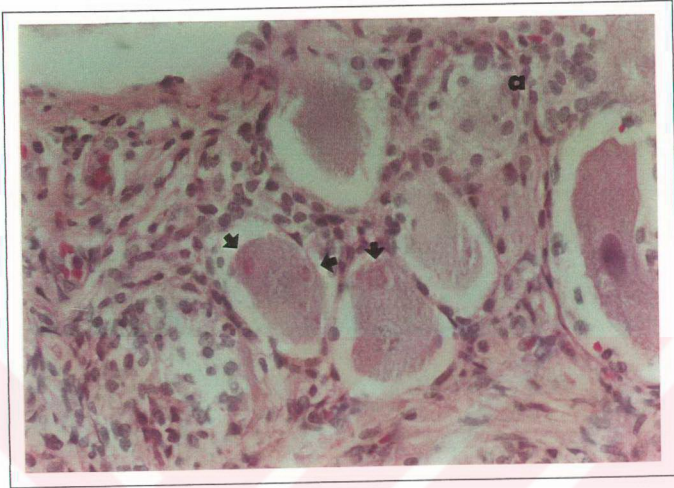


**Resim 29.** Nucleus caudatus. Nöron sitoplazması(a), akson (b), dendrit (c) ve nöron dışında (d) IP pozitif viral antijenler ile bir inklüzyon cisimciği (ok), immunoperoksidaz yöntem, X250.

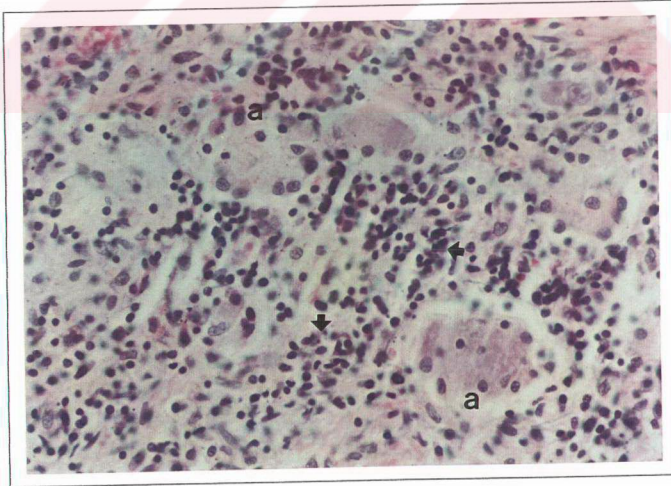


**Resim 30.** Nucleus caudatus. Nöron sitoplazması ve uzantılarında (ok) IF pozitif viral antijenler, immunofloresan yöntem, X320.

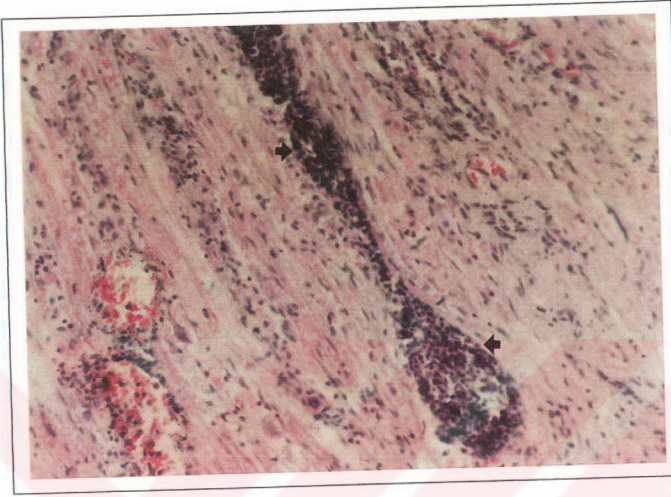




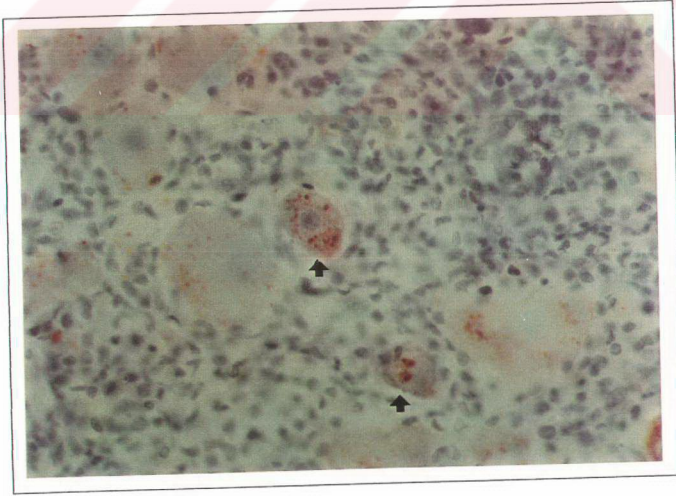
**Resim 31.** Gasserian gangliyonu. Dejenere nöronlar içinde inklüzyon cisimcikleri (ok) ve nöronofaji (a), HE, X400.



**Resim 32.** Gasserian gangliyonu. Nöronofaji (a) ve bağdokuda mononükleer hücre infiltrasyonları (ok), HE, X400.

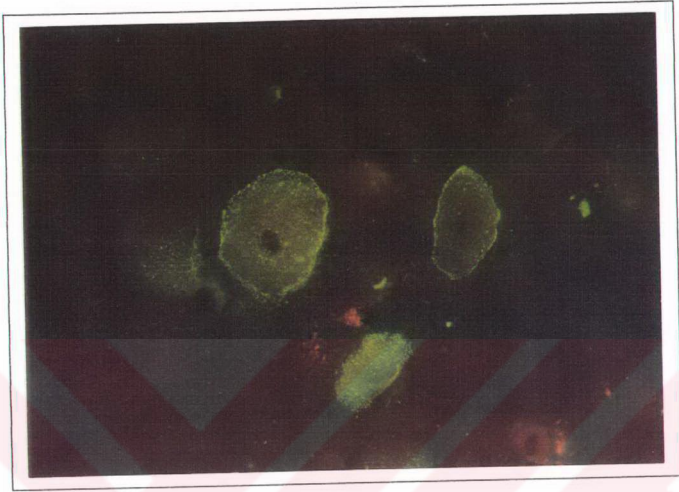


**Resim 33.** Gasserian gangliyonu. Sinir telleri uzamınca mononükleer hücre infiltrasyonları (ok), HE, X200.

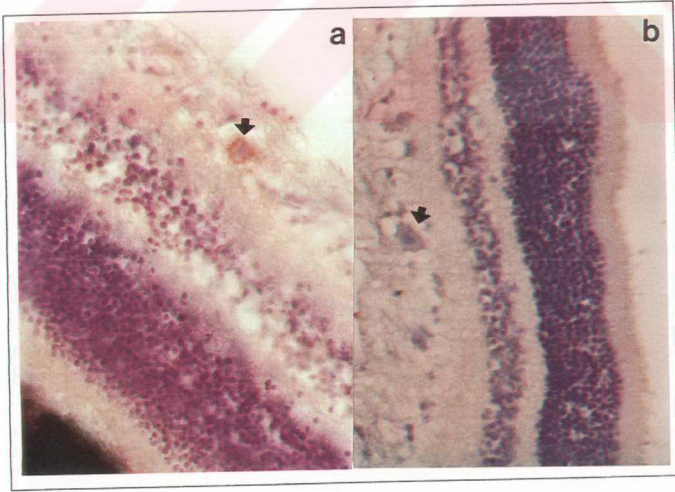


**Resim 34.** Gasserian gangliyonu. Nöron sitoplazmasında IP pozitif viral antijenler (ok), immunoperoksidaz yöntem, X400.

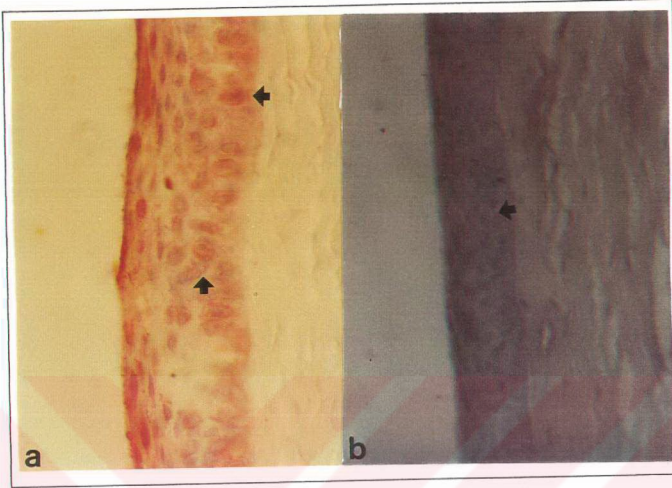




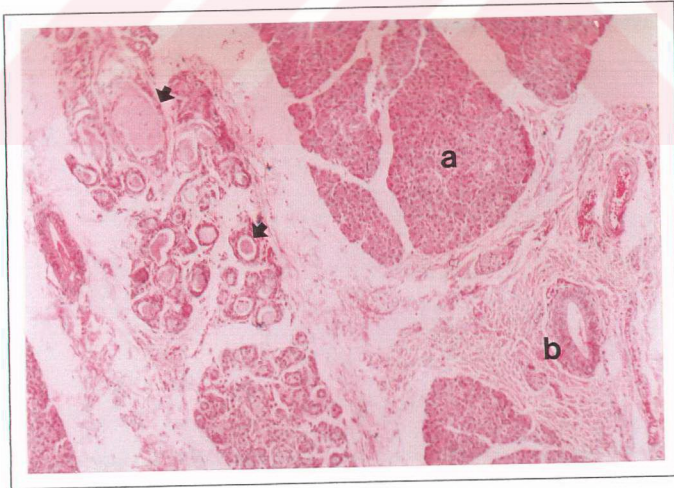
**Resim 35.** Gasserian gangliyonu. Nöron sitoplazmasında IF pozitif viral antijenler (ok), immunofloresan yöntem, X320.



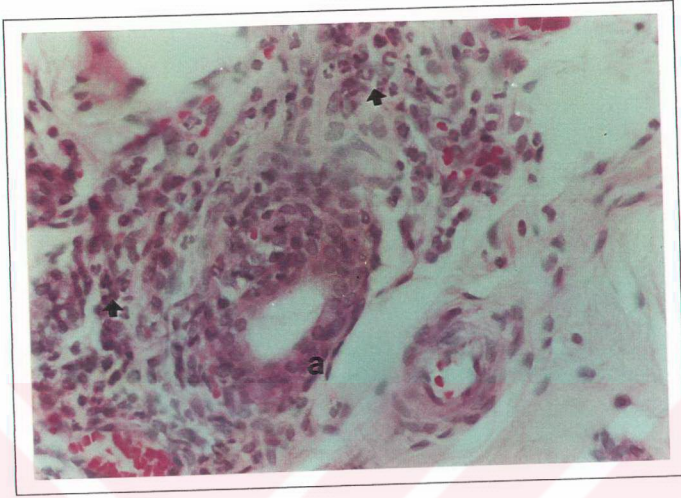
**Resim 36.** Retina. (a) Sinir hücresinde IP pozitif viral antijenler (ok), immunoperoksidaz yöntem, X320. (b) İmmunoperoksidaz yöntemle boyanan kontrol preparatı (ok), X320.



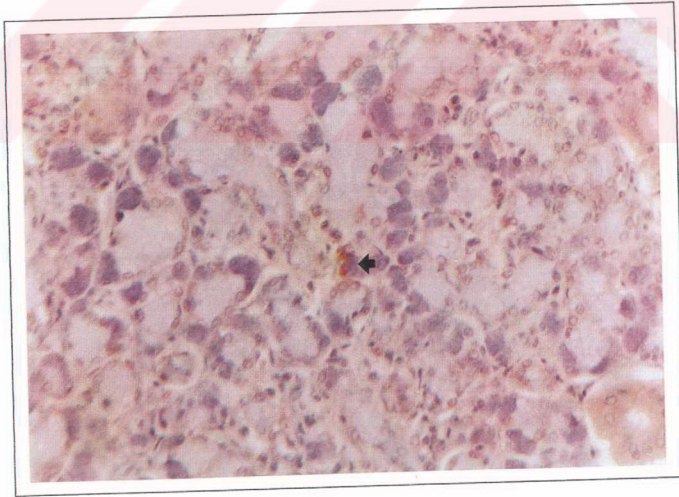
**Resim 37.** Kornea. (a) Epitel hücrelerinde IP pozitif viral antijenler (ok), immunoperoksidaz boyama, X320.  
(b) İmmunoperoksidaz yöntemiyle boyanan kontrol preparatı (ok), X200.



**Resim 38.** Parotis tükürük bezi. Bez lumenlerinde homojen eozinofilik içerik (ok) ve lumenin seçilememesi (a), kanal epitelinde hiperplazi (b), HE, X100.

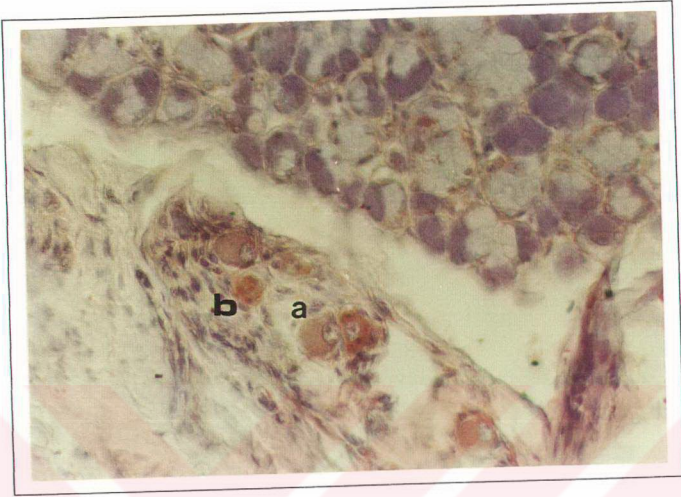


**Resim 39.** Parotis tükürük bezi. Akıtcı kanal epitelinde hiperplazi (a) ve hücre infiltrasyonları (ok), HE, X400.

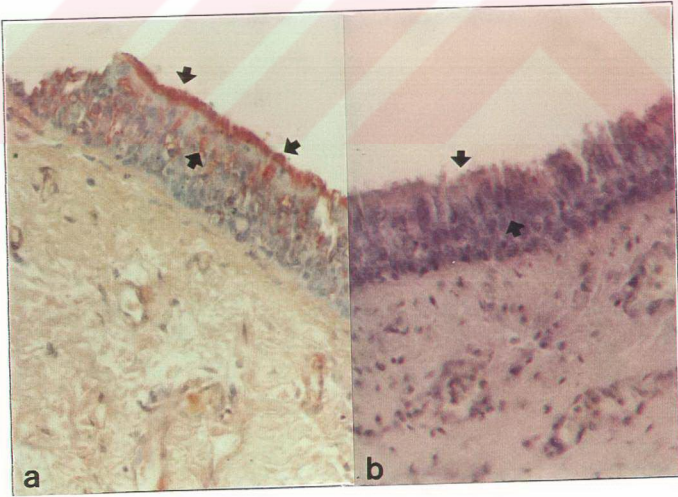


**Resim 40.** Submandibular tükürük bezi. Seröz bez epitel hücreleri sitoplazmalarında IP pozitif viral antijenler (ok), immunoperoksidaz boyama. X320.

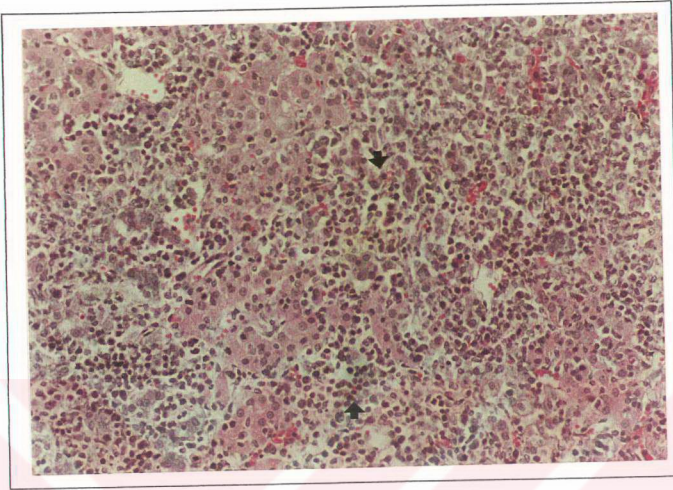




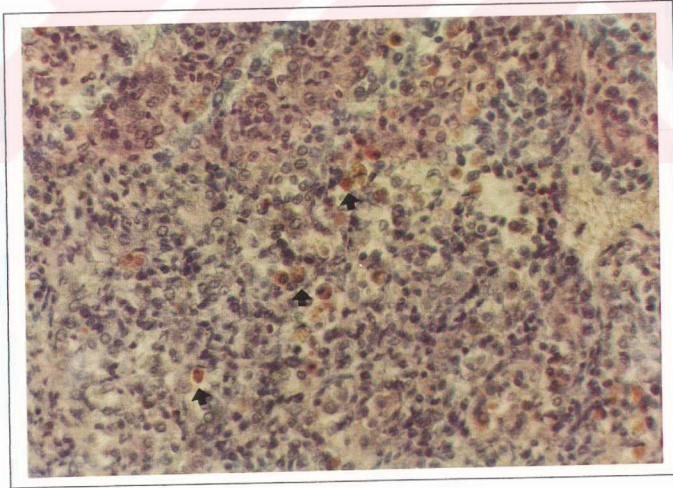
**Resim 41.** Submandibular tükürük bezi. İntramural gangliyon hücrelerinde sitoplazmanın diffuz boyanması (a) ve granüler (b) IP pozitif viral antijenler, immunoperoksidaz yöntem, X320.



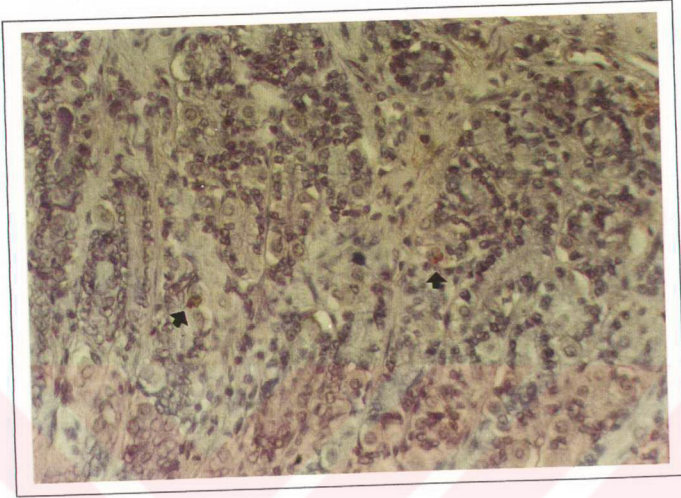
**Resim 42.** Trakea. (a) Kinosilyumlarda diffuz yerleşimli (ok) IP pozitif viral antijenler , immunoperoksidaz yöntem, X320.  
(b) Kinosilyumların immunoperoksidaz yöntemle boyanan kontrol preparatı (ok), X250.



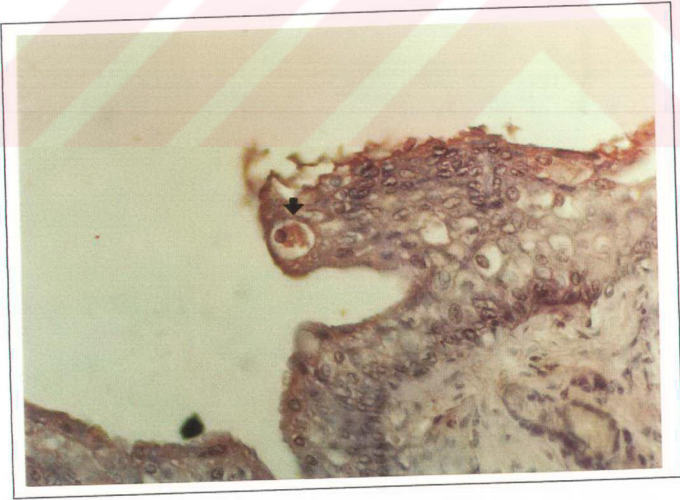
**Resim 43.** Adren. Mononükleer hücre infiltrasyonu (ok), HE, X250.



**Resim 44.** Adren. Kromaffin hücrelerinde (ok) IP pozitif viral antijenler, immunoperoksidaz yöntem, X320.

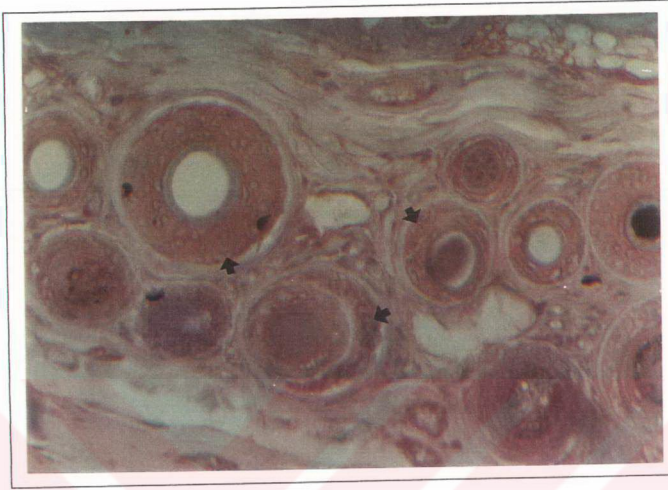


**Resim 45.** Mide. Bez epitel hücrelerinde (ok) IP pozitif antijenler, immunoperoksidaz yöntem, X320.

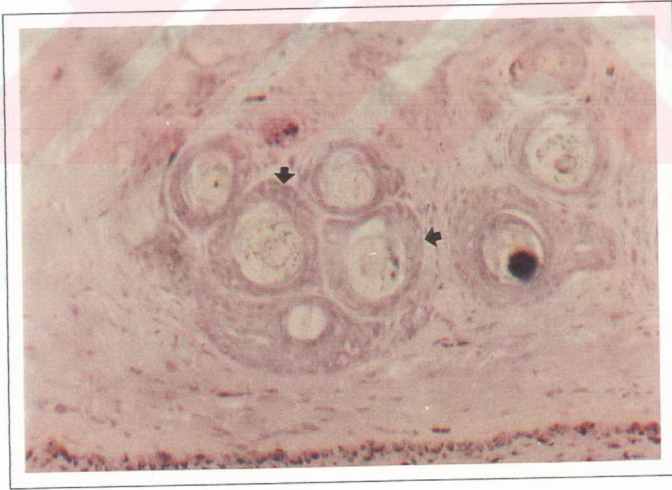


**Resim 46.** İdrar kesesi. Epitel hücresinde IP pozitif viral antijenler (ok), immunoperoksidaz yöntem, X320.

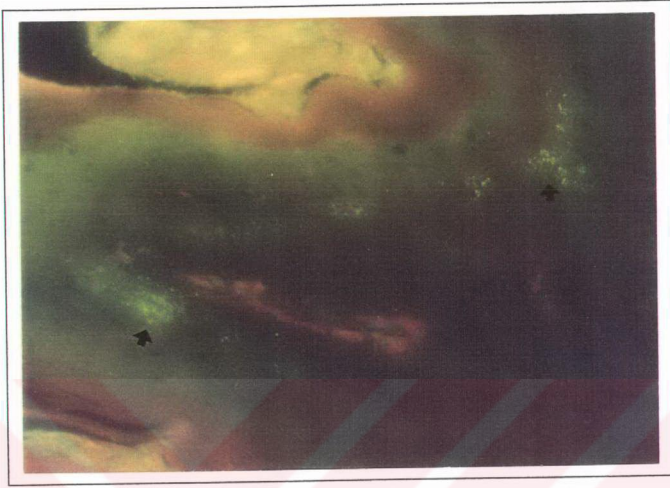




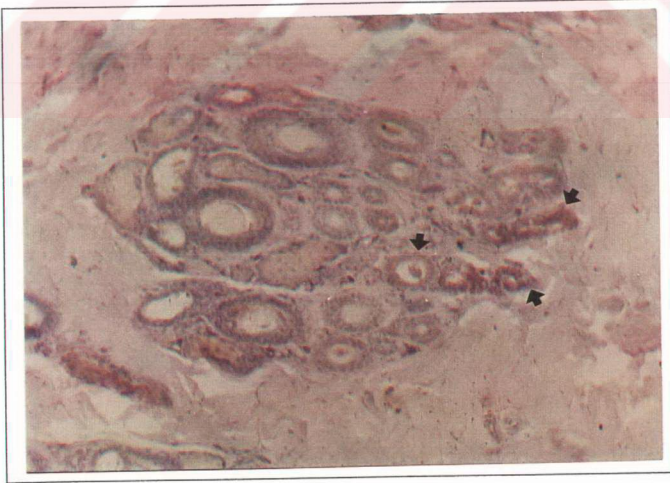
**Resim 47.** Kulak. Kıl follikülü epitel hücrelerinde (ok) diffuz yerleşimli IP pozitif viral antijenler, immunoperoksidaz yöntemi, X400.



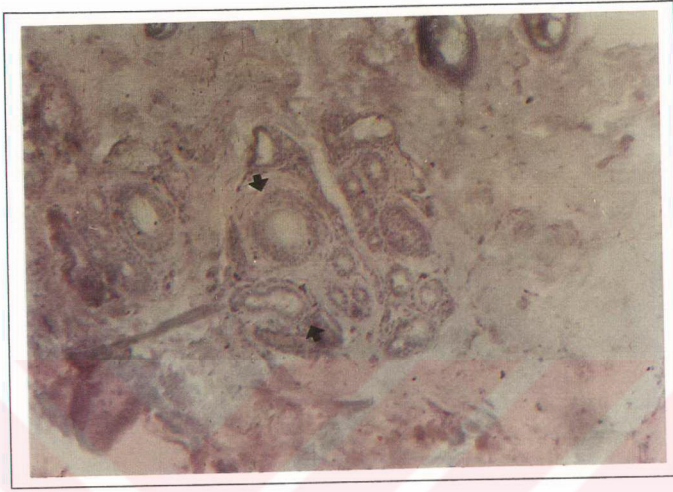
**Resim 48.** Kulak. Kıl follikülü epitel hücrelerinin immunoperoksidaz yöntemiyle boyanan kontrol preparatı (ok), X250.



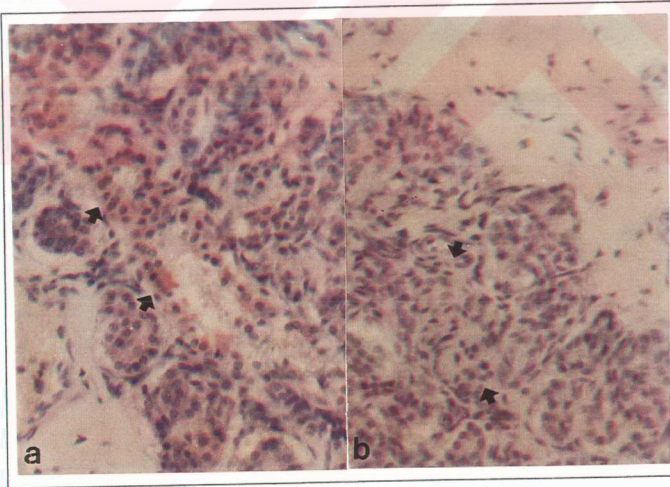
**Resim 49.** Kulak. Kıl folliküllerinde (ok) IF pozitif viral antijenler, immunofloresan yöntem, X400.



**Resim 50.** Ağız. Bez epitel hücrelerinde (ok) diffuz yerleşimli IP pozitif viral antijenler, immunoperoksidaz yöntem, X200.

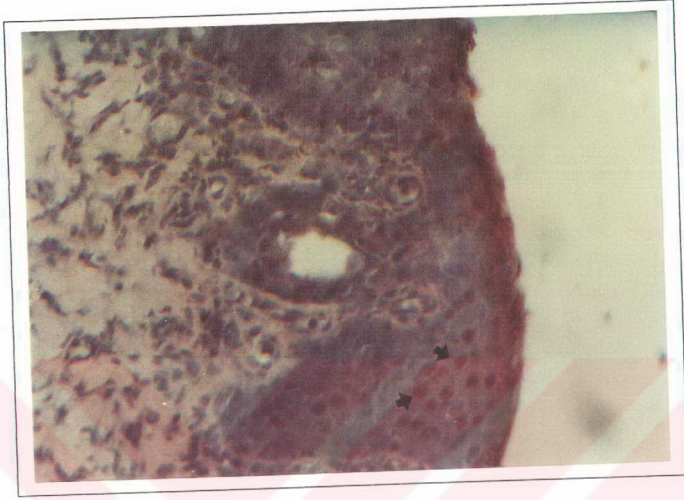


**Resim 51.** Ağız. Bez epitel hücreleri kontrol preparatlarının immunoperoksidaz yöntemiyle boyanması (ok), X200.

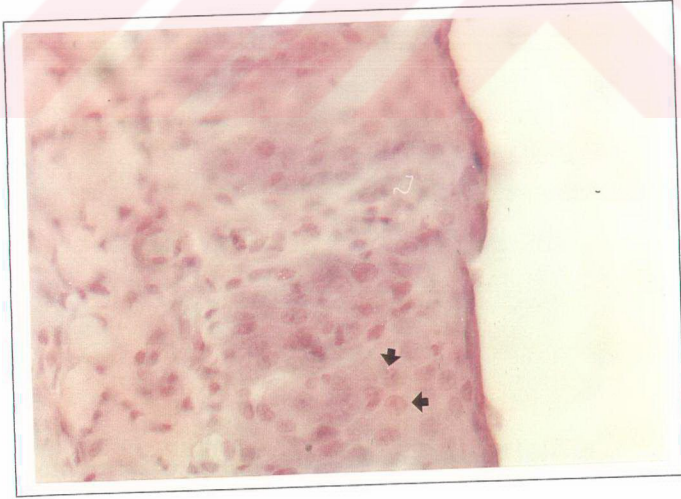


**Resim 52.** Burun. (a) Bez epitel hücrelerinde (ok) IP pozitif viral antijenler, immunoperoksidaz yöntemi, X320.

(b) Bez epitel hücreleri kontrol preparatlarının immunoperoksidaz yöntemiyle boyanması (b), X320.

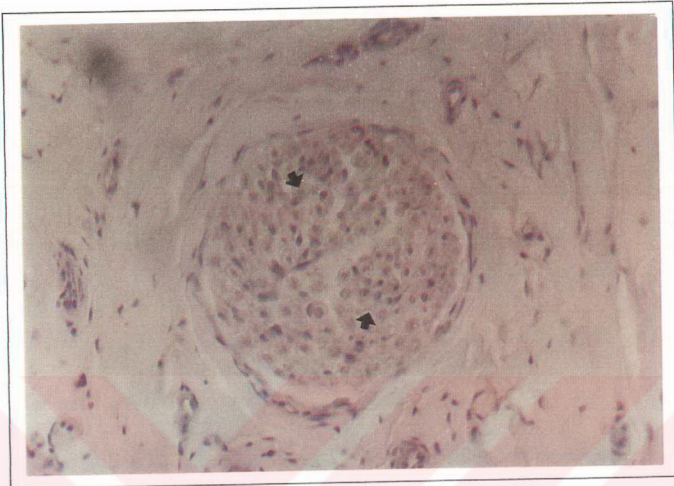


**Resim 53.** Burun. Epitel hücrelerinde (ok) IP pozitif viral antijenler, immunoperoksidaz yöntem, X320.

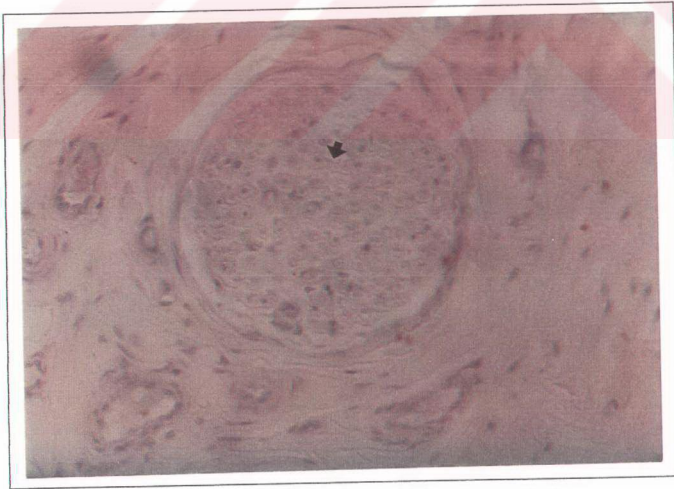


**Resim 54.** Burun. Epitel hücrelerinin kontrol preparatlarının immunoperoksidaz yöntemle boyanması (ok). X400.

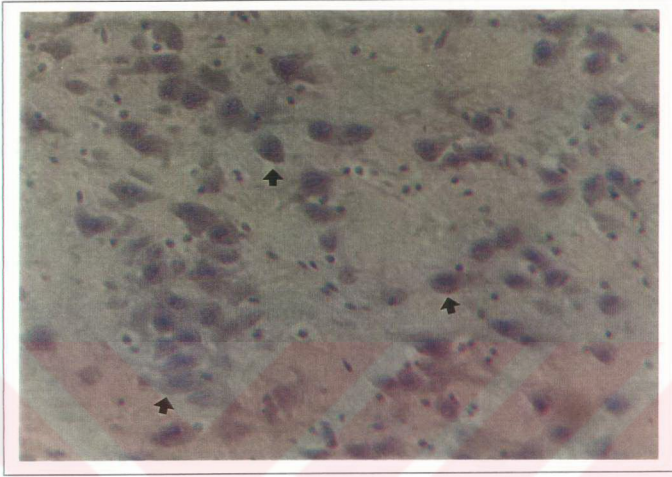




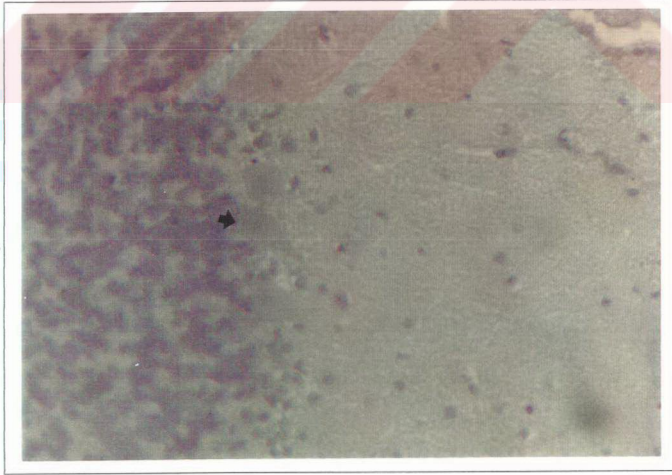
**Resim 55.** Burun. Sinir demetlerinde diffuz yerleşimli IP pozitif viral antijenler (ok), immunoperoksidaz yöntem, X250.



**Resim 56.** Burun. Sinir demetlerinin immunoperoksidaz yöntemle boyanan kontrol preparatı (ok), immunoperoksidaz yöntem, X250.



**Resim 57.** Kornu ammonis (arşiv bloğu). Piramidal nöronlarda (ok) negatif boyanma, immunoperoksidaz yöntem, X250.



**Resim 58.** Serebellum (arşiv bloğu). Purkinje hücrelerinde (ok) negatif boyanma, immunoperoksidaz yöntem, X250.



Tablo 1. Sinir sisteminin değişik bölgelelerinden alınan örneklerde histopatolojik (HP), immunoperoksidaz (IP) ve immunofloresan (IF) yöntemlerinin sonuçları

Beyin bölümleri	Korru amonis			Serebellum			Talamus			Pons serebrî			Kollikulus rostralis			Medulla oblangata			Medulla spinalis			N.kaudatus			Gasserian ganglyonu					
	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			
1nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+1	+1	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	+3			+1				+1																					+1	
2nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+1	+1	+2	+2	+2	+1	+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	+3	+2	+1	+1	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	+2			+1				+1																						
4nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+1	+1	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	+2			+1				+1																						
5 nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+1	+1	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	+2			-				-																						
6 nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+1	+1	+2	+2	+2	+1	+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	+3	+2	+1	+1	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	+1			+1				+1																						
8 nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+1	+1	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	+1			+1				+1																						
9 nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+1	+1	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	-			+1				+1																						
10 nolu hayvan	+1	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+3	+2	+1	+1	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+3	+2	+3
	-			+1				+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	10	10	10	10	10
	8	10	10	8	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	10

HP . Üst satır : Yangısal ve dejeneratif bulgular

Altı satır : İnklüzyon cisimcikleri

+1 . Hafif şiddette : Yangı, inklüzyon cisimciği, viral antijen yoğunluğu

+2 . Orta şiddette : " " " " " "

+3 . Şiddetli : " " " " " "

(-) . Yangı, inklüzyon cisimciği ve viral antijen saptanamadı.

Tablo 2. Santral sinir sistemi dışındaki organ ve dokularda HP, IP ve IF yöntemi sonuçları

DOKULAR	HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER										İMMUNOPEROKSİDAZ METODU										İMMUNOFLORESAN METODU									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hayvan No'su																														
Göz	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	+1	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	+1	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	
Parotis	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Submandibular bezler	+1	+1	-	-	-	-	-	-	-	+2	+2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Trakea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+3	+3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Akciğerler	+1	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Kalp	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Dalak	+1	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Karaciğer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Safra kesesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Böbrekler	+3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Pankreas	+1	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Aden	+2	+2	+2	+2	+2	+2	-	+1	-	+2	+2	+2	+2	+2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Mide	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Barsaklar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Lenf düğümleri	+1	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
İdrar kesesi	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Kulak ve ağız çevresi derisi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+3	-	-	-	-	-	-	-	-	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Ağız mukozası	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Burun mukozası	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	+3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Larinks	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Tonsiller	+2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Testisler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Skapular kaslar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

+1. Hafif şiddette : Yangı, viral antijen yoğunluğu

+2. Orta şiddette : " " "

+3. Şiddetli : " " "

(-) : Yangı, inküzyon cisimciği ve viral antijen sapılanmadı.

**Tablo 3.** Otuz adet arşiv bloklarının histopatolojik incelenmesinden elde edilen bulgular

Hayvan No	HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER			
	ENSEFALİTİS		İNKLUZYON CİSİMCİKLERİ	
	KORNU AMMONİS	SEREBELLUM	KORNU AMMONİS	SEREBELLUM
1.	+	+	+	+
2.	+	+	+	+
3.	+	+	+	+
4.	+	+	-	+
5.	+	+	+	+
6.	+	+	+	+
7.	+	+	+	-
8.	+	+	+	+
9.	+	+	+	+
10.	+	+	+	+
11.	-	-	-	-
12.	-	-	-	-
13.	-	-	-	-
14.	+	+	+	+
15.	+	+	+	+
16.	+	+	+	+
17.	+	+	+	+
18.	+	+	+	+
19.	+	+	+	+
20.	+	+	+	+
21.	+	+	+	+
22.	+	+	+	+
23.	+	+	+	+
24.	+	+	+	+
25.	+	+	+	+
26.	+	+	+	+
27.	+	+	+	+
28.	+	+	+	+
29.	+	+	+	+
30.	+	+	+	+

#### 4. TARTIŞMA

Dünyanın birçok ülkesinde kuduzun esas portörü köpektir. Her ne kadar Avrupa ve ABD'nde köpek kuduzu kontrol altına alınmış ve bu ülkelerde vahşi karnivor kuduzu hastalığın yayılmasında esas kaynak olmuşsa da bu asrın başlarında ABD'nde çeşitli yaralarının insan ve hayvan kuduzunda ön sırayı aldığı görülmüştür(WHO, 1982). Ülkemizde ise kuduzda esas portör hala köpeklerdir.

Kuduzun histolojik tanımında ilk aşama yangısal ve dejeneratif bulguların saptanmasıdır. Bunlara serebrum, beyin stemi, serebellum, medulla spinalis ve Gasserian gangliyonunda rastlandığı kaydedilmiştir (Fischman, 1969; Feiden ve ark., 1988; Zimmer ve ark., 1990; Hamir ve ark., 1992b). Karnivorlarda yangısal değişikliklerin özellikle serebrum, kornu ammonis ve talamusta, daha az olarak da serebellum, pons ve medulla oblangatada yerleştiğini, herbivorlarda ise bunun tam tersi olduğunu bildirilmiştir(Palmer ve ark., 1985). Bunun yanında yine karnivor ve herbivor hayvanlarda bu lezyonların bütün kuduz pozitif beyinlerin % 42 'sinde pons ve medulla oblangatada daha şiddetli görüldüğü (Zimmer ve ark., 1990) ve ancak bu bulguların nonspesifik olduğu ve tanıda fazla önemi olamayacağı da kaydedilmiştir (Negri, 1903). Çalışmada da bu verilere uygun olarak, incelenen tüm santral sinir sistemi bölgelerinde: özellikle kornu ammonis, serebellum, talamus, pons serebri, kollikulus rostralis, nukleus kaudatus, medulla oblangata, medulla spinalisin dorsal kornuları ve Gasserian gangliyonunda değişen şiddette benzeri lezyonlar görülmüştür. Literatür verileri aksine serebellum ve kornu ammonis lezyonlarının eşit ölçüde şekillendiği dikkati çekmiştir.

Hastalığın tanısında 2. aşama ise Negri cisimciklerinin (Negri, 1903) bulunuşudur. Bu, kesin tanıda yol gösterici patognomonik bir bulgudur. Bu cisimciklere nöron sitoplazmalarında ve glia hücrelerinde (nadiren astrositlerde)

rastlandığı kaydedilmiştir (Fekadu ve ark., 1982; Jubb ve ark., 1985; Hamir ve Rupprecht, 1990; Zimmer ve ark., 1990; Hamir ve ark., 1992b). Yangısal reaksiyon gibi bu cisimciklere de karnivorlarda kornu ammonis, talamus, pons ve medulla oblangata, herbivorlarda ise serebellum, pons ve medulla oblangatada daha fazla rastlandığı kaydedilmiştir (Fekadu ve ark., 1982; Jubb ve ark., 1985; Palmer ve ark., 1985). Literatür verilerinin aksine bu çalışmada serebellumda inklüzyon cisimciklerinin bulunuş oranı yangı ve dejeneratif değişikliklerde olduğu gibi kornu ammonis kadar yüksek bulunmuştur. Pons serebri, medulla oblangata, medulla spinalis ve glia hücrelerinde ise kaydedilen inklüzyon cisimcikleri görülmemiştir. Beynin çeşitli bölgelerinde saptanan bu cisimciklerin tablo-1 ve 3'te özetlendiği gibi genellikle birçok bölgede müşterek, bazen de ayrı ayrı şekillendiği görülmüştür. Bu nedenle de histopatolojik incelemeler için, literatürlerde (Jubb ve ark., 1985; Zimmer ve ark., 1990; Hamir ve ark., 1992b) kaydedildiği üzere örnek alınacak bölge seçiminde dikkat edilmesi gerektiği düşünölmeli ve özellikle kornu ammonisle beraber serebellum incelemeler için muhakkak alınmalıdır.

Negri cisimciklerinin yangısal ve dejeneratif değişikliklerle birlikte bulunuş oranının ise genellikle % 53 olduğu bildirilmiştir (Zimmer ve ark., 1990). Ademoğulları (1992) ise pozitif vakalar üzerinden yaptığı değerlendirmede (insan, çeşitli evcil hayvanlar) Negri cisimciklerinin bulunuş oranının % 97 olduğunu ve bunlardan hazırlanan beyin emülsiyonlarının farelere inokulasyonunda ise bu oranın % 99'a vardığını kaydetmiştir. Aynı araştırmacı inklüzyon cisimciği bulunan olguların % 80'inde nonpurulent ensefalitis tablosu tesbit etmiştir. Bu çalışmada santral sinir sisteminde yangısal ve dejeneratif lezyonlar 10/10 olguda, Negri cisimcikleri ise yangının görüldüğü olguların 8'inde görülmüştür. Ademoğulları (1992)'nın kaydettiğinin aksine yangının görülmediği organlarda bu cisimciklere de rastlanmamıştır. Bu çalışmada inklüzyon cisimcikleri incelenen köpeklerin 8/10 olguda kornu ammonis ve serebellumda, 3/10 olguda talamus, 1/10 olguda nukleus kaudatus ve kollikulus rostralisinde rastlanmıştır (Bu çalışmada az sayıda materyal incelendiği için değerlendirmeler yüzde (%) yerine köpek sayısına göre yapılmıştır). *Arşiv bloğu* olan

30 olgunun kornu ammonis ve serebellumlarında: 27 olguda ensefalitis ve/veya meningoensefalitis, 26 olguda da Negri cisimcikleri bulunmuştur.

Kuduzda beyin dokusunda spongiyöz değişikliklerden ilk defa 1984 yılında bahsedilmiştir (Charlton, 1984). Nöröpildeki bu vakuolasyonun deneysel kuduzda kokarca ve tilkilerde, doğal olaylarda ise bu türlere ilaveten at, kedi, inek ve koyunlarda da görüldüğünü bildirmiştir. Bu lezyonların sık ve şiddetli olarak talamus ve serebral kortekste çoğunlukla nöropil nadiren de perikaryon da rastlandığı kaydedilmiştir (Charlton, 1988). Kuduzda spongiyöz değişikliklerin şekillenmesinin 2-3 günden daha kısa bir sürede gerçekleştiği, immun cevaba bağlı olmadığı (immunosupresse kokarcalarda şekillenir) (Charlton ve ark., 1988) ve spongiform ensefalopatiler yanında diğer virüslara bağlı olarak da şekillendiği kaydedilmiştir (Johnson, 1983; Bundza ve Charlton, 1988; Foley ve Zachary, 1995). Çalışmalarda bu bulguya ilaveten beyin parankiminde serebellar nekroz ile birlikte orta şiddette nötrofil lökosit infiltrasyonlarının da şekillendiği kaydedilmiştir (Sung ve ark., 1976; Fekadu ve ark., 1988b; Jackson ve ark., 1989). Çalışmada önceki çalışmalara uyumlu olarak nöropilde *Luxol fast blue* ile boyamada daha belirgin olan spongiyöz değişikliklere 2/10 olguda serebellum, serebellar pedinkül ve kollikulus rostraliste, 3/10 olguda nukleus kaudatusta rastlanmıştır. Perikaryondaki vakuollere ise 1 olguda kollikulus rostraliste ve diğer 1 olguda da Gasserian gangliyonda rastlanmıştır. Ancak serebellar nekroz görülmemiş olup 1 olguda kollikulus rostraliste meninkslerin altında fokal nötrofil lökosit infiltrasyonu saptanmıştır.

Hamir ve Rupprecht (1990) 1 rakunda Distemper benzeri histolojik lezyonlara rastladıklarını kaydetmişlerdir. Aynı kesitlere floresan antikor testi yaptıklarında hayvanı kuduz pozitif bulmuşlar ve bu farklı görünümün muhtemelen değişik bir kuduz virusundan ileri geldiğini düşünmüşlerdir. Bu görüşten hareket ederek Distemper tanısı konulan her hayvana kuduz için de immunohistokimyasal testlerin yapılmasının gerektiği kanısı varılmıştır.



Santral sinir sistemi dışında inklüzyon cisimciklerine Gasserian gangliyonu, pankreas, dil, tükürük bezleri, adrenal bezler, para-adrenal bez gangliyonları, retina (Jubb ve ark., 1985; Hamir ve ark., 1992b) ve duodenumun submukozal pleksuslarında (Hamir ve ark., 1992b) rastlanmıştır. Gasserian gangliyonu hariç parankimatöz organların gangliyonlarında hücrel infiltrasyonun saptanmadığı kaydedilmiştir. Araştırmacılar (Jubb ve ark., 1985; Hamir ve ark., 1992b) beyinde yangısal ya da nöronal değişiklikler olmasa bile Gasserian gangliyonunda yangısal değişikliklerin bulunabileceğini de bildirmişlerdir. Çalışmada literatür verilerine uyumlu olarak olguların hepsinde Gasserian gangliyonunda, 1 olguda da submandibular tükürük bezinin interlober intersitisyel gangliyonlarında ve periadrenal gangliyonlarda yangı görülmesinin yanında 2/10 olguda Gasserian gangliyonunda Negri cisimciğine rastlanmıştır. Ancak literatür verilerinin aksine santral sinir sistemi dışındaki diğer organlarda inklüzyon cisimciği bulunamamış, para-adrenal bez gangliyonları ise incelenmemiştir.

Araştırmacılar histopatolojik olarak submandibular tükürük bezlerinin intersitisyumunda mononükleer hücre infiltrasyonları, bezlerde hafif nekrotik değişiklikler (Ninomiya, 1955; Balachandran ve Charlton, 1994) ; parotis tükürük bezinde, bezlerde atrofi ya da hiperplazi ve aynı şekilde intersitisyumunda mononükleer hücreler (Ninomiya, 1955); adrenal bez medullasında yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları ile damar dilatasyonları (Balachandran ve Charlton, 1994) saptamışlardır. Çalışmada adrenal medulla, parotis ve submandibular tükürük bezlerinde literatür veriyi destekler nitelikte yangısal değişikliğe rastlanmıştır. Ancak submandibular tükürük bezlerinde nekrotik değişiklikler görülmemiştir.

Balachandran ve Charlton (1994) göz ve deride belirgin yangısal ve dejeneratif değişikliklerin gözlenmediğini bildirmişlerdir. Fekadu ve Shaddock (1984) ise deride büyük ve küçük kıl folikülleri ile kıl papillalarında yangısal infiltrasyon gözlemişlerdir. Çalışmada histopatolojik olarak deride bir lezyona rastlanılamamıştır. Bir köpekte gözün retinanın optik sinir telleri katında mononükleer hücre artışı ve

ödem, diğer 2 köpekte de fokal kanama alanları görülmüş ve bunlar nonspesifik bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Fekadu ve Shaddock (1984) oral kavite, özefagus ve midede makroskopik değişikliklerin bulunmadığını ve bazı hayvanlarda saptanan enteritisin ise kuduz enfeksiyonunun bir kanıtı olmadığını vurgulamışlardır. Ayrıca kuduz virusu verilen 20 farede hastalığa ilgili bulguların yanında intersitisyel miyokarditis saptanmıştır (Castillon, 1973). Bu çalışmada da sindirim sistemi kanalında 1/10 olguda midede fokal mononükleer hücre infiltrasyonu dışında hastalığa ait makroskopik ve mikroskopik hiçbir bulguya rastlanılmadı, 1/10 köpekte ise miyokardiyumun intersitisyumda saptanan birkaç adet mononükleer hücre infiltrasyonu ise dikkate alınmadı. Kuduz köpeklerde orta şiddetli fokal nonsuppuratif kolangitis, karaciğerde nekroz, lenfosit ve plazmositler, nonsuppuratif bronşiolitis ya da intersitisyel pnömoni, fokal kronik nonsuppuratif intersitisyel nefritis ve meduller mineralizasyona rastlandığını kaydetmişlerdir (Woolf ve Smith, 1986). Çalışmada ise 1/10 olguda hayvanda akciğerde ödem, interalveoler interstitisyel pnömoni, fokal nonpurulent interstitisyel nefritis, idrar kesesi epitel hücresinde hidropik dejenerasyon, tonsillerdeki lenfoid folliküllerde kanama ve nekroz, burun submukozasında kanama, 2/10 olguda da lenf düğümü ve dalaktaki lenfoid folliküllerde hiperplaziye rastlanmıştır. Ancak bunlar da hastalığın tanıtıcı bulguları olarak göz önüne alınmamıştır.

Önceleri kuduzun tanısı, genellikle beyin smearlerinde ya da doku kesitlerinde Negri cisimciklerinin görülmesi esasına dayandırılmış (Negri, 1903; Goldwasser ve Kissling, 1958) ve bu cisimciklerin histopatolojik yöntem dışında 1927 yılından itibaren de Seller's boyama ile de görülmeye başladığı kaydedilmiştir. Çalışmada Seller boyama yapılmamıştır. Ancak Pendik Kontrol ve Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitülerinde nekropsisi yapılan 8 adet köpeğin kornu ammonis ve serebellumundan yapılan Seller boyamada hayvanların tümü pozitif çıktığı halde histopatolojik incelemede 2 hayvanın 1'inin hipokampusu diğerinin ise beyinciğinde inklüzyon cisimciklerine rastlanılmamıştır.

Kuduz tanısında son aşama immunofloresan (Goldwasser ve Kissling, 1958) ve immunoperoksidaz (Levaditi ve ark., 1971) yöntemin kullanılmasıdır. Bu immunohistokimyasal yöntemlerle enfekte dokulardaki spesifik kuduz antijeni belirlenmeye çalışılmıştır. Floresan antikör yönteminin taze dokulardan hazırlanan tuşe, dondurulmuş (Goldwasser ve Kissling, 1958; Marie, 1962; Kawamura, 1977) ya da gliserinli dokuların (Barnard ve Voges, 1992) yanısıra etanol veya asetonda fikse edilen dokular için de uygun bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (Goldwasser ve Kissling, 1958; Marie, 1962; Fischman, 1969; Palmer ve ark., 1985). Ancak, yüksek titreli virusla enfekte hayvanların taze dokularından hazırlanan smearlar aktif virus ihtiva edebileceğinden dolayı, tehlikeli kabul edilmiştir (Wachendörfer, 1967; Fischman, 1969). Son yıllarda ise formolde fikse edilmiş ve parafinde bloklanmış dokularda immunofloresan yöntem ile kuduz virusu antijeni saptanmıştır (Johnson ve ark., 1980; Umoh ve ark., 1985; Hamir ve Rupprecht, 1990; Hamir ve ark., 1995). Bu da taze doku saklanması mümkün olmadığı durumlarda ve retrospektif çalışmalarda avantaj sağlamaktadır (Johnson ve ark., 1980). Floresan antikör tekniği ile kuduzun tanısı ekstra ve intrasellüler yerleşimli, histopatolojik yoklamalarda görülmeyen viral antijenler ile histopatolojik olarak saptanan intrasellüler inklüzyon cisimciklerinin boyanması ile yapılır (Goldwasser ve Kissling, 1958; Atanasiu ve ark., 1971; Dean ve Abelseth, 1973; Fischman, 1969; Kotwal ve Narayan, 1985, 1987; Zimmer ve ark., 1990). Parafin kesitlerde direkt immunofloresan yöntem ile Anjeria ve Jhala (1985) % 87-97 oranında, Kotwal ve Narayan (1985, 1987) % 99-100 oranında, Zimmer ve ark. (1990) % 98 oranında pozitif sonuç elde etmişlerdir. Bu çalışmada da literatürü destekler nitelikte santral sinir sisteminin çeşitli bölümlerinde ve Gasserian gangliyonunda 10/10 olguda immunofloresan yöntemiyle viral antijenler ve/veya inklüzyon cisimcikleri saptanmıştır.

Schneider (1964b) immunofloresan yönteminde viral antijenin en çok büyük gangliyon hücrelerine yerleştiğini belirtmiştir. Schaaf ve Schaal (1968) ise kornu ammoniste çok sayıda ve büyük, serebellum, medulla oblongata ve ponsa fazla miktarda fakat küçük veya orta büyüklükte partiküllere rastladıklarını bildirmişlerdir. Fischman (1969), immunofloresan yöntemde serebellumun moleküler katı boyunca,

kornu ammonis, beyin stemi ile medulla spinalis nöronlarında pozitif alanlar bulmuştur. Araştırmacı kornu ammonisin granüler kattaki hücrelerinin enfekte olmadıklarını kaydetmiştir. Klinik olarak hastalığın erken fazında öldürülen hayvanlarda beyin stemi dışında antijen tespit edilmediği de kaydedilmiştir (Schneider, 1964b; Schneider ve Ludwig, 1968). Çalışmada literatür verilerine uygun olarak kuduz pozitif viral antijenlere 10/10 olguda kornu ammonisin piramidal ve polimorf sinir hücrelerinde, serebellumun Purkinje hücreleri ve stratum granulosum sinir hücrelerinde, serebellar pedünkül, kollikulus rostralis, talamus, pons serebri, nukleus kaudatus, medulla oblongata ve medulla spinalisteki nöronların perikaryon, akson ve dendritlerinde rastlanmıştır. Floresan pozitif viral antijenlere genelde tüm beyin kesitlerinde ekstrasellüler olarak da görülmüştür. Ancak Fischman (1969)'nın kaydettiğinin aksine serebellumun moleküler katında pozitif viral antijene rastlanmamıştır.

Bazı araştırmacılar (Schneider, 1964a; Schaaf, 1968) ise rutin olarak formolde fikzasyonu yapılan araştırma materyalinde antijenin denatüre olması dolayısıyla floresanla işaretlenmiş antikora reaksiyona girmeyeceğini ve fikzasyonun uzunluğu oranında antijenin kaybolacağını bildirmişlerdir. Palmer ve ark. (1985), 4 yıldan fazla sakladıkları kuduz müsbet dokuların parafin kesitlerinde hematoksilin-eosin ve immunofloresan boyamalar yapmışlar ve histopatolojik incelemede yangısal reaksiyon ile inklüzyon cisimcikleri gördükleri halde her zaman viral antijeni saptayamamışlardır. Fischman (1969), parafinde bloklanan ve +4°C 'de saklanan dokularda virus antijeninin 5 aydan fazla özelliğini koruduğunu ileri sürmüştür. Çalışmada kullanılan 1980- Ağustos 1996 yıllarına ait 30 adet arşiv doku bloklarının 27 adedinde yangısal reaksiyona ve bunlardan 26 adedinde inklüzyon cisimciklerine rastlanmasına rağmen yapılan immunoperoksidaz yöntem ve önceki araştırmalara uyumlu olarak immunofloresan yöntem ile viral antijen bulunamamıştır. Türkiye'de geçmiş yıllara ait kuduzlu hayvanların doku bloklarında immunoperoksidaz ve immunofloresan yöntem ilk olarak bu çalışmada denenmiştir.

Formolde fikze edilerek parafinde bloklanmış dokularda immunofloresan yönteminde tripsinizasyonunun gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Huang ve ark., 1976; Johnson ve ark., 1980; Vandeveld ve ark., 1983; Umoh ve ark., 1985; Barnard ve Voges, 1992). Tripsinle dokulardaki metilen köprülerinin serbest hale getirilerek viral antijenin daha kolay tesbit edileceği bildirilmiştir (Kawamura, 1977). Reid ve ark. (1983) da oda ısısında 30 dakika pepsin ve tripsini bir arada kullanarak istenen sonucu elde etmişlerdir. Narita ve ark. (1983) dokuları % 0.02 kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) ihtiva eden % 0.25'lik tripsinde  $37^\circ\text{C}$  'de 3 saat tutarak aynı amaca ulaşmışlardır. Huang ve ark. (1976) ise pronaz ve tripsini immunofloresan yöntemde kullanarak tripsinin pronazdan daha aktif olduğunu belirlemişlerdir. Palmer ve ark. (1985) pronaz ya da tripsinin gerekli olmadığını kaydetmişlerdir. Bourgon ve Charlton (1987) da immunofloresan yöntemde formolde tesbit edilen dokuların büyük partiküllerinin vereceği floresanın, donuk yeşil renkli olduğunu kaydetmişlerdir. Çalışmada saptanan partiküllerin genellikle parlak yeşil renkli olmasının teknikte yapılan modifikasyon ve enzim kullanımı ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür. Ancak tripsin ya da pronazın kullanılmadığı preparatlarda immunopozitif görüntünün hem sayıca az hem de donuk yeşil renkte olduğu gözlenmiştir. Sonradan tripsin ya da pronaz ile muamele edilen dokularda ise viral antijenler resimlerde de görüldüğü gibi daha belirgin olarak saptanmıştır. Ancak tripsinin pronazdan daha aktif olup olmadığını saptamak için özel bir çaba gösterilmemiştir. Bu tür enzimatik reaksiyonların tek dezavantajı dokuların işleme sırasında dökülmesidir. Vandeveld ve ark. (1983) bu amaçla yumurta gliserini, % 10 sodyum silikatlı su, etanolde % 2 selloidin, suda % 5 sementit, ksilol ve asetonda % 5 araldit kullanmışlar ve en iyi sonucu % 5 aralditli ksilolden hazırlanan lamlardan elde etmişlerdir. Umoh ve ark. (1985) ise jelatinle kaplı preparatların floresanı kırdığını ve bu nedenle tanıda yanılıya düşülebileceğini vurgulamışlardır. Adezivli lam kullanılmaması durumunda yıkama sırasında dokuların dökülme olasılığını azaltmak, zaman ve malzeme kaybını önlemek amacı ile bu çalışmada jelatinli krom alum kullanılmasına rağmen belirgin bir floresan kaybı saptanmamıştır.



İmmunofloresan yöntemin hastalığın erken döneminde tanıyı sağladığından (Blenden ve ark., 1983) ve bu dönemde tedaviye (Chitra ve ark., 1988) imkan vermesi açısından önem taşıdığı gibi bu yöntemle retrospektif çalışmaların da yapılabileceği kaydedilmiştir (Kawamura, 1977; Kotwal ve Narayan, 1985 , 1987). Kawamura (1977) bu yöntemin gözle seçilemeyecek mikroorganizmaların özellikle de virusların saptanmasında sağlıklı bir yol olduğunu, konjugasyon işlemi ve uygulamasının da kolay olduğunu ileri sürmüşse de Goldwasser ve Kissling (1958) kuduzun erken safhasında bu yöntemle tanıya varılamayacağını vurgulamışlardır. Bu yöntemin boyama prosedürü ve mikroskopta incelenmesi birkaç saat içinde tamamlanmakla beraber floresan ile işaretli antikorların kullanımının çok pahalı olduğu bildirilmiştir (Haines ve Clark, 1991). İndirekt immunofloresan yönteminde primer antikor, antijen ile azami ölçüde reaksiyona girer. Sekunder antikor da aynı şekilde primer antikorla birleştiğinden direkt yöntemle göre daha az konjugatla, 5-10 kez daha iyi sonuç alınır (Kawamura, 1977). Ancak indirekt immunofloresan yönteminde zaman yönünden daha fazla kayıp sözkonusudur. Bu çalışmada zaman kaybı göz önüne alınmadan daha ayrıntılı sonuç almak için indirekt immunofloresan yöntemi kullanılmıştır.

Kalın alınan ya da dondurulmuş doku kesitlerinde otofloresan adı verilen dokuya ya da hücreye ait bir çeşit floresan şekillenir. İmmunizasyonda kullanılan antijen saf değil heterolog antijenik yapılı proteinler içeriyorsa, elde edilen hiperimmün serumun da saf olmaması ve yine immunize yapılan hayvanın başka bir mikroorganizma ile kontamine olmasında istenmeyen nonspesifik floresanlar şekillendiği bildirilmiştir. Fazla florokromla (Flouresceinisothiocyanate, rhodamine) konjuge edilen antikorlar kullanıldığında veya doku fikzasyonu hatalı olduğunda ya da boyama sırasında preparatların kurutulması sonucunda da nonspesifik floresanlar da oluşabilir. Tüm istenmeyen floresanlar teşhis açısından yanıltıcı olduğundan testlerin en az iki kontrolle yapılması gerektiği bildirilmiştir (Kawamura, 1977). Bu çalışmada denemek amacı ile kurumasına izin verilen preparatlarda nonspesifik floresanlar oluşmuş ve ayrıca kullanılan konjugatın iyi pipete edilememesi sonucunda da şekillenen partiküller dolayısıyla hatalı tanıların olabileceği görülmüştür. Yine metodun ilk denendiği dönemlerde serum sulandırmasında kullanılan PBS'in dolaylı bir şekilde

kontamine olması nedeniyle, mikroskopik incelemede zincir şeklinde floresan pozitif yapıların gözlenmiş ve sonradan bunların mantar kümeleri olduğu saptanmıştır. Tüm çalışma yeniden ele alınarak olabildiğince steril çalışılmış ve Kawamura'nın (1977) belirttiği, istenmeyen spesifik floresanlar ortadan kaldırılarak güvenli sonuç elde edilmiştir.

İmmunofloresan yöntem ile kulak ve çene derisinde ayrıca klinik olarak hastalığın ilk günlerinde sokak virusu ile enfekte hayvanların yüz derilerinde kıl foliküllerinin epitel hücreleri (Blenden, 1974; Blenden ve ark., 1983) ile çevresindeki sinir ağlarında (Correa-Giran ve ark., 1970; Blenden ve ark., 1983; Fekadu ve Shaddock, 1984) viral antijenlerin görüldüğü kaydedilmiştir. Bu olaylarda immunofloresan yöntemle beyin ve deride % 100 oranında pozitif viral antijenler bulunduğu kaydedilmiştir. Oysa bu çalışmada kulak derisi kıl follikülü epitel hücrelerinde immunofloresan pozitif granüllere sadece 1/10 olguda rastlanmıştır.

Dil ve tükürük bezleri sinirlerinde floresan pozitif granüllere çok seyrek rastlanırken dalak, böbrek, karaciğer, meme dokusu ve kahverengi yağ dokusunda ise hastalığı belirleyen floresan pozitif granüllerin gözlenmediği bildirilmiştir (Fischman, 1969). Schneider (1969) çeşitli şekillerde elde ettiği sokak virusunu farelere verdiklerinde klinik semptomların görülmesinden günler önce kornea da immunofloresan yöntemle % 71.4, Fekadu ve Shaddock (1984) ise % 36-41 oranında pozitif sonuç alındığını kaydetmişlerdir. Oysa Zimmermann (1971) kuduz virusu antijenini santral sinir sistemi, tükürük ve gözyaşında saptarken korneada bulamamıştır. Ayrıca kornea testinin özellikle ölmüş hayvanlarda negatif sonuç vermesi yanında dışarıdan gelip organa yapışan ve nonspesifik floresan veren partiküllerden dolayı da yanlış pozitif sonuç verebileceğini ve immunofloresan yöntemin korneanın değerlendirilmesinde fazla bir önem taşımadığını vurgulamıştır. Bu çalışmada da literatür verileri ile uyumlu olarak dalak, böbrek, karaciğer, submandibular tükürük bezleri sinirleri ile bunlara ilaveten kornea, ağız ve burun mukozası, trakea, tonsil, larinks, akciğer, kalp, mide, bağırsak, lenf düğümleri, safra kesesi, pankreas, adren, testis, idrar kesesi ve kas hücrelerinde floresan pozitif

granüllere rastlanmamıştır. Schaaf (1968), immunofloresan yönteminde parotis bezinde % 90 pozitiflik sağlamıştır. Çalışmada 1/10 olguda parotis tükürük bezinde, ayrıca 2/10 olguda da retinanın sinir hücrelerinde viral antijenler görülmüştür.

İmmunofloresan yöntemin avantajları yanında dezavantajlarına da dikkat çekilmiştir. Yöntemi kullanmak için preparatların titizlikle hazırlanması (Schaaf, 1968) yanında, özel bir mikroskop ve yalancı pozitif sonuç verebildiği için de bilirkişiye gereksinim vardır (Vandeveld ve ark., 1983; Jayakumar ve ark., 1989; Haines ve Clark, 1991). Ayrıca floresanla boyanmış preparatların saklanma özelliği de yoktur (Haines ve Clark, 1991; Trimarchi ve Debbie, 1991). 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 spesifik, kolay ve daha uzun sürede (Genovese ve Andral, 1978) de olsa iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (Heyderman, 1979; Das ve ark., 1985; Jackson, 1991). Ayrıca immunoperoksidaz yöntemin, immunofloresan yöntemi 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. İmmunofloresan yönteminde olduğu gibi bu yöntemde de formolde fikze edilen doku örneklerinde, aşırı fikzasyonunun doku antijenini maskeleyebilmesi için aldehid bağları proteolitik enzimlerle giderilebilir (Bourne, 1983). Yöntemde kullanılan peroksidaz enzimi pahalı değildir, çok stabil olduğundan imalat, depolama ve uygulama sırasında yapılan işlemlerden etkilenmez. Pek çok kromojen ile iyi reaksiyon verir. Bir florokrom belli dalga boyunda az miktarda görülebilir bir ışık yayarken, peroksidaz enzimi 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 peroksitte tutularak bu aktivite eradike edilmiştir. Avidin-biotin immunoperoksidaz yönteminin ise immunoperoksidaz 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 kullanılmış, ancak prosedür sırasında ısıyı artırmak, primer serumu 2x20 dakika uygulamak ve endojen peroksidaz aktivitesini azaltmak için de 2 kez hidrojen peroksit kullanmak suretiyle daha iyi sonuç alınmıştır.

İmmunoperoksidaz yöntem kuduzda ilk defa Atanasiu ve ark.(1971) tarafından beyinde intra ve ekstra sellüler viral antijeni göstermek için kullanılmıştır. Bu yöntemle, Fekadu ve ark. (1988a) ve Hamir ve ark.(1992b) serebral korteks, kornu ammonis, serebellum, beyin stemi, medulla spinalis ve Gasserian gangliyonundan hazırladıkları parafin kesitlerde ABC yöntemiyle nöron sitoplazmaları ile uzantılarında viral antijenler ve inklüzyon cisimcikleri saptamışlardır. Bunlara Zimmer ve ark. (1990) kaydedilen bölgelere pons ve medulla oblangata, Sinchaisri ve ark. (1992) ise talamus nöronlarını ilave etmişlerdir. Kornu ammoniste viral antijene özellikle piramidal hücrelerde, serebellumda ise Purkinje hücrelerinde, stratum granulozumunda ve glia hücrelerinin etrafında rastlanmıştır(Fekadu ve ark., 1988a; Sinchaisri ve ark., 1992). Parafin bloklarda bu yöntemle Anjaria ve Jhala (1985) % 87-96 oranında, Kotwal ve Narayan (1985, 1987) % 95.3 oranında, Zimmer ve ark. (1990) % 98 oranında pozitif sonuç almışlardır. Çalışmamızda da 10/10 köpekte de literatür verilerine uygun olarak kornu ammonisin piramidal ve polimorf sinir hücrelerinin sitoplazmasında, moleküler katmanında yer alan küçük hücrelerde, serebellar korteksin piramidal hücreleri ile granüler katındaki bazı sinir hücrelerinde ve substansia albadaki glia hücrelerinin etrafında, serebellar pedünkül, talamus, pons serebri, kollikulus rostralis, nukleus kaudatus, medulla oblangata, medulla spinalis ve 9/10 olguda da Gasserian gangliyonu nöronlarında immunoperoksidaz pozitif viral antijen ve/veya inklüzyon cisimcikleri saptanmıştır. Ancak literatürlerin (Charlton ve ark., 1988; Feiden ve ark., 1988; Fekadu ve ark., 1988a; Reetz ve ark., 1990) aksine leptomeningeal hücreler, ependimal ve pleksus hücreleri, damar endotel hücreleri, perivasküler lenfositler ve spongiyöz değişiklikler saptanan beyin bölümlerinde viral antijenlere rastlanmamıştır.

Balachandran ve Charlton (1994), immunoperoksidaz boyamada submandibular tükürük bezlerine ait müköz bez epitellerinin apikal yüzeylerinde viral antijen bulmuşlardır. Ayrıca intersitisyel bağdokudaki gangliyonların ve sinir demetlerinin değişik büyüklükte antijen granülleri içerdiğini kaydetmişlerdir. Bunun yanında antijen içeren hücelere adrenlerin kortiko-medullar sınırında da rastlandığı ve kortekste lezyon bulunmadığını bildirmişlerdir. Kromaffin hücreleri ile intersitisyel sinir fibrillerinde ve kornea epitelinin özellikle bazal hücrelerinde antijen görmüşlerdir. Literatür verilere uyumlu olarak çalışmada da 1/10 olguda submandibular tükürük bezinde yer alan intramural gangliyonlarda, 2/10 olguda submandibular tükürük bezi müköz bez epitellerinde, 6/10 olguda da adrenal medulladaki kromaffin hücrelerinde ve 1/10 olguda kornea epitelinde immunoperoksidaz pozitif viral antijenler saptanmıştır. Fekadu ve ark. (1988a) ve Hamir ve ark. (1992b) parotis tükürük bezi epitel ve gangliyon hücrelerinde viral antijenlere ve inklüzyon cisimcikleri bulmuşlardır. Fekadu ve Shaddock (1984) da parafin kesitlerde, immunoperoksidaz yöntem ile deride % 36.8 viral antijen tesbit etmişler ve tükürük bezlerinde virusun varlığı ile deride viral antijenin varlığı arasında bir korelasyon olabileceğini düşünmelerine rağmen, tükürük bezlerinde saptanan virusun deride de her zaman bulunması gerektiği kanısına varmışlardır. Balachandran ve ark. (1994) da çene bölgesi derisinin epidermal hücreleri ve büyük kıl foliküllerinin vagina pili eksterna hücrelerinde, çok katlı yassı epitelin çoğunlukla stratum bazale, daha az olarakta stratum spinosum tabakasında immunoperoksidaz pozitif viral antijenler bulmuşlardır. Çalışmada da literatür verileri destekler nitelikte 1/10 olguda kulak derisi kıl follikülü epitellerinde, parotis tükürük bezi ve kanal epitellerinde IP pozitif viral antijenler saptanmıştır. Bazı araştırmacılar (Fekadu ve ark., 1988a; Hamir ve ark., 1992b) da pankreas ve bağırsakta viral antijenlere rastlamışlardır. Çalışmada da literatür verilerin aksine pankreasta viral antijen saptanmamışken 1/10 olguda bağırsak submukozasında bulunan sinir pleksuslarında viral antijenlere rastlanmıştır. Ayrıca 2/10 olguda retinanın sinir hücrelerinde, trakea kinosilyumları ve epitel hücreleri arasındaki sinir tellerinde, 1/10 olguda mide de prensipal hücrelerde, idrar kesesi epitelinde, burun mukozası, ağız ve burunun lamina propriasında bulunan sinir tellerinde, burun ve ağız



mukozası bez epitellerinde de kontrol preparatları eşliğinde IP pozitif viral antijenler görülmüştür.



## 5. SONUÇ

Sonuç olarak; çalışmada kullanılan her üç yöntem kendi arasında karşılaştırıldığında immunoperoksidaz tekniğın bazı avantajlara sahip olduğu görüldü. Bunlar formol tesbitli parafın dokularda kullanılabilmesi, preparatların uzun süre saklanması ve ışık mikroskobunda incelenmesi, hassas olması ve çok yüksek dilüsyonlarının bile güvenilir sonuç vermesidir. Kuduzun predileksiyon yeri olan santral sinir sistemi organlarının dışında, diğeri organlardan da pozitif sonuç elde edilmesi patoloji laboratuvarlarında immunoperoksidaz yöntemin güvenle kullanılabilceğı kanısını uyandırmıştır.



## ÖZET

### **Köpeklerde Kuduzun Tanısında Histopatolojik, İmmunoperoksidaz ve İmmunofloresan Yöntemlerin Karşılaştırılması**

Çalışmada köpeklerde kuduzun tanısında immunoperoksidaz yöntemin kullanılabilirliği, histopatolojik ve immunofloresan yöntemlerle karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Materyal olarak Pendik ve Etlik Veteriner Kontrol ve Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüleri'nden temin edilen 10 adet kuduz köpek ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivine ait 30 kuduz köpeğe ait doku (kornu ammonis ve serebellum) blokları incelenmiş ve bulgular aşağıda özetlenmiştir.

1. On köpekte histopatolojik olarak saptanan nonspesifik yangısal ve dejeneratif bulgulara santral sinir sisteminde (kornu ammonis, serebellum, talamus, pons serebri, kollikulus rostralis, nükleus kaudatus, medulla oblangata ve medulla spinalis) ve Gasserian gangliyonu ile parotis bezinde 10/10 olguda, böbreküstü bezlerinde 7/10 olguda ve submandibular tükürük bezlerinde ise 2/10 olguda rastlanmıştır.

2. Hastalık için spesifik olan inklüzyon cisimciklerine yangısal ve dejeneratif değişikliklerle birlikte 8/10 olguda kornu ammonis ve serebellumda, 3/10 olguda talamus, 1/10 olguda nükleus kaudatus ve kollikulus rostralis ile 2/10 olguda da Gasserian gangliyonu sinir hücrelerinde görülmüştür. Bu nedenle histopatolojik tanı için gerekli inklüzyon cisimciklerini bulabilmek için kaydedilen bütün bu bölgelerden marazi madde alınması zorunluluğu bulunmaktadır. İntramural gangliyonlar ve diğer doku hücrelerinde inklüzyon cisimciklerine rastlanmamıştır. Pons, medulla oblangata ve medulla spinaliste inklüzyon cisimciği görülmemiştir.

3. İmmunoperoksidaz yöntem ile santral sinir sisteminin incelenen bütün beyin bölümlerinde 10/10 olguda, Gasserian gangliyonlarında ise 9/10 olguda intra ve ekstrasellüler viral antijen partiküllerine ve/veya inklüzyon cisimciklerine rastlanmıştır.

4. İmmunoperoksidaz yöntem ile sinir sistemi dışında organlardan 6/10 olguda adrenin kromaffin hücrelerinde, 2/10 olguda retinanın sinir hücrelerinde, submandibular tükürük bezi epitel hücrelerinde, trakea kinosilyumları ve epitel hücreleri arasındaki sinirlerde, 1/10 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 hücresinde, 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.

5. İmmunofloresan yöntemle santral sinir sisteminin incelenen her bölgesinde ve gasserian gangliyonunda 10/10 olguda kuduz viral antijen saptanmıştır. Ayrıca 2/10 olguda retinanın sinir hücreleri ile 1/10 olguda parotis bez ve kanal epitel hücrelerinde, deride kıl folikülü epitellerinde viral antijeni belirleyen immunofloresan pozitif granüller bulunmuştur.

6. Arşiv bloklarında, kuduz pozitif 30 köpeğe ait sadece kornu ammonis ve serebellumlar incelenebilmiştir. Histopatolojik incelemede 30 olgunun 27'sinde ensefalitis ve/veya meningoensefalitis, bu olgularında 26'sında her iki beyin bölgesinde müşterek veya ayrı ayrı inklüzyon cisimcikleri görülmüştür.

7. Arşiv bloklarında, immunoperoksidaz ve immunofloresan yöntem ile boyamalarında viral antijeni belirleyen immunopozitif sonuç alınamamıştır. Böylece bu metotların eski bloklarda kuduz tanısında kullanılamayacağı görülmüştür.

8. Bu çalışmada kullanılan avidin-biotin peroksidaz ve indirekt immunofloresan yöntemlerden eşit pozitif sonuç alınmıştır. Ancak her iki yöntem de formol tesbitli parafin bloklarda kullanılabildiği halde, yüksek titreli serumlarla çalışılabilmesi, özel mikroskoba ihtiyaç duyulmaması ve boyanan preparatların uzun süre saklanma özelliğine sahip olması nedeni ile immunoperoksidaz yöntemin patoloji laboratuvarlarında kullanılma avantajının daha fazla olduğu görülmektedir. Bu yöntem ülkemizde kuduzun tanısında ilk defa kullanılmıştır.

**Anahtar Sözcükler :** Kuduz, köpek, immunoperoksidaz, immunofloresan, histopatoloji.

## SUMMARY

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

In this study, the effectiveness of the immunoperoxidase staining method for the diagnosis of rabies was investigated as compared with immunofluorescence and histopathological methods. The fresh tissues of 10 rabies suspected dogs obtained from Pendik and Etlik Veterinary Control and Animal Diseases Research Institutes and the old brain tissues of 30 rabies positive dogs kept in formalin-fixed and paraffin-embedded blocks from University of Ankara, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, were used in the study.

The results are as follows :

1. The nonspecific inflammatory reactions and degenerative changes detected by histopathologic method as regarding rabies were observed in the central nervous system (cornu ammonis, cerebellum, thalamus, colliculus rostralis, pons cerebri, nucleus caudatus, medulla oblongata and spinal cord), Gasserian ganglions and parotid glands (10 cases), adrenal glands (7 cases), and submandibular salivary glands (2 cases).

2. The Negri bodies which have been known as specific for rabies were seen in the cornu ammonis and cerebellum (8 cases), thalamus (3 cases), nucleus caudatus and colliculus rostralis (1 case), and also in the Gasserian ganglion (2 cases) except medulla oblongata, spinal cord and pons cerebri. To detect inclusion bodies in the diagnosis of rabies, the samples must be taken from these regions listed above. The Negri bodies have not been found in the intramural ganglions and other tissue cells.

3. In the immunoperoxidase staining method, extra and intra cellular rabies virus antigen and/or the inclusion bodies were seen at all central nervous system sections examined in 10 clinically rabies suspected dogs, also at the Gasserian ganglion's cell body (9 cases).

4. In addition, by using immunoperoxidase staining method, immunopositive granules pointed as specific for rabies were identified in ganglion cell layer of retina, submandibular salivary gland cells (2 cases), especially 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).

5. In the immunofluorescence staining method, the rabies virus antigen was recorded at all central nervous system sections examined in 10 clinically rabies suspected dogs. Also immunopositive granules were detected on the Gasserian ganglion's cell body (10 cases), ganglion cell layer of retina (2 cases), parotid gland cell and its duct epithelial cells and hair follicle cells of skin (1 case).

6. In the old brain tissues kept in formalin-fixed and paraffin- embedded blocks of 30 rabies positive dogs, only cornu ammonis and cerebellum could be examined by using histopathological method. Encephalitis and/or meningoencephalitis were present in 27 cases while inclusion bodies were observed in common or seperately among the brain specimens of 26 cases.

7. In the immunoperoxidase and immunofluorescence staining methods which had been applied to these paraffin blocks, immunopositive results were not seen. Therefore it has been considered that immunoperoxidase and immunofluorescence staining methods could not be used on the paraffin blocks kept for many years in the diagnosis rabies.

8. Equally positive results were obtained from the avidin-biotin peroxidase and indirect immunofluorescence methods used in this study. Although both methods could be used conveniently in formalin fixed and paraffin embedded blocks, the immunoperoxidase method appeared to be more advantageous for use in pathology laboratories since this method permitted the usage of high titered sera as well as the usage of more simplified microscopes and the storage of stained slides for a long time. This immunoperoxidase method has been used for the first time in the diagnosis of rabies in our country.

**Key Words :** Rabies, dog, immunoperoxidase, immunofluorescence, histopathology.



## KAYNAKLAR

- ADEMOĞULLARI, N. (1992). Kuduz teşhisinde kullanılan metodların ( Sellers boyama, floresan antikor tekniği, histopatolojik muayene, fare inokulasyonu ) karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- AKAN, E . (1994). Genel ve Özel Viroloji. Kanyılmaz Matbaası, İzmir: 3. Baskı, 374-398.
- ANDREWES, C.H., WALTON, J.R. (1990) . Viral and Bacterial Zoonoses. In : Animal and Human Health, Ed: G.C. Brander, London: Bailliere Tindall, p.: 425-449.
- ANJARIA, J.M., JHALA, C.I. (1985). Immunoperoxidase reaction in diagnosis of rabies. *Int. J. Zoonoses*, **12**: 267-275.
- ANON (1981). Rabies case in Europe. Rabies transmission via corneal transplant. In: *Rabies Bulletin Europe*, **5**: 4.
- ANON (1989). Manual of recommended diagnostic techniques. In: *Rabies Bulletin Europe*, **1** : B 8/1-7.
- ANON (1995). Rabies case in Europe. In: *Rabies Bulletin Europe*, **14**: 3-7.
- ANON (1996). Rabies case in Europe. In: *Rabies Bulletin Europe*, **4**: 3-25.
- ATANASIU, P., DRAGONAS, P., TSIANG, H., HARBI, A. (1971). Immuno-peroxidase nouvelle technique spécifique de mise en evidence de l'antigene rabique intra-et extra-cellulaire en microscopie optique. *Ann. Inst. Pasteur*, **121**: 247-250.
- BABES, V. (1892). Sur certains caracteres des lesions histologiques de la rage. *Ann. Inst. Pasteur*, **6**,209-223. In: "Natural History of Rabies" Vol.1. Chapter 19, p. : 375, Ed.: Baer,G.M., Academic Press, Newyork : 1975. ANJARIA, J.M., JHALA, C.I. (1985). Immunoperoxidase reaction in diagnosis of rabies. *Int. J. Zoonoses*, **12**: 267-275 (Alınmıştır).
- BAER, G.M. (1988). Animals models in the pathogenesis and treatment rabies. *Rev. Infect. Dis.*, **10**(supp-4): 739-750.
- BAER, G.M., LENTZ, T.L. (1991). Rabies pathogenesis to the central nervous system. In : *The Natural History of Rabies*, Ed.: George, M. Baer, Boston: CRC Press, p.: 105-117.
- BAER, G.M., SHADDOCK, J.H., QUIRION, R., DAM, T.V., LENTZ, T.L. (1990). Rabies susceptibility and acetylcholine receptor. *Lancet*, **335**: 664-665.
- BAER, G.M., WANDELER, A.I. (1987). Rabies Virus . In: *Virus Infections of Carnivores*, Ed.: Max J. Appel, Newyork : Elsevier Science Publishers B.V., p.: 167-182.

- 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.
- BARRAT, J., AUBERT, M. F. A. (1993). Current status of fox rabies in Europe. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **60**: 357-364.
- BERKE, M.Z. (1974). Tıbbi Viroloji. **1**: 644-783. GÜZEL, T. (1996). Yerli ve ithal kuduz aşları ile aşılanan köpeklerde bağışıklığın invivo ve invitro yöntemlerle saptanması. Uzmanlık Tezi , Ankara (Alınmıştır).
- BERKİN, Ş., ALÇIĞIR, G. (1986). 1973-1984 periyodunda incellenen 523 köpeğin post mortem bulguları üzerinde survey çalışma. *AnkaraÜniv. Vet. Fak. Dergisi*, **33**:: 153-164.
- BLANCOU, J. (1994). Early methods for the surveillance and control of rabies in animals. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **13**: 361-372.
- BLENDEN, D.C. (1974). Diagnosis of rabies in various species by immunofluorescent staining of skin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **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., RADOSTITS, D.M., HENDERSON, J.A. (1983). *Veterinary Medicine*, 6<sup>th</sup> edition. London: Bailliere Tindall, p.: 816-821.
- BOURGON, A.R., CHARLTON, K.M. (1987). The demonstration of rabies antigen in paraffin embedded tissues using the peroxidase-antiperoksidase method : A comparative study. *Can. J. Vet. Res.*, **51**: 117-120.
- BOURHY, H., SUREAU, P., TORDO, N. (1990). From rabies to rabies-related viruses. *Vet. Microbiol.*, **23**:115-118.
- BOURNE, J.A. (1983). *Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods*. USA: Dako Corporation, p.: 7-35.
- BUNDZA, A., CHARLTON, K.M. (1988). Comparison of spongiform lesions in experimental scrapie and rabies in skunks. *Acta Neuropathol.*, **76**: 275-280.
- BURKHART, R.L., JERVIS, G.A., KOPROWSKI, H. (1950). Postvaccinal paralysis and demyelination in the dog following antirabies vaccination. *Vet. Med.*, **65**: 1-5.
- BUSSEREAU, F., SUREAU, V.P. (1989). Techniques D' immunofluorescence, utilisant des anticorps monoclonaux, appliquees au diagnostic des infections a virus apparentes au virus rabique. *Rec. Med. Vet.*, **165**: 733-736.
- BUXTON, A., FRASER, G. (1977). *Rhabdoviruses Animal Microbiology*. Edinburgh: Black Well Scientific Publication, p.: 553-4
- CARSKI, T.R., WILSNAY, R.E.W., SIKES, R.K. (1962). Pathogenesis of rabies in wildlife. II. Fluorescent Antibody Studies. *Am. J. Vet. Res.*, **23**:1048-1052.

- CASTILLON, J.R.F. (1973). La histopatologia del corazon de ratones blancos inoculados con virus rabico. *Rev. Med. Vet.*, **54**: 101-102.
- CECCALDI, P.E., GILLET, J.P., TSIANG, H. (1989). İnhibition of the transport of rabies virus in the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **48**: 620-630.
- CHARLTON, K.M.(1984). Spongiform Lesions. *Acta Neuropathol.* **63**: 198-202. Campbell, J.B., Charlton, K.M. (1988). *Developments in Veterinary Virology : Rabies*. Massachussets: Kluwer Academic Publishers (Alınmıştır).
- CHARLTON, K.M.(1988). The pathogenesis of rabies. In: *Developments in Veterinary Virology : Rabies*, Ed.: Campbell, J.B., Charlton, K.M. , Massachussets: Kluwer Academic Publishers, p.: 100-140
- CHARLTON, K.M., CASEY, G.A., CAMPBELL, J.B. (1987). Experimental rabies in skunks: Immunoresponse and salivary gland infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **10**: 227-235.
- CHARLTON, K.M., CASEY, G.A., WEBSTER, W.A, BUNDZA, A. (1988). Spongiform Lesions. *Lab. Invest.*, in press. Campbell, J.B., p.: 123-125. Charlton, K.M. (1988). *Developments in Veterinary Virology : Rabies*. Massachussets: Kluwer Academic Publishers (Alınmıştır).
- CHITRA, L., PANDIT, V., KALYANARAMAN, V.R. (1988). Use of murine neuroblastoma culture in rapid diagnosis of rabies. *Indian J. Med. Res.*, **87**: 113-116.
- CLARK, K.A. (1988). Rabies . *JAVMA*, **192**: 1404-1406.
- CORREA-GIRON, E.P., ALLEN, R., SULKIN, S.E. (1970). The infectivity and pathogenesis of rabies virus administered orally. *Am. J. Epidem.*, **91**: 203-215.
- COULON, P., LAFAY, F., FLAMAND, A. (1993). Rabies virus antigenicity: an overview. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **60**: 271-275.
- 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.
- DEAN, D.J., ABELSETH, M.K. (1973). The fluorescent antibody test. In: *Laboratory Techniques in Rabies*, Ed.: M.M. Kaplan , H. Koprowski, Geneva: World Health Organisation, p.: 73-84.
- DENK, H., RADASZKIEWICZ, T., WEIRICH, E. (1977). Pronase pretreatment of tissue sections enhances sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) technique. *J. Immunol.*, **15**: 163-167.
- ERTÜRK, E., TANZER, F. (1973) .1961-1972 yılları arasında Ankara ve yöresinde köpeklerde görülen hastalık olaylarına kısa bir bakış. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Dergisi*, **20**: 277-280.
- FEIDEN, W., KAISER, E., GERHARD, L., DAHME, E., GLYSTORF, 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. (1988). Pathogenesis of rabies virus infection in dogs. *Rev. Infect. Dis.*, **10 (Supp-4)**: 678-683.

- FEKADU, M.(1991). Canine rabies. In : *The Natural History of Rabies*, Ed.: George, M. Baer, Boston : CRC Press, p.: 367-378.
- FEKADU, M. (1993). Canine rabies. *Onderstepoort J.Vet.Res.*, **60**: 421-427.
- 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.(1984). Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. *Am. J. Vet. Res.*, **45**: 724-729.
- 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.
- FISCHMAN, H.R., GRIGOR, J.K., HORMAN, J.T., ISRAEL, E. (1992). Epizootic of rabies in raccoons in Maryland from 1981 to 1987. *JAVMA*, **201**: 1883-1886.
- 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.
- FORMAN, A.J. (1993). The threat of rabies introduction and establishment in Australia. *Aust. Vet. J.*, **70**:81-83.
- GENOVESE, M.A., ANDRAL, L.(1978). Comparaison de deux techniques utilisees pour le diagnostic de la rage: L'immunofluorescence et l'immunoperoxidase. *Rec. Med.Vet.*, **154**: 667-671.
- GILLET, J.P., DERER, P., TSIANG, H.(1986). Axonal transport of rabies virus in the central nervous system of the rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* , **45**: 619-634.
- GRIBENCHA, S.V., GRIBANOVA, L., MALKOV, G.B., BARINSKY, I.F.(1989). Population structure of some street rabies virus strains. *Arch. Virol.*, **104**: 347-350.
- 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.(1991). Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. *Can. Vet. J.*, **32**: 295-302.
- 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.
- HAMIR, A.N., MOSER, G., RUPPRECHT, C.E. (1992a). A five year (1985-1989) Retrospective study of equine neurological diseases with special reference to rabies. *J. Comp. Path.*, **106**: 411-421.

- HAMIR, A.N., MOSER, G., RUPPRECHT, C.E. (1992b). Morphologic and immunoperoxidase study of neurologic lesions naturally acquired rabies of raccoons. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**:369-370.
- 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.
- HEYDERMAN, E.(1979). Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. *J. Clin. Pathol.*, **32**: 971-978.
- HUANG, S., MINASSIAN, H., MORE, J.D.(1976). Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab. Invest.*, **35**: 383-389.
- İMREN, H.Y., ŞAHAL, M. (1990). Veteriner iç hastalıkları. Ankara: Aydoğdu Ofset, p. 257
- IRVIN, A.D. (1970). The epidemiology of wildlife rabies. *Vet. Rec.*, **87**: 333-348.
- IWASAKI, Y.(1991). Spread of virus within the central nervous system. In : *The Natural History of Rabies*, Ed.:George, M Baer, Boston : CRC Press, p.: 421-431.
- 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.(1989). Pathogenesis of experimental rabies in mice: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol.*, **78**:159-165.
- 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.
- JENKINS, S.R., WINKLER, W.G. (1987) . Descriptive epidemiology from an epizootic of raccoon rabies in the Middle Atlantic States, 1982-1983. *Am .J. Epidemiol.*, **126**: 429-437.
- JOHNSON, R.T. (1983). Viral infections of the nervous system. Raven Press, Newyork,p.: 271-193.
- FEKADU, M., SHADDOCK, J.H., CHANDLER, F.W., SANDERLIN, D.W.(1988b).Pathogenesis of rabies virus from a Danish bat (*Eptesicus seratinus*): Neuronal changes suggestive of spongiosis. *Arch. Virol.*, **99**: 187-203 (Alınmıştır).
- JOHNSON, K.P., SWOVELAND, P.T., EMMONS, R.W. (1980). Diagnosis of rabies by immunofluorescence in trypsin-treated histologic sections. *JAVMA*, **244**: 41-43.
- JONES, T.C., HUNT, R.D. (1983). Veterinary Pathology 5<sup>th</sup> edition. London, Lea&Febiger, p.: 455-461.
- JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N. (1985). Pathology of Domestic Animals 2<sup>nd</sup> edition. London , Academic Press, p.: 290-296.
- KAWAMURA, A. (1977). Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications 2<sup>nd</sup> edition. Tokyo, University of Tokyo Press, p. : 5-93.

- KEHL, G. (1981). Zur pathogenese und pathologie virusbedingter enzephalopathien. Thesis; Hannover.
- KING, A.A. (1993). Monoclonal antibody studies on rabies-related viruses. *Onderstepoort J. Vet. Res.* , 60:283-287.
- KING, A.A., TURNER, G.S. (1993). Rabies: A review. *J. Comp. Pathol.* , 108:1-39.
- KISSLING, R.E. (1975). The fluorescent antibody test in rabies. In: *The Natural History of Rabies*, Ed.: G.M., Baer , New York : Academic Press Inc, 1: p.: 401-416.
- KOPROWSKI, H. (1973). The mouse inoculation test. In: *Laboratory Techniques in rabies*, thierd edition, Ed.: Kaptan , M.M. and Koprowski, H.), WHO, Geneva : p.: 85-93.
- KOTWAL, S., NARAYAN, K.G.(1985). Direct immunoperoxidase test in the diagnosis of rabies-an alternative to fluoescent 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.
- KREBS, J.W., HOLMAN, R.C., HINES, U., STRINE, T.W., MANDEL, E.J., CHILDS, J.E.(1992). Rabies surveillance in the United States during 1991. *JAVMA*, 201: 1836-1848.
- KREBS, J.W., TARA, W., STRINE, W., CHILDS, J.E. (1993). Rabies surveillance in the United States during 1992. *JAVMA*, 203: 1718-1731.
- KULONEN, K., NEUVONEN, E., MARJA, T. (1991). Methods for detecting arctic rabies virus in dilution series of field samples. *J. Virol. Methods*, 32: 149-155.
- LEVADITI, C., ATANASIU, P., GAMET, A., GUILLION, J.C. (1971). Rabies diagnosis: Problems raised by immunofluorescence and immunoperoxidase methods. *Arch. Inst. Past. Alg.*, 49:75-83.
- LORETU, K., BLENDE, D.C., TORRES-ANJEL, M.J., SATALOWICH, F.T. (1988). Morphologic appearance of inclusion bodies and their association with the antigenic composition of naturally occurring rabies viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 283-286.
- LUNA, L.G.(1960). *Manual of Histologic and Special Staining Technics* . USA: McGraw-Hill Book Company, p.: 27 , 171-173.
- MARIE, G.S.(1962). A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem.*, 10: 250-256.
- MAC KENZIE, D. (1990). How Europe is winning its war against rabies. *NST*, 26 May, 26-27.
- McQUEEN, J.L., LEWIS, A.L., SCHNEIDER, N.J. (1960). Rabies diagnosis by fluorescent antibody. I-its evaluation in a public health laboratory. *Am. J. Pub. Health.*, 50: 1743-1752.
- MEERDINK, G. (1969). Rabies diagnosis: Fluorescent antibody technique. *Iowa State Univ*, 1: 20-24.
- MEEHAN, S.K. (1995). Rabies epizootic in coyotes combated with oral vaccination program. *JAVMA*, 206: 1097-1099.



- MEYER, H.M. (1980). Rabies vaccines. *J. Infect. Dis.*, **142**: 287-289.
- MOULTON, J.E. (1954). A histochemical study of the negri bodies of rabies. *Am. J. Pathol.*, **30**: 533-543.
- MURPHY, F.A., HARRISON, A.K., WINN, W.C., BAUER, S.P. (1973). Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. *Lab. Invest.*, **29**: 1-16.
- NARITA, M., INUI, S., KOBAYASHI, M., FUKUSHO, A. (1983). Demonstration of Aujeszky's disease virus antigen in trypsin-digested paraffin-embedded tissue sections by immunofluorescence. *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, **23**: 105-107.
- 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 1. rabies. *Int. J. Zoonoses.*, **12**: 267-275 (Alınmıştır).
- NOORDEN, S., POLAK, J.M. (1983). Immunocytochemistry today. In: *Immunocytochemistry*, Ed.: M. Julia Polak, Susan Van Noorden, London: Wright-PSG, p.: 11-43.
- NINOMIYA, 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.
- ÖMER, A. (1565): Gazaname ve Baytarname. Süleymaniye Kütüphanesi Esat efendi kısmı No: 2458, yazma eser, İstanbul. Erk, N. (1975): Tarihte Kuduz Hastalığı. *Fırat Üniv. Vet. Fak. Dergisi*, **2**: 210-215 (Alınmıştır).
- 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.
- PAMUKÇU, M.A., ERTÜRK, E. (1961). 1933-1960 yılları arasında Ankara ve yöresinde köpeklerde görülen hastalıklara toplu bir bakış. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Dergisi*, **8**: 323-346.
- PERCY, D.H., BHATT, P.N., TIGNOR, G.H., SHOPE, R.E. (1973): Experimental infection of dogs and monkeys with two rabies serogroup viruses, lagos bat and mokola (IbAn 27377). *Vet. Pathol.*, **10**: 534-549.
- PETROVIC, M. (1989). Imported human rabies case in Yugoslavia. *Rabies Bulletin Europe*, **13**: 14.
- RAJAN, T.S.S., PADMANABAN, V.D. (1987). Diagnosis of rabies with glycosuria in herbivores. *Indian Vet. J.*, **64**: 274-279.
- REETZ, J., SCHILOW, W.F., PAHLKE, C.H.R., ANDULEIT, M. (1990). Immunohistochemischer Nachweis von Tollwutantigen. *Mh. Vet. Med.*, **45**: 85-87.
- REID, F.L., HALL, N.H., SMITH, J.S., BAER, G.M. (1983). Increased immunofluorescent staining of rabies-infected, formalin-fixed brain tissue after pepsin and trypsin digestion. *J. Clin. Microbiol.*, **18**: 968-971.
- RUPPRECHT, C.E., GLICKMAN, L.T., SPENCER, P.A., WIKTOR, T.J. (1987). Epidemiology of rabies virus variants. *Am. J. Epidemiol.*, **126**: 298-3

- RUSSEL, A.D., YARNYCH, V.S., KOULIKOVSKI, I. (1984). Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases. Geneva: *WHO*, 84: 34-35.
- SCHAAF, J. (1968). Technik und Zuverlässigkeit der mikroskopischen Diagnose der Tollwut. II. Antigen-Nachweismittels Fluoreszenz-Antikörper-Technik. *Zbl. Vet. Med.*, B 15: 249-258.
- SCHAAF, J., SCHAAL, E. (1968). Die Viruskalisation bei Tollwut. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 75: 315-323.
- 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.
- 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. (1991). Spread of virus from the central nervous system. In : *The Natural History of Rabies*, Ed: George M Baer , Boston: CRC Press, p.: 133-141,
- SCHNEIDER, L.G., COX , J.H., MULLER, W.W., HOHNSBEEN, K.P. (1988). Current oral rabies vaccination in Europe: An Interim Balance. *Rev. Inf. Dis.*, 10: 654-659.
- SCHNEIDER, L.G., LUDWIG, H. (1968). Die Laboratoriumsdiagnose der Tollwut unter besonderer Berücksichtigung des COONS'Schen Fluoreszenzverfahrens. *Wien Tierärztl. Mschr.*, 55: 133-148.
- SCHRODER, B. (1989). Erfahrungsbericht über die Arbeit eines Kreistierarztes bei der Verhütung und Bekämpfung der Tollwut. *Mh. Vet. Med.*, 44: 201-204.
- SCHULTZ, W. (1986). Die Tollwut des Rindes-Workommen und Labordiagnose. *Mh. Vet. Med.*, 41: 327-329.
- 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.
- SHOPE, R.L., MURPHY, F.A., HARRISON, A.K., CAUSEY, O.R., KEMP, G.E., SIMPSON, D.I.H., MOORE, D.L. (1970). Two African viruses serologically and morphologically related to rabies virus. *J. Virol.* , 16: 693-694.
- SILVA, R.A., GUILHERME, S., BRECKENFELD, B. (1968a) . Ocorrencia da raiva em lobo-guara. *Pesq. Agropec. Bras.*, 3: 369-371.
- SILVA, R.A.D., SOUZA, A.M.D. (1968a). Isolamento de virus rabico de pulmao, coração, rins, bexiga e outros diferentes tecidos de morcegos hematofagos da especie *Desmodus rotundus*. *Pesq. Agropec. Bras.*, 3:291-301.
- SILVA, R.A.D., SOUZA, A.M.D. (1968b). A pesquisa do virus da raiva na glandula inter-escapular de morcegos do brasil em condições naturais de infecção. *Pesq. Agropec. Bras.*, 3:313-315.

- SILVA, R.A.D., SOUZA, A.M.D. (1968c). Ocorrência do vírus da raiva em diferentes tecidos de cão na doença natural. *Pesq. Agropec. Bras.*, 3:317-318.
- SILVA, R.A.D., SOUZA, A.M.D. (1968d). A ocorrência do vírus da raiva no útero, feto, testículos e outros órgãos de morcegos hematofagos, *Desmodus rotundus* na infecção natural. *Pesq. Agropec. Bras.*, 3:365-368.
- SILVA, R.A.D., SOUZA, A.M.D., ANDRE, C.A.F. (1968b). Ocorrência do vírus da raiva em pulmão, rins, bexiga e outros tecidos de gato, doméstico naturalmente infectado. *Pesq. Agropec. Bras.*, 3:361-364.
- SILVA, R.A.D., SOUZA, A.M.D., LIMA, A.C. (1967). Isolamento de vírus rabico do rim, coração e cérebro de bovino na doença natural. *Pesq. Agropec. Bras.*, 2:359-366.
- SINCHAI SRI, T., NAGATA, T., YOSHIKAWA, Y., KAI, C., YAMANAUCHI, K. (1992). Immunohistochemical and histopathological study of experimental rabies infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.*, 54: 409-416.
- SMITH, W.B., BLENDEN, D.C., FUH, T.H., HILER, L. (1972). Diagnosis of rabies by immunofluorescent staining of frozen sections of skin. *JAVMA*, 161: 1495-1501.
- STEEL, J.H., FERNANDEZ, P.J. (1991). History of rabies and global aspects. In: *The Natural History of Rabies*, Ed.: George M Baer, Boston: CRC Press, p.:1-21
- 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.
- SURAEU, P., RAVISSE, P., ROLLIN, P.E. (1975). Rabies diagnosis by animal inoculation, identification negri bodies or ELISA. In: *The Natural History of Rabies*, Ed.: George M Baer, Boston: CRC Press, p.: 203-215.
- TABEL, H., CORNER, A.H., WEBSTER, W.A., CASEY, C.A. (1974). History and epizootiology of Rabies in Canada. *Can. Vet. J.*, 15: 271-281.
- TANZER, F. (1976). Kuduz hastalığının teşhisinde floresan antikor tekniği ile histopatolojik yoklamalardan elde olunan sonuçların karşılaştırılması. *Şişli Çocuk Hastanesi Tıp Bülteni*, 2: 134-149. ADEMOĞULLARI, N. (1992). Kuduz teşhisinde kullanılan metodların (Sellers boyama, floresan antikor tekniği, histopatolojik muayene, fare inokulasyonu) karşılaştırılması. *Uzmanlık Tezi*, İstanbul (Alınmıştır).
- TOLLIS, M., CIVARDI, A. (1989). Imported dog rabies case in Italy. *Rabies Bulletin Europe*, 13: 14-15.
- TOLSON, N.D., CHARLTON, K.M., CASEY, G.A., WEBSTER, W.A., MacKENZIE, K., CAMBELL, J.B., LAWSON, K.F. (1990). Mutants of rabies viruses in skunks: Immune response and pathogenicity. *Can. J. Vet. Res.*, 54: 178-183.
- TORDO, N., KOUKNETZOFF, A. (1993). The rabies virus genome: an overview. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 60: 263-269.
- TORRES-ANJEL, M. J., VOLZ, D., TORRES, M.J.R., TURK, M., TSHIKUKA, G. (1988). Failure to thrive, wasting syndrome, and immunodeficiency in rabies: A hypophyseal/hypothalamic/thymic axis effect of rabies. *Rew. Inf. Diseases*, 10: 710-719.

- TRIMARCHI, C.V., DEBBIE, J.G. (1974). Production of rabies fluorescent conjugate by immunization of rabbits with purified rabies antigen. *Bull. World Health Organ*, **51**: 447-449.
- TRIMARCHI, C.V., DEBBIE, J.G. (1991). The fluorescent antibody in rabies. In : *The Natural History of Rabies*, Ed.: George M Baer, Boston: CRC Press, p.: 219-229.
- TSIANG, H., CECCALDI, P.E., LYCKE, E. (1991). Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons. *J.Gen. Virol.*, **72**:1191-1194.
- TSIANG, H., LYCKE, E., CECCALDI, P.E., ERMINE, A., HIRARDOT, X. (1989). The anterograde transport of rabies virus in rat sensory dorsal root ganglia neurons. *J. Gen. Virol.* , **70**: 2075-2085.
- TUNÇMAN, Z.M. (1952) . L'epidemiologie de la rage en Turquie. *Bull. Inst. Pasteur*. **50**:375.
- Gribencha, S.V., Griбанова, L., Malkov, G.B., Barinsky, I.F.(1989). Population structure of some street rabies virus strains. *Arch Virol.*, **104**:347-350 (Alınmıştır).
- TUNÇMAN, Z.M. (1958). *Turk. Mikrobiol. Dergisi*. **11**: 81. Campbell, J.B., Charlton, K.M. (1988). *Developments in Veterinary Virology : Rabies*. Massachussetts: Kluwer Academic Publishers (Alınmıştır).
- ULRICH, K., JACKSCH, W., GLAWISCHNIG, E. (1985). Grundriss derspeziellen pathologie und therapie der haustiere. *Ferdinand Enke Verlag*, Stuttgart, 11, Auflage 41-45.
- UMOH, J.U., EZEOKOLI, C.D., OKOH, A.E.J. (1985). Immunofluorescent staining of trypsinized formalin by standart methods for 221 suspect animal cases in Nigeria. *J. Hyg. ( Camb.)*, **94**: 129-134.
- van GEHUCHTEN, A., NELIS, C. (1900). Les lesions histologiques de rage chez les animaux et chez l'homme. *Bull Acad R Med Belg* ; **14**: 31-36. Fekadu M, Chandler FW, Harrison AK (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 (Alınmıştır).
- VANDEVELDE, M., HUGI, 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 fluoresceinmarkierten Antikörpern "gefärbten" Präparaten. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* , **80**: 127-130.
- WANDALER, A.I. (1991). Oral immunization of wildlife. In : *The Natural History of Rabies*, Ed.: George M Baer, Boston : CRC Press, p. :485-497.
- WEILAND, F., COX, J.H., MEYER, S., DAHME, E., REDDEHASE, M.J. (1992). Rabies virus neuritic paralysis: Immunopathogenesis of nonfatal paralytic rabies. *J. Virol.*, **66**: 5096-5099.
- WHO (World Health Organization) Expert Committee on Rabies (1973). Wld. Hlth. Org. Techn. Rep. Ser; 523: Sixth Report, Geneva.

- WHO (World Health Organization) (1982). World survey of rabies. 21:1982/1983, Geneva.
- WILSNACK, R.E., PARKER, R.L. (1966). Pathogenesis of skunk rabies virus: rabies inhibiting substance as related to rabies diagnosis. *Am. J. Vet. Res.*, 27: 39-43.
- 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.



T.C. FIKSENÇERETİN ANKARA  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ