

Doğal Olarak Enfekte Olmuş Farklı Tür Hayvanlardan, Post-Mortem Olarak Elde Edilen Beyin Numunelerinde, Klasik Kuduzun Rutin Laboratuvar Teşhisinde Real Time RT-PCR Testinin Değerlendirilmesi

Metin GÜRÇAY¹  Ayşe PARMAKSIZ¹ Ayşe KILIÇ²

¹ Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Veteriner Kontrol Enstitüsü, Viroloji Laboratuvarı, TR-23200 Elazığ - TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi, Sivrice Meslek Yüksekokulu, TR-23119 Elazığ - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2013-10661

Özet

Bu çalışmada, doğal olarak enfekte olmuş farklı hayvan türlerine ait beyin numunelerinde klasik kuduzun teşhisi için real-time RT-PCR testi değerlendirildi. Çalışma materyalini Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne 2011 yılı boyunca Türkiye'nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde bulunan Elazığ, Malatya, Diyarbakır, Mardin, Tunceli, Muş, Bingöl, Batman, Şırnak, Hakkâri ve Bitlis illerinden getirilen 36 köpek, 13 sığır, 6 koyun, 6 eşek, 4 at, 4 tilki, 3 kurt, 2 kedi ve 1 keçiye ait toplam 75 adet kuduz hastalığı şüpheli beyin numunesi oluşturmuştur. Farklı hayvan türlerine ait beyin numunelerinden kuduz virüsü genomunu tespit etmek amacıyla klasik kuduz virüsüne özgü primer ve TaqMan prob seti kullanıldı. Bu primer ve prob seti, beyin numunelerine real-time RT-PCR testi optimize edilerek uygulandı. Laboratuvara ulaşan beyin numunelerine floresan antikor tekniği (FAT) ve deneme hayvanı inokulasyonu (MIT) testleri ile birlikte real time RT-PCR testi de yapıldı. Real-time RT-PCR testi ile 75 beyin numunesinin 53'ünde kuduz virusuna ait spesifik viral RNA tespit edildi. Otoliz olmuş 3 adet köpek beyni numunesine FAT ve MIT uygulanamazken, real-time RT-PCR testi sonucunda bu numunelerin birinde kuduz virusuna ait spesifik viral RNA tespit edildi. Taze (n=72) beyin dokularından etçillerde *C. ammonis*, otçullarda *Cerebellum*'dan elde edilen homojenatlara direkt FAT testi uygulandı, 72 beyin numunesinin 51'inde viral antijenler tespit edildi. Aynı homojenatlardan MIT yöntemiyle 72 beyin numunesinin 52'inde virüs izolasyonu sağlandı. Taze beyin numunelerinden elde edilen MIT testi sonuçlarının, real-time RT-PCR testi sonuçları ile tam uyum gösterdiği (%100) görüldü. Sonuç olarak, klasik kuduz teşhisinde direkt beyin dokusuna uygulanan real-time RT-PCR testinin, hem FAT ve MIT uygulanamayan otoliz olmuş numunelerde güvenle kullanılabilmesi ve hem de alt yapısı sağlanmış laboratuvarlarda invitro şartlarda FAT için doğrulayıcı test olarak da kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Kuduz Teşhisi, Klasik Kuduz Virüsü, Real-Time RT-PCR

Evaluation of Real-Time RT-PCR Assay for Routine Laboratory Diagnosis of Classical Rabies in Post-Mortem Brain Samples from Naturally Infected Different Species of Animals

Summary

In this study; the real-time RT-PCR assay was evaluated for laboratory diagnosis of classical rabies in post mortem brain samples from naturally infected different animals species. The material consisted of 75 suspected brain samples brought from 11 different provinces, belonging Eastern and Southeastern Anatolia region, including Elazığ, Malatya, Diyarbakır, Mardin, Şırnak, Batman, Tunceli, Muş, Bingöl, Hakkâri and Bitlis in year of 2011. These samples were from 36 dogs (33 normal, 3 autolytic), 13 cattle, 6 sheep, 6 donkeys, 4 horses, foxes, 3 wolves, 2 cats, and one goat. The samples were autolytic in 3 of 75 (4%), whereas 72 (96%) of 75 samples were freshly arrived to the laboratory. Due to badly autolysis of 3 samples, they could not be examined by fluorescent antibody test (FAT) and mouse inoculation test method (MIT). Seventy two of 75 samples were tested with both fluorescent antibody test (FAT) and mouse inoculation test method (MIT), whereas all the samples (75 of 75) were examined by optimizing real-time RT-PCR assay in which the primary for classical rabies virus and TaqMan prob set were used. Fresh brain homogenates from *Cornu ammonis* in carnivores and *Cerebellum* in herbivores were used for FAT and MIT. As a result, 51 of 72 samples were positive with FAT, 52 of 72 samples with MIT, whereas 52 of 72 were positive in real-time RT-PCR. In fresh brain samples, with MIT results in mouse brain, real time RT-PCR test results showed complete relation each other. As both fluorescent antibody test (FAT) and mouse inoculation test method (MIT) could not be applied to the autolytic samples, the real time RT-PCR assay was the only choice. Consequently, real-time RT-PCR assay could be utilized in autolytic samples conveniently as well as confirmatory to FAT in in vitro conditions.

Keywords: Rabies Diagnosis, Classical Rabies Virus, Real-Time RT-PCR



İletişim (Correspondence)



+90 424 2181834



mgurcay2000@yahoo.com

GİRİŞ

Kuduz, *Rhabdoviridae* familyasında farklı Lyssavirus türlerinin neden olduğu, insanlığın en eski ve en korkulan hastalığı olarak bilinen öldürücü enzootik bir hastalıdır. Virüs mermi şeklinde, tek ipliklikli negatif polaritede RNA taşımaktadır [1]. Karnivorlar ve yarasalar virüsün temel konakçılarıdır. İnsan ve evcil hayvanlar, enfekte olmuş hayvanların ısırması veya tükürük salgısı ile yaraların bulaşması sonucu enfeksiyona yakalanmaktadır [2].

Virüs, merkezi sinir sistemi (MSS) dışında birçok organda yayılma gösterdiği, kuduz virüsü antijeninin veya RNA'sının hayvanların tükürük bezlerinde, akciğer, böbrek, kalp ve karaciğerinde saptandığı bildirilmiştir [3]. Klasik kuduz virüsü (RABV), genotip 1 olarak da ifade edilmektedir. Antartika, Japonya, Avustralya, Hawaii, Yeni Zelanda, İngiltere gibi yerler dışında, yeryüzünün hemen her tarafında yaygın olarak bulunmaktadır [1].

İnsan ve hayvanlarda kuduzun kesin teşhisi, post-mortem laboratuvar bulgularına dayanılarak yapılmaktadır. Histolojik olarak Negri cisimciklerinin tespiti yerine, floresan antikor tekniği (FAT) rutin kullanım alanı bulmuştur. Ayrıca, deneme hayvanı inokulasyonu (MIT) ve hücre kültüründe (RTCIT) virüs izolasyonu yöntemleri de doğrulayıcı test olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerle kuduz teşhisi uzun süre gerektirmektedir. Daha sonraları, kuduz virüsü ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar ve teşhis çalışmalarında kullanılmak üzere hızlı, güvenilir ve spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemleri geliştirilmiştir [4-6]. Rutin kuduz teşhisinde, The World Organisation for Animal Health (OIE) ve World Health Organization (WHO), FAT testi ile Lyssavirus antijenlerinin tespit edilmesini, FAT testinde negatif veya şüpheli olan vakalarda teyit için MIT yapılmasını önermektedir [5].

Bu çalışma, viroloji laboratuvarına getirilen farklı hayvan türlerine ait beyin numunelerinde, kuduz hastalığını teşhis etmek için tek tüp real-time RT-PCR testinin optimize edilmesi, kullanılması, test sonuçlarının konvansiyonel

testlerle karşılaştırılması ve viroloji laboratuvarlarında kuduz hastalığının teşhisinde rutin kullanımında uygulanabilirliğini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Bu çalışmada materyal olarak Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne, 2011 yılı boyunca Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde yer alan Elazığ, Malatya, Diyarbakır, Mardin, Tunceli, Muş, Bingöl, Batman, Şırnak, Hakkâri ve Bitlis illerinden gönderilen farklı hayvan türlerine (Tablo 1) ait kuduz şüpheli beyin numuneleri kullanıldı. Kuduz virüsünün teşhisi için farklı hayvan türlerine ait 72 adet taze ve 3 adet köpeğe ait otoliz olmuş numune olmak üzere toplam 75 adet kuduz şüpheli beyin numunesi incelendi. Hayvan türlerine göre etçillerde *Cornu ammonis*, otçullarda *Cerebellum*'un farklı bölgelerinden doku parçacıkları alındı ve testler yapıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Metot

Floresan Antikor Testi (FAT)

Etçillerde *C. ammonis*, otçullarda *Cerebellum* dokularının kesit yüzü lama bastırılarak tuşe preparatlar hazırlandı ve oda ısısında kurutuldu. Kurutulmuş olan lamlar daha sonra -20°C'de aseton içinde yarım saat süreyle tespit edildi. Tespit işleminden sonra, asetonun çıkarılması için preparatlar oda ısısında 4-5 dk. bekletilerek asetonu uçuruldu. Fluorescein isotiosiyanat işaretli monoklonal anti-kuduz antikor, konjugat (Fujirebio Diagnostics, Inc. Sweden) ile boyanarak floresan mikroskopta incelendi. Filizi veya parlak yeşil floresan veren, yuvarlak veya oval şekilli merkezine doğru parlaklıkları azalan boyanma alanlarının (Negri cisimciği) görülmesi, kuduz pozitif sonuç olarak kabul edildi [5-7].

Deneme Hayvanı İnokulasyonu Testi (MIT)

Üç veya 4 haftalık en az 5-10 fareye, etçillerde *C. ammonis*

Tablo 1. Örneklenen materyallere göre tanı yöntemlerinin sonuçları

Table 1. Results of diagnostic methods according to the materials sampled

Hayvan Türü		Materyal Sayısı	Tanı Yöntemi		
			FAT	MIT	Real Time RT-PCR
Etçil Hayvanlar	Köpek	33+3*	23	24	24+1*
	Kedi	2	4	4	4
	Tilki	4	2	2	2
	Kurt	3	-	-	-
Otçul Hayvanlar	Siğir	13	12	12	12
	Koyun	6	2	2	2
	Keçi	1	1	1	1
	At	4	3	3	3
	Eşek	6	4	4	4
Toplam		72+3*	51	52	52+1*

* Otolize olmuş materyal

ve otçullarda *Cerebellum*'dan olmak üzere şüphelenilen beyin numunesinden alınan ve %20 (w/v) oranında antibiyotikli izotonik buffer solüsyonundan hazırlanan homojenat, intracerebral olarak her bir fareye 0.03 ml olacak şekilde enjekte edildi ve bu fareler 21 gün boyunca gūnaşırı olarak kuduz belirtileri (farelerde bacaklarda gevşek paralizi, merkezi sinir sistemi semptomları ve ölüm) gösterip göstermedikleri yönünden kontrol edildi. Semptom göstererek ölen farelerin beyin dokusundan hazırlanan preparatlarda FAT boyama ile viral antijenlerin olup olmadığı yönünden incelendi [5,7].

Real-Time RT-PCR Testi

Beyin doku örnekleri steril koşullarda hassas terazide tartılıp MagNA Lyser doku homojenizatöründe parçalandı. Qiagen RNeasy Mini Kit 250 (Qiagen, Hilden, Almanya, Cat No 74106) [8] kullanılarak kit prosedürüne uygun RNA izolasyonları yapıldı. Ekstrakte edilen RNA 50 µl RNase- ve DNase-enzimleri içermeyen su ile sulandırıldı. Elde edilen RNA'lar daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

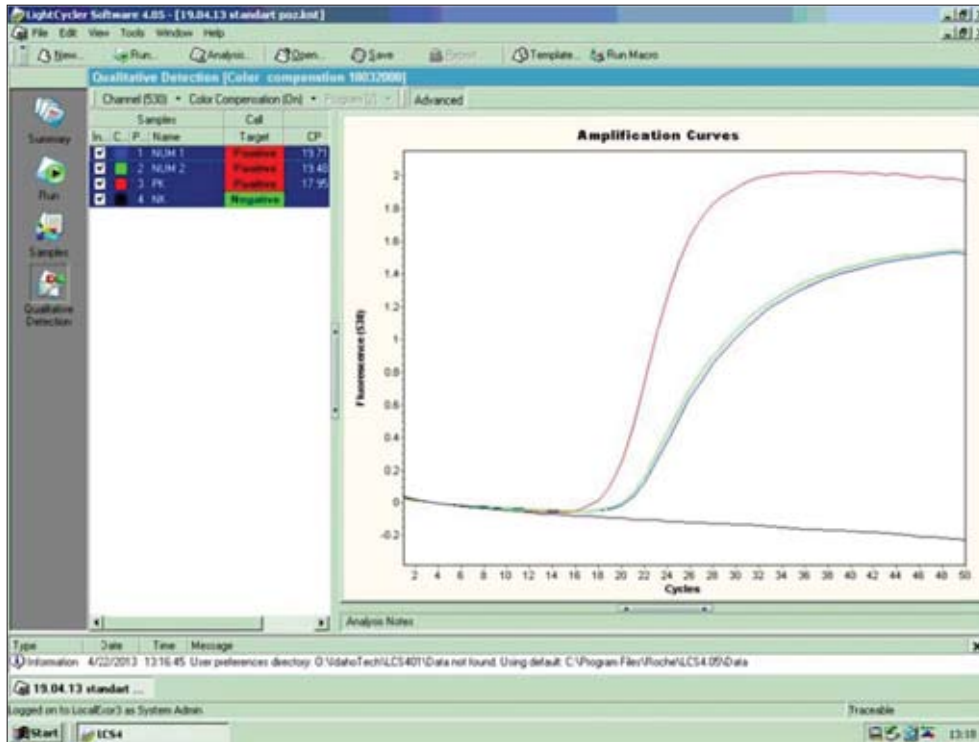
Klasik Kuduz Virusu oligonükleotid primer ve TaqMan prob dizinleri Hoffmann ve ark.'larının [9] bildirdiği şekilde hazırlandı. Real-time RT-PCR testi, One-Step RT-PCR kit (Kat No:210212, Qiagen, Hilden, Almanya) ile 20 µl reaksiyon hacminde tek tüpte gerçekleştirildi [9]. PCR reaksiyon hacimleri, SDW 7.4 µl, 5X buffer 4 µl, MgCl₂ 1 µl, dNTP 0.8 µl, Enzim 0.8 µl, Primer R (5pmol/ul) 1 µl, Primer F (5 pmol/ul) 1 µl, Prob (5 pmol/ul) 1 µl olmak üzere toplam 17 µl mix, 3 µl kontrol RNA veya örnek RNA konularak 20

µl LC kapillerlere konuldu. Hazırlanan kapillerler, 3.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Daha sonra Light Cyclers 2.0 (Roche Diagnostics Corporation, USA) cihazına konularak 50°C'de 30 dk. bekletildi ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. İlk denatürasyon 95°C'de 15 dk. bekletilerek, takip eden 45 siklus için ısıtma ve soğutma programı 95°C'de 25 sn, 55°C'de 25 sn ve 72°C'de 25 sn süreyle gerçekleştirildi. Threshold cycle number (Ct) değerleri ile sonuçların değerlendirilmesi, Real-time TaqMan RT-PCR cihazının kantitatif tespit programı ile yapıldı. 18-35 değerleri arasında Ct değeri gösteren numuneler pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 1).

FAT, MIT ve real-time RT-PCR testleri için pozitif ve negatif kontrol standart numuneleri, Etlik Veteriner Kontrol Merkez Enstitüsü Ulusal Kuduz Referans Laboratuvarından elde edildi. Kontrollerde, negatif standartta FAT'da herhangi bir floresan ışımaya gözlenmedi; MIT'nda 21. gün sonunda ölüm gözlenmedi; real-time RT-PCR'da amplifikasyon eğrisi görülmedi. Pozitif standartta FAT yönteminde filizi veya parlak yeşil floresan ışıldamalar gözlemlendi; MIT testinde 9. günden sonra farelerde klinik belirtiler ve ölüm görüldü. Ölen farelerin beyinlerinden yapılan FAT testinde, filizi veya parlak yeşil floresan ışıldamalar gözlemlendi. Real-time RT-PCR testinde ise amplifikasyon eğrisi görüldü.

BULGULAR

Bu çalışmada 2011 yılı içerisinde, Türkiye'nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde bulunan değişik iklim



Şekil 1. Real-Time RT-PCR test amplifikasyon eğrileri
Fig 1. Amplification curves of Real-Time RT-PCR test

ve coğrafik şartlara sahip 11 ilden rutin kuduz teşhisi için laboratuvara gelen 75 beyin numunesinden hazırlanan homojenatlar analiz edildi.

Real-time RT-PCR test sonucunda numunelerin 53/75 kuduz virusuna ait spesifik viral RNA tespit edildi. Bu örneklerin üç tanesi otoliz olduğundan, FAT ve Fare Virüs İzolasyonu testi yapılamadı. Otoliz olmuş 3 adet köpek beyni numunesinden sadece birinde viral nükleik asit tespiti yapıldı. Taze beyin numunelerinde, direkt FAT testi ile beyin dokularının 51/72 viral antijenler tespit edilebilirken, MIT testi sonucunda dokuların 52/72 virüs izolasyonu gerçekleştirildi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Hayvanlarda görülen kuduz Türkiye'de toplum sağlığını tehdit etmeye devam etmektedir [10,11]. Hızlı, doğru ve güvenilir teşhis, kuduz hayvanlarla temasta bulunmuş insanlar için oldukça önemlidir. Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarına teşhis amacıyla doku numuneleri kabul edilmektedir. Bazen bu numuneler otoliz olmuş olarak laboratuvarımıza gelmektedir. Klasik kuduz teşhisinde, kokuşmuş numunelere OIE ve WHO'nin önerdiği direkt FAT testi uygulanamamakta, bunun yerine moleküler tekniklere [12,13] ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda kuduzun rutin teşhisinde moleküler metotların kullanımında önemli gelişmeler olduğunu bildiren araştırmacılar [1,9], real-time RT-PCR testinin, FAT ve MIT gibi klasik metotlara iyi bir alternatif olduğunu bildirmişlerdir. Bu metotlar pahalı ekipman ve uzmanlaşmış personel gerektirmesine rağmen, 3-4 saat gibi kısa bir sürede teşhis imkanı sağlamaktadır. Bu çalışmada, klasik kuduz virüsünün teşhis edilmesi amacıyla postmortem beyin numunelerine FAT ve MIT gibi konvansiyonel testlere ilaveten, tek tüp real-time RT-PCR testi uygulandı. Kuduz hastalığının teşhisinde tek tüp real time RT-PCR testinin laboratuvarında optimize edilmesi, sonuçlarının konvansiyonel testlerle karşılaştırılması ve laboratuvarında rutin kullanımına uygunluğunun belirlenmesi amaçlandı.

Postmortem kuduz teşhisinde FAT, kuduz teşhisinde çok yaygın kullanılmakta ve OIE ile WHO tarafından da önerilmektedir [5]. Ancak FAT testi ile mikroskopta antijen varlığının belirlenmesinde, personel deneyiminin olmadığı durumlarda yanlış sonuçlar da alınabilmektedir [14]. Tespit edilmemiş doku numunelerinde Seller's metotla boyama ile kuduz teşhisi bir saatten az sürerken, tespit edilmiş dokulardan, histolojik testlerle kuduz teşhisi, üç günde yapılabilmektedir. Seller's metodunun, çok düşük sensitivitesinden dolayı terk edilmesi gerektiği de bildirilmektedir [15]. FAT aynı zamanda direkt doku numunelerine de uygulanabilmekte ve bu metotla kuduz virüsü antijen varlığı araştırılmaktadır. FAT testi, taze beyin numunelerinin %95-99'unda 1-2 saat içerisinde güvenilir sonuç vermektedir. MIT, doku süspansiyonunda, infektiviteyi tespit etmek için yapılmaktadır. FAT testinde şüpheli ve negatif sonuç

alınan durumlarda ise, hücre kültürü yapılarak veya MIT testi uygulanarak teşhisin tamamlanması gerekmektedir. Ancak MIT testi, OIE ve WHO tarafından doğrulayıcı test olarak önerilmesine rağmen oldukça pahalı ve fare beyninden virüs izolasyonu için uzun bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır. MIT testinde kuduzla ilgili ölümler en erken inokulasyondan sonraki 9. günden sonra başlamaktadır. Ayrıca, hayvan deneyleri etik kuralları gereği yaşama saygı ilkesi her tür hayvan için geçerli kabul edildiğinden, invitro teşhis metotlarının, zorunlu olmadıkça hayvan deneylerine dayalı invivo teşhis metotlarına tercih edilmesi önerilmektedir [16]. Rutin klasik kuduz teşhisinde kullanılan Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu (RTCIT) yönteminde ise canlı hayvan kullanılmamakta olup, aynı zamanda hem MIT testi kadar duyarlı olduğu ve hem de daha ucuz ve daha hızlı sonuç verdiği bildirilmektedir [5]. Buna karşın, postmortem kuduz hastalığının rutin teşhisinde, adı geçen konvansiyonel testler karşısında çabukluğu, sensitivitesinin yüksekliği ve güvenilirliği ve kısa sürede sonuç alma gibi nedenlerden dolayı, moleküler teşhis metotlarından PCR ve real-time RT-PCR testlerinin daha çok tercih edildiği görülmektedir [15,17,18]. Bu çalışmada, rutin kuduz teşhisinde, saha şartlarında laboratuvara ulaştırılan 75 numunenin tamamına tek tüp real-time RT-PCR testi uygulanmış ve 3-4 saat gibi kısa bir sürede sonuçlar alınmıştır.

Doku kültüründe virüs izolasyonu testi ve MIT test sonuçları ile real-time RT-PCR testi sonuçlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada [17] real-time RT-PCR testinin daha duyarlı olduğu tespit edilmiş ve alt yapısı sağlanmış laboratuvarlarda real-time RT-PCR testinin kuduz teşhisinde klasik testleri tamamlayacak bir yaklaşım olacağını belirtilmiştir. Dantas ve ark.[13] tarafından yapılan bir çalışmada da, attan elde edilmiş bir beyin numunesinde FAT ile negatif sonuç alınmasına rağmen, MIT ve RT-PCR testinde pozitif sonuç alındığı bildirilmektedir. Çalışmamızda, FAT ile negatif bulunan Diyarbakır Dicle'den gelen bir köpek beyni numunesi, MIT ve tek tüp real-time RT-PCR testlerinde pozitif bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen bu bulgu, Dantas ve ark.'ları [13] tarafından yapılan çalışmadan elde edilen sonuçla benzerlik göstermektedir. Real-time RT-PCR ile MIT'in karşılaştırıldığı Wakeley ve ark.[1] yaptığı başka bir çalışmada da, pozitif numunenin 1/128 sulandırmasında FAT testi ile pozitiflik bulunmadığı halde, real time RT-PCR ve MIT testlerinde pozitiflik bulgusu elde edilmiştir. Düşük konsantrasyonda antijen bulunan numunelerde FAT testi ile sonuç alınamayan durumlarda, real-time RT-PCR testi ile sonuç alınmıştır. Bu nedenle araştırmacılar, kuduz hastalığının hızlı, doğru ve güvenilir teşhisi için, real-time RT-PCR testinin yararlı ve duyarlı bir metot olarak kuduz teşhis laboratuvarlarında rutinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir [19,20].

Klasik kuduz virüsünün teşhisi için real-time RT-PCR testi optimizasyonu sağlamak için Hoffmann ve ark.[9] tarafından yapılan bir çalışmada, labratuvar standartları sağlandıktan sonra klasik kuduz virüsünü teşhis etmek

için, RT-PCR testinin ve özelliklede real-time TaqMan RT-PCR testinin otoliz olmuş numunelerde teşhis amaçlı kullanılabileceği gibi tam potansiyel doğrulayıcı teşhis metodu olarak da kuduz teşhis laboratuvarlarında kullanılabileceğini önermektedirler. Bu çalışmamızda da, otoliz olmuş şekilde laboratuvarımıza ulaşmış 3 adet köpek numunesine FAT ve MIT testi uygulanamazken, yapılan tek tüp real-time RT-PCR testi sonucunda da bu numunelerin birinde pozitif sonuç elde edilmiştir.

Sonuç olarak, evcil ve yabani hayvanlarda görülen kuduz hastalığı, Türkiye’de toplum sağlığını ciddi manada tehdit etmektedir. Kuduz hastalığında hızlı ve doğru teşhisi, şüpheli hayvanlarla temas sonucu ^[10,11] oluşabilecek hastalık riskini azaltma açısından da önemlidir. Saha şartlarında değişik iklim ve coğrafik şartlara bağlı olarak bazan otoliz olmuş olarak laboratuvara ulaşan beyin numunelerine OIE ve WHO’nin önerdiği FAT ve MIT testleri uygulanmamaktadır. Bu çalışma ile altyapısı kurulmuş laboratuvarlarda tek tüp real-time RT-PCR testinin kuduz hastalığının hızlı ve güvenilir teşhisinde rutinde kullanılabileceği, FAT ve MIT testlerinin yapılmasına uygun olmayan kokuşmuş numunelerde uygulanabileceği, böylece oluşabilecek belirsizliğin ortadan kalkmasının sağlanacağı ve sonuçlarının MIT testi ile %100 uyum göstermesinden dolayı FAT testi sonuçlarını doğrulamak için alternatif doğrulayıcı bir test olarak rutinde kullanılabileceğinin daha güvenilir olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Wakeley PR, Johnson N, McElhinney LM, Marston D, Sawyer J, Fooks AR:** Development of a real-time, Taqman reverse transcriptase-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *J Clin Microbiol*, 43, 2786-2792, 2005.
2. **Singh CK, Sandhu BS:** Rabies in South Asia: Epidemiological investigation and clinical perspective. *Dev Biol*, 131, 133-136, 2008.
3. **Luiz FPV, Sílvia RFG, Pereira AC, Galante JG, Castilho RN, Oliveira PEB, Ivanete K:** Detection of rabies virus nucleoprotein-RNA in several organs outside the Central Nervous System in naturally-infected vampire bats. *Pesq Vet Bras*, 31 (10): 922-925, 2011.
4. **Ün H, Alkan F:** Kuduz hastalığının teşhisinde polimeraz zincir reaksiyonu. *J Etlik Vet Microbiol*, 15 (1-2): 1-13, 2004.
5. **The World Organisation for Animal Health (OIE):** Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6th ed., 304-322, OIE, Paris, 2008.
6. **Mani RS, Madhusudana SN:** Laboratory diagnosis of human rabies: Recent advances. *Sci World J*, 11, 2013. DOI: 10.1155/2013/569712
7. **Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P:** The fluorescent antibody test. **In**, Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H (Eds): Laboratory Techniques in Rabies. 88-95, World Health Organization, Geneva, 1996.
8. **Dopoza CP, Barja JL:** Diagnosis and identification of IPNV in salmonids by molecular methods. **In**, Cunningham CO (Ed): Molecular Diagnosis of Salmonid Disease. 23-48, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2002.
9. **Hoffmann B, Freuling CM, Wakeley PR, Rasmussen TB, Leech S, Fooks AR, Beer M, Müller T:** Improved safety for molecular diagnosis of classical rabies viruses by use of a TaqMan real-time reverse transcription-PCR “double check” strategy. *J Clin Microbiol*, 48 (11): 3970-3978, 2010.
10. **Gürçay M:** Doğu Anadolu Bölgesinde bazı illerde (Elazığ, Malatya, Tunceli, Bingöl, Muş) 1996-1999 yıllarında görülen kuduz olguları. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 8 (2): 153-156, 2002.
11. **Un H, Johnson N, Vos A, Muller T, Fooks AR, Aylan O:** Genetic analysis of four human rabies cases reported in Turkey between 2002 and 2006. *Clin Microbiol Infect*, 15 (12): 1185-1189, 2009.
12. **Heaton PR, Johnstone P, McElhinney LM, Cowley R, O’Sullivan E, Whitby JE:** Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J Clin Microbiol*, 35 (11): 2762-2766, 1997.
13. **Dantas JV, Kimura LMS, Ferreira MSR, Fialho AM, Almeida MMS, Grégio CRV, Romijn PC, Leite JPG:** Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rabies virus detection. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 56 (3): 398-400, 2004.
14. **Chhabra M, Mittal V, Jaiswal R, Malik S, Gupta M, Lal S:** Development and evaluation of an *in vitro* isolation of street rabies virus in mouse neuroblastoma cells as compared to conventional tests used for diagnosis of rabies. *Indian J Med Microbiol*, 25, 263-266, 2007.
15. **Shankar BP:** Advances in Diagnosis of Rabies. *Vet World J*, 2 (2): 74-78, 2009.
16. **Anonim:** Başbakanlık Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Ait Yönetmelik. *Resmi Gazete* 26220, Tarih: 06.07.2006.
17. **Panning M, Baumgarte S, Pfeufferle S, Maier T, Martens A, Drosten C:** Comparative analysis of rabies virus reverse transcription-PCR and virus isolation using samples from a patient infected with rabies virus. *J Clin Microbiol*, 48 (8): 2960-2962, 2010.
18. **Aravindh Babu RP, Manoharan S, Ramadass P, Chandran NDJ:** Evaluation of RT-PCR assay for routine laboratory diagnosis of rabies in post mortem brain samples from different species of animals. *Indian J Virol*, 23 (3): 392-396, 2012.
19. **Dandale M, Singh CK, Ramneek V, Deka D, Bansal K, Sood NK:** Sensitivity comparison of nested RT-PCR and TaqMan real time PCR for intravitam diagnosis of rabies in animals from urine samples. *Vet World*, 6 (4): 189-192, 2013.
20. **Fischer M, Wernike K, Freuling CM, Müller T, Aylan O, Brochier B, Cliquet F, Vázquez-Morón S, Hostnik P, Huovilainen A, Isaksson M, Kooi EA, Mooney J, Turcitu M, Rasmussen TB, Revilla-Fernández S, Smreczak M, Fooks AR, Marston DA, Beer M, Hoffmann B:** A step forward in molecular diagnostics of Lyssaviruses - Results of a ring trial among European laboratories. *PLOS One*, 8 (3): 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0058372