

VİRAL HASTALIKLARIN TEŞHİSİNDE İMMUNOPEROKSİDAZ

M. Çabalar¹

Y. Akça²

Immunoperoksidase in the diagnosis of viral disease.

Summary: *Immunoperoxidase assay is an alternative method for identifying antigen and antibody, used in cell culture and histopathology studies an enzyme-labeled antibody. In this method, enzyme conjugated antibodies generate insoluble colored products reacting with chemical substrate. This enzymatic reaction can be visualized by naked eye or by both of light and electron microscope.*

Özet: *Immunoperoksidaz testi gerek histopatolojik gerekse hücre kültürü çalışmalarında histo-kimyasal olarak antijen yada antikor tespitine yönelik olarak kullanılan alternatif bir yöntemdir. Bu yöntemde, enzimle konjuge edilen reaktifler substrat ile reaksiyona girerek renkli ürünler meydana getirmektedir. Bu enzimatik reaksiyon gözle yada basit bir ışık mikroskobu veya Elektron mikroskop ile değerlendirilebilmektedir.*

Giriş

Enfeksiyöz hastalıkların tanısında, özellikle viruslar ve yavaş çoğalan bakterilerin kültürlerde üretilmeleri için uzun zamana ihtiyaç duyulduğundan, direkt etken izolasyonu ve identifikasyonu yanısıra, Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI), İndirekt Hemaglutinasyon İnhibisyon (IHA), Agar jel presipitasyon (AGP), Komplement Fiksasyon (KF), İmmunoelektroforez (IE) gibi çok sayıda serolojik yöntem geliştirilmiştir (27).

Coons ve ark. (14) 1940 yılında fluorescein isothiocyanate ile işaretli antikorlar kullanarak dokular içindeki antijenleri göstermeyi başarmışlardır. Berenbaum 1958 yılında antikorları radyoaktif

¹ Dr., Yüzüncü Yıl Ü., Veteriner Fakültesi, Viroloji Bilim Dah., Van.

² Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Viroloji Bilim Dah., Ankara.

maddelerle işaretlemiş, Nakane ve Pierce'de 1966 yılında antikorların enzimlerle işaretlenebileceğini savunmuşlar ve denemelerinde başarılı olmuşlardır. Enzimlerle işaretleme yönteminde antijen-antikor reaksiyonu sonucu katı faza bağlanan enzim işaretli reaktiflerden yararlanılmaktadır. Değerlendirme enzim ile substratın oluşturacağı renk reaksiyonuna göre yapılıp, ortaya çıkan renkli ürünlerin miktarı, enzim işaretli reaktiflerin ve dolayısıyla katı faza bağlanan antijen veya antikor miktarını belirlemektedir (17, 27). Fluorescein isothiocyanate ile yapılan çalışmalarda özel mikroskoplara ihtiyaç duyulması, fluoresan maddelerin zamanla aktivitelerini kaybetmeleri, ayrıca dokularda bulunan otofluoresan özelliğın değerlendirilmeyi güçleştirmesi nedeniyle, bu yöntemle sonuçların değerlendirilmesi subjektiftir (10, 24). Radyoaktif maddeler ile işaretli reaktiflerden yararlanılarak kullanılan Radioimmunoassay (RIA)'in ise objektif bir tanı yöntemi olmasına rağmen, radyoaktif maddelerin yarılanma süreleri, sonuçların değerlendirilmesinde gama sayıcıları gibi özel aygıtların gerekliliğı ve daha da önemlisi radyoaktif madde kullanımının sakıncaları bu duyarlı yöntemin olumsuz taraflarıdır (13, 27). Enzimlerle işaretleme yönteminde, enzim işaretli reaktifler uzun süre saklanabilmekte, sonuçlar beliren renklenmenin şiddetine göre değerlendirilmekte ve direkt göz, basit bir ışık mikroskopu yada kolorometre ile antijen veya antikoron tespiti yapılabilmektedir (17, 24, 27). Bu üstünlükleri nedeniyle virus, bakteri, mantar, parazit antijenleri ve antikorları yanında, immunoglobulinler, serum proteinleri, tümör antijenleri gibi çeşitli maddelerin araştırılmasında enzimle işaretleme yönteminden yararlanılmaktadır (2, 7).

İmmunoperoksidaz yöntemi, enzimlerle işaretli reaktiflerin oluşturdukları antijen-antikor kompleksinin histokimyasal olarak incelenmesi esasına dayanır (2, 3, 4, 9, 24). Gerek histopatolojik çalışmalarda gerekse doku kültürü çalışmalarında immunoperoksidaz yönteminden yararlanılmakta ve kromojenlerin meydana getirdikleri renkli ürünler ile antijen yada antikor tespitine gidilmektedir (2, 4, 12, 19, 24). Antijenlerin ultrastruktural lokalizasyonlarının saptanması amacıyla, İmmunoperoksidaz ile Elektron mikroskopi (EM) çalışmaları yapılabilmektedir (13, 24, 26). Eğer test materyalinin dilusyonları hazırlanır, görülün en son renk değişiminin oluştuğı sulandırma basamağı o test materyalinin titresidir. Hesaplama Kaerber metodu vasıtasıyla yapılır (8, 9).

Kuduzun teşhisi amacıyla yapılan bir çalışmada (1), direkt immunoperoksidaz (IP) ve fluoresan antikor tekniği (FAT) karşılaştırılmış ve birbirine paralel sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise (10), direkt IP, direkt FAT ve Sellar boyama yöntemleri kuduzun teşhisi amacıyla kullanılmış, FAT ve IP yöntemlerinin Sellar boyamadan daha duyarlı olduğu ve FAT'daki dezavantajlardan dolayı IP'nin FAT'ın yerini alabileceği savunulmuştur. Hyera ve ark. (8) Bovine viral diarrhoea (BVD) virusu nötralizan antikorlarının saptanması amacıyla Neutralizing peroxidase-linked antibody (NPLA) ve Mikro nötralizasyon testlerini (MNT) kullanmışlar ve sonuçta test edilen 425 sığır serumundan NPLA ile % 48, MNT ile % 45'inin pozitif olduğunu saptamışlardır.

İmmunoperoksidaz yönteminde aşağıda belirtilen teknikler kullanılmaktadır (2, 8, 15, 16, 1, 24).

1. Direkt yöntem
2. İndirekt yöntem
3. Peroksidaz anti-peroksidaz (PAP) yöntemi
4. Nötralizasyon immunoperoksidaz yöntemi (NPLA)
5. Avidin-Biotin immunoperoksidaz yöntemi
 - a) Direkt Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) yöntemi
 - b) İndirekt ABC yöntemi
 - c) Avidin-Biotin işaretleme yöntemi
6. İmmunoperoksidaz plak yöntemi
 - a) Direkt immunoperoksidaz plak yöntemi
 - b) İndirekt immunoperoksidaz plak yöntemi

1. Direkt Yöntem

Antijene spesifik antikorlardan yararlanarak antijen varlığının ortaya konması esasına dayanır. Bu yöntemde spesifik antikor peroksidaz ile kimyasal olarak bağlanır. Hazırlanan bu konjugat antijenle reaksiyona girerek, substratın ilavesiyle antijenin lokalize olduğu alanlarda renkli bir presipitat meydana getirir (Şekil 1). Meydana gelen rengin şiddeti örnekteki antijen miktarı ile orantılı olacaktır. Duyarlı bir yöntem olmasına rağmen, her antijen için spesifik bir antikora ihtiyaç göstermesi direkt yöntemin yaygın olarak kullanılmasını önlemekte ve indirekt yöntemin önemini artırmaktadır (1, 2, 6, 10, 24).

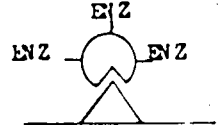
1. Antijen adsorbe edilir
(doku kültürü/doku kesiti)

YIKAMA

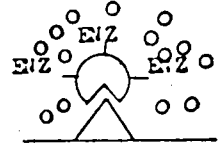


2. Enzimle işaretli spesifik antikor ilave edilir

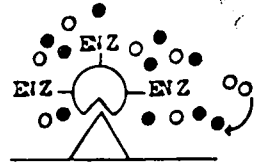
YIKAMA



3. Substrat ilave edilir



4. Inkubasyon sonunda değişen substratın değerlendirilmesi (gözle, mikroskopik)



Şekil 1. Direkt Yöntem

2. İndirekt Yöntem

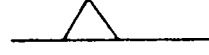
Bu yöntemde, konjuge edilmemiş antikor numunede antijene bağlanır. Reaksiyona girmeyen maddelerin yıkama işlemiyle ortamdan uzaklaştırılmasından sonra, konjuge edilmemiş antikora karşı elde edilmiş anti-antikorların işaretlenmesiyle hazırlanan spesifik konjugat ilave edilir. Konjugat ilk aşamada meydana gelen antijen-antikor kompleksindeki antikora bağlanır. Sonra bu lokalize reaksiyona substrat ilave edilir (Şekil 2). Meydana gelen rengin şiddeti örnekteki antijen miktarı ile orantılıdır (2, 6, 24).

3. Peroksidaz Anti-Peroksidaz (PAP) Yöntemi

Bu yöntemde primer antikor, sekonder antikor ve PAP kompleks olmak üzere 3 reaktife ihtiyaç vardır. Primer antikor direkt olarak antijene bağlanır. Yıkama işleminden sonra sekonder antikor ilave

1. Antijen adsorbe edilir
(doku kültürü/doku kesiti)

YIKAMA



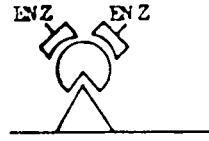
2. Spesifik antikor kapsayan serum
ilave edilir

YIKAMA

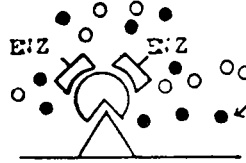


3. Konjugat ilave edilir

YIKAMA



4. Substrat ilave edilerek değerlendirme
yapılır(gözle, mikroskopik)



Şekil 2. İndirekt Yöntem

edilir. Sekonder antikor (bağlayıcı antikor), primer antikor ve PAP kompleksi birbirine bağlar. Tekrar yıkama işleminden sonra PAP kompleks ve daha sonra da substrat ilave edilir. Test sonunda beliren rengin şiddeti numunedeki antijen miktarı ile orantılıdır (Şekil 3). Duyarlı olması ve enzim ile işaretli reaktiflere gerek olmaması bu yöntemin üstünlükleridir (2, 3, 4, 6, 11, 13, 24).

4. Avidin-Biotin İmmunoperoksidaz Yöntemi

Avidin-Biotin ilişkisine dayanan bu yöntem, bir vitamin olan biotinün 4 molekülünün, glikoprotein olan avidin ile nonimmunolojik olarak birleşmesi esasına dayanır (2, 5, 21, 22).

a) Direkt Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (ABC) yöntemi

Bu yöntemde biotinle işaretli antikor direkt olarak antijene bağlanır. Reaksiyona girmeyen maddelerin yıkama ile ortamdan uzaklaştırılmasından sonra, avidin-biotin peroksidaz kompleks (ABC) ilave edilir. Substrat ilavesiyle antijenin lokalize olduğu alanlar görünür hale gelir (2, 5, 21, 22).

1. Antijen adsorbe edilir
(doku kültürü/doku kesiti)

YIKAMA

2. Primer antikor ilave edilir

YIKAMA

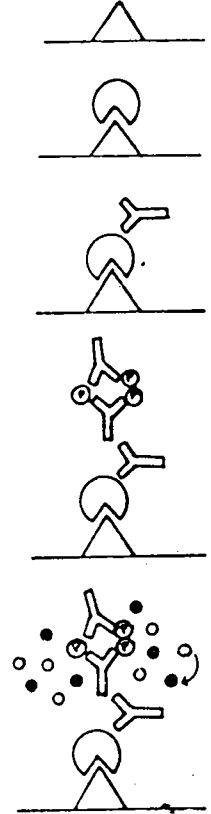
3. Sekonder antikor ilave edilir

YIKAMA

4. PAP kompleks ilave edilir

YIKAMA

5. Substrat ilave edilerek değerlendirme yapılır (gözle, mikroskopik)



Şekil 3. Peroksidaz-Antiperoksidaz Yöntemi (PAP)

b) *İndirekt ABC yöntemi*

İndirekt ABC yöntemi 3 reaktife ihtiyaç gösterir. Lokalize olan antijen için spesifik primer antikor direkt olarak antijene bağlanır. Yıkama işleminden sonra biotinle konjuge edilmiş sekonder antikor ve bunu takiben de ABC ilave edilir Daha sonra substrat ilave edilerek değerlendirme yapılır (Şekil 4) (2, 5, 21, 22).

c) *Avidin-Biotin İşaretleme yöntemi*

Bu yöntemde biotinle işaretlenmiş antikor direkt olarak antijene bağlanır. Yıkama işleminden sonra enzimle konjuge edilmiş avidin ilave edilir. Substrat ilavesiyle lokalize reaksiyon görünür hale getirilir (Şekil 5) (2, 21).

1. Antijen adsorbe edilir
(doku kültürü/doku kesiti)

YIKAMA

2. Primer antikor ilave edilir

YIKAMA

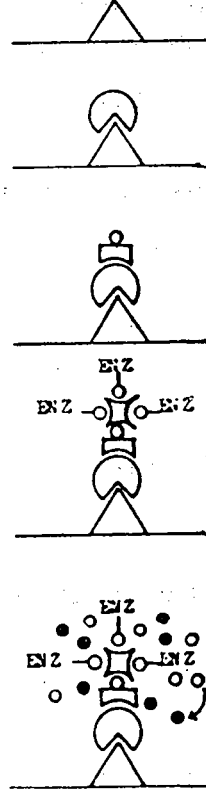
3. Biotinle işaretli antikor ilave edilir

YIKAMA

4. Avidin-biotin peroksidaz kompleks ilave edilir

YIKAMA

5. Substrat ilave edilerek değerlendirme yapılır(gözle, mikroskopik)



Şekil 4. İndirekt ABC Yöntemi

5. Nötralizasyon İmmunoperoksidaz Yöntemi (NPLA)

Bu yöntemin esası, bilinen antijen ile şüpheli serumun nötralizasyona bırakıldıktan sonra, nötralizasyonun meydana gelip gelmediğinin immunoperoksidaz ile kontrol edilmesidir. Testin ilk aşaması olan nötralizasyondan sonra, bilinen virus ile şüpheli serum dilusyonları hücre kültürüne inokule edilir. Daha sonra bu hücre kültürü antijene spesifik konjugatla karşılaştırılır ve substrat ilavesiyle renkli ürünlerin meydana gelip gelmediğinin kontrolü yapılır (Şekil 6) (8, 25).

Renkli ürünler meydana gelmiş ise, şüpheli serum bilinen virusa karşı spesifik antikor taşımamaktadır ve virus peroksidaz ile işaretli antikorla birleşmiş demektir.

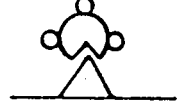
1. Antijen adsorbe edilir
(doku kültürü/doku kesiti)

YIKAMA



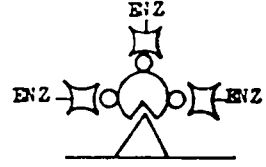
2. Biotinle işaretli antikor ilave edilir

YIKAMA

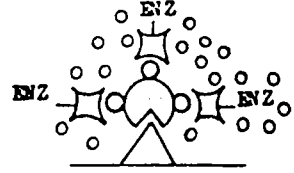


3. Peroksidaz enzimi ile işaretli avidin ilave edilir

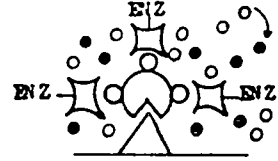
YIKAMA



4. Substrat ilave edilir



5. Inkubasyon sonunda değişen substratın değerlendirilmesi (gözle, mikroskopik)



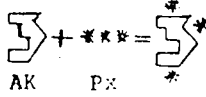
Şekil 5. Avidin-Biotin İşaretleme Yöntemi

Renkli ürünler meydana gelmemiş ise, şüpheli serum bilinen virusa karşı spesifik antikor taşımaktadır ve bu antikorlar antijen ile birleştiğinden, peroksidaz ile işaretli antikorlar antijenle birleşmemiş demektir.

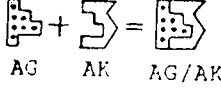
6. Immunoperoksidaz Plak Yöntemi

Hücre kültüründe, yarı katı vasatın etkisiyle, enfeksiyon yerinde lokalize olarak çoğalan virusun immunoperoksidaz yöntemi ile gösterilmesi esasına dayanır (13, 15, 20).

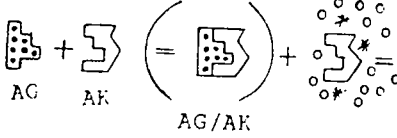
Konjugat, peroksidaz ile
işaretli antikor,



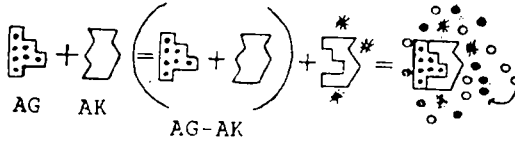
Normal antijen-antikor
reaksiyonu



NPLA (+)
BEKLEME



NPLA (-)
BEKLEME



Şekil 6. NPLA YÖNTEMİ

a) *Direkt immunoperoksidaz plak yöntemi*

Bu yöntemde petrilere üretilen hücre kültürlerine virus sulandırmasından inokule edilir ve inkubasyona bırakılır. İnkubasyon sonunda kültür vasatı uzaklaştırılır ve her bir petriye vasat + agaroz karışımı hücre üzerine yayılarak donuncaya kadar bekletilir. Petriler içindeki donmuş agaroz 3-4 gün sonra hücreye zarar vermeden uzaklaştırılır. Fikzasyonu takiben ilave edilen konjugat antijenle reaksiyona girecek ve substratın ilavesiyle virusun lokalize olduğu alanlarda sınırlı ve renkli üreme odakları görülecektir (13, 20).

b) *İndirekt immunoperoksidaz plak yöntemi*

Bu yöntemde ilk aşamada antijen pleytleri hazırlanır. Bunun için önce pleytlerde hücre üretilir. Sonra virus inokule edilerek inkubasyona bırakılır. İnkubasyon sonrası hücre üzerine agaroz dökülür ve 4-5 gün sonra agaroz hücreye zarar vermeden uzaklaştırılır. Fikzasyondan sonra pleytler kullanılana kadar -70°C 'de 12 ay süre ile muhafaza edilebilir. Gerektiğinde pleytler dondurucudan çıkarılır, çözülür ve şüpheli serum ilave edilerek inkubasyona bırakılır. İnkubasyon sonrası konjugat, daha sonra da substrat solusyonu ilave edilerek değerlendirme yapılır. Bu yöntem, hücre kültürüne adapte edilebilen ve üretilen virüslerle uygulanabilmektedir (16).

İmmunoperoksidaz yönteminin kullanımında çeşitli maddeler testin duyarlılığında rol oynamaktadır. Bunlar,

Konjugat

Konjugatın hazırlanmasında enzim (horseradish peroxidase: HRP), enzime doğal kurucu (işaretlenecek antikor yada antijen) ve bağlanma için kullanılacak kimyasal maddeye (gluteraldehid, benzokinin) ihtiyaç vardır. Bağlanmada kullanılan maddeler aracılığı ile enzim ve immunoreaktiflerin (antikor, antijen) kovalent bağlanmaları sonucunda konjugat elde edilir. Bir enzim molekülü çok sayıda substrat molekülü ile reaksiyona girerek renkli ürünler oluşturur. Bu nedenle enzimle işaretli reaktiflerin (konjugat) özellikleri test sonucunu etkilediğinden, kullanılan enzimlerin kolay hazırlanabilmeleleri, stabil ve yüksek aktiviteye sahip olmaları gerekir (5, 24, 27).

Peroksidaz

Peroksidaz 40.000 molekül ağırlığında bir hemaglikoproteindir. Peroksidazın küçük hacimli olması, pahalı olmaması ve çok stabil olması kullanımını cazip hale getirmektedir. Konjugasyon sonunda peroksidazın aktivitesinde kayıp da az olmaktadır. Peroksidazın kullanımındaki dezavantajı ise spesifik substratlarının kansorejen özelliğe sahip olmalarıdır. Peroksidaz bitkisel dokularda bulunur ve başlıca kaynağı yabancı turbdur (2, 26).

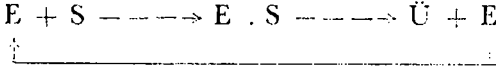
Avidin-Biotin

Konjugasyon sırasında reaktifin ve enzimin substratı bağlama bölgelerinin bir bölümünde blokasyon meydana gelir. Bu durum konjugatın immunolojik ve enzimatik aktivitesinde kayıplara neden olur. Bu tip aktivasyon kayıplarını önleyen kofaktör sistemler geliştirilmiştir. En çok kullanılan Avidin-Biotin sistemidir. Biotin molekül ağırlığı 244 olan bir monokarboksilik asittir. Birçok mikroorganizma ve bitki yaprakları tarafından sentezlenir. Yumurta bol miktarda biotin içerir. Avidinin ise molekül ağırlığı 70.000 olup, birbirine benzeyen 4 alt birimden oluşmuştur. Her alt birim bir biotini bağlayabilir. Avidin çiğ yumurta akında bulunan bazik bir glikoproteindir (2, 5, 21).

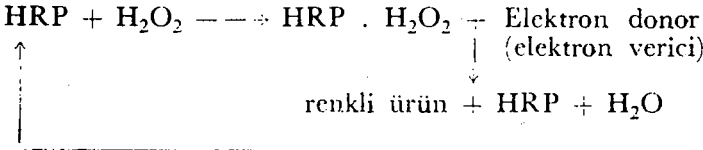
Substrat Solusyonları

Substratlar enzimlerle reaksiyona girerek immun kompleksin varlığını ortaya koyan maddelerdir. Enzimler substratı ürüne dönüş-

türerek katalizör görevi yaparlar. Enzim (E), Substrat (S), Ürün (Ü) ile gösterilirse,



Enzim-substrat reaksiyonu ortamdaki enzim miktarına bağlıdır. Enzim (peroksidaz) tükenmez ve substratın (H_2O_2) diğer molekülleri ile tekrar reaksiyona girerek daha çok renkli ürün meydana getirirler. Tek bir Horseradish peroxidase (HRP) enzim molekülü bir dakikada substratın 100.000 molekülü ile reaksiyona girerek gözle görülebilen ürün meydana getirebilmektedir (2, 24).



Enzim reaksiyonunda elektron donör olarak kullanılan birkaç renk verici madde (kromojen) vardır (Tablo 1) (2, 4, 8, 9, 24).

Tablo 1. Substrat solusyonları ve oluşturdukları renkler.

Enzim	Substrat solusyonu	Renk
Peroksidaz	3,3 diaminobenzidin tetrahydrochloride (DAB) + H_2O_2	Kahverengi
	3-amino 9-ethy/ carbazole (AEC) + H_2O_2	Kırmızı
	4-chloro 1-naphtol (Chloro-Naphtol) + H_2O_2	Mavi
	P-phenylenediamine dihydrochloride / pyrocatechol (Hanker-Yates) + H_2O_2	Mavi-Siyah
	Orthotolidine (O-tolidine) + H_2O_2	Mavi

Sonuç

Bu derlemede özellikle viral hastalıkların teşhisinde bütün dünyada laboratuvar tanı yöntemi olarak kullanılan immunoperoksidaz testi ile ilgili farklı teknikler incelenmiş ve bunların uygulanabilirlikleri tartışılmıştır. Ayrıca immunoperoksidaz yöntemi diğer tanı yöntemleri ile de karşılaştırılmıştır.

Kaynaklar

1. Anjaria, J.M., Jhala, C.I. (1985). *Immunoperoxidase reaction in diagnosis of rabies*. Int. J. Zoon., 12: 267-275.
2. Bourne, J.A. (1983). *Handbook of immunoperoxidase staining methods*. Immunochemistry Laboratory. Dako Corporation.
3. Cherrington, J.M., Ghalib, H.V., Sawyer, M.M., Osburn, B.I. (1985). *Detection of viral antigens in bluetongue virus infected ovine tissue using the peroxidase-antiperoxidase technique*. Am. J. Vet. Res., 46: 2356-2359.
4. Gimeno, E.J., Nosetto, E.O., Martin, A.A., Galois, C.M., Ando, Y., Etcheverrigaray, M.E. (1987). *Demonstration of Equine Herpes Virus (EHV-1) in histological section and tissue cultures by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique*. J. Vet. Med., 34: 740-742.
5. Guesdon, J.L., Ternynck, T., Avrameas, S. (1979). *The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques*. J. of Histochem. and Cytochem., 27 (8):1131-1139.
6. Hyderman, E. (1979). *Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods and controls*. Journal of Clinical Pathology, 32:971-978.
7. Hill, A.C. (1978). *Demonstration of Mycoplasmas in tissue by the immunoperoxidase technique*. J. of inf. Disease., 137 (2): 152-154.
8. Hyera, J.M.K., Liess, B., Frey, H.R. (1987). *A Direkt Neutralizing-Peroxidase-Linked Antibody assay for detection and titration of antibodies to Bovine Viral Diarrhoea virus*. J. Vet. Med., 34: 227-237.
9. Katz, J.B., Kubeman, L., Pemberton, J., Schmerr, M.J. (1987). *Detection of bovine virus diarrhoea virus in cell culture using an immunoperoxidase technique*. Veterinary Microbiology, 13:153-157.
10. Kotwal, S., Narayan, K.G. (1985). *Direkt immunoperoxidase test in the diagnosis of rabies -an alternative to fluorescent antibody test*. Int. J. Zoon., 12 (1): 80-85.
11. Macaertney, L., Macartney, C.M. (1986). *Canine parvovirus: development of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques*. Res. Vet. Sci., 40: 201-208.

12. **Miry, C., Ducatelle, R., Thoonen, H., Hoornes, J.** (1983). *Immunoperoxidase study of canine distemper virus pneumonia*. Res. Vet. Sci., 34:145-148.
13. **Moriarty, G.C., Michael, C.M., Sternberger, L.A.** (1973). *Ultrastructural immunocytochemistry with unlabeled antibodies and the peroxidase-antiperoxidase complex. A technique more sensitive than radioimmunoassay*. J. Histoche. and Cytoche., 21(9): 825-833.
14. **Özcel, M.A.** (1978). *Immunofloresans ve parazitolojide uygulaması*, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını, No. 108., Ege Üni. Basım-evi.
15. **Pan, I.C., Huang, T.S., Hess, W.R.** (1982). *New method of antibody detection by indirekt immunoperoxidase plaque staining for serodiagnosis of African Swine Fever*. J. Clinical Microbio., 16 (4):650-655.
16. **Pan, I.C., Schimizu, M., Hess, W.R.** (1978). *African Swine Fever: Microplaque assay by an immunoperoxidase method*. Am. J. Vet. Res., 39 (3): 491-497.
17. **Piroid, R., Lombard, M.** (1980). *Les methodes immunoenzymatiques et leurs applications serologiques*. Revue Med. Vet., 131 (1): 25-42.
18. **Rai, A., Prasad, I.J.** (1980). *Immunoperoxidase technique in rapid detection of Foot and Mounth Disease virus*. Indian J. Anim. Sci., 50 (11): 957-960.
19. **Rodriguez, M., Heinlein, A.S., Ruiz, M., Metzler, A.E., Schudel, A.A.** (1989). *Detection of bovine herpesvirus type 1 via an immunoperoxidase method, using monoclonal antibodies*. Am. J. Vet. Res., 50 (5):619-621.
20. **Sanders, G.** (1991). *Charakterisierung zytopathogener und nichtzytopathogener biotypen unter Stammen / isolaten des BVD-virus in einem Immunoplaque-test*. Inaugural-Dissertation. Tierartliche Hochschule Hannover.
21. **Su-ming, HSU., Raine, L., Fanger, H.** (1981). *A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an Avidin-Biotin Complex method for studying polypeptid hormones with Radioimmunoassay antibodies*. Am. J. Clin. Pathol. 75: 734-739.
22. **Su-ming, HSU., Raine, L., Fanger, H.** (1981). *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A com-*

- parison between ABC and Unlabelad antibody (PAP) procedures. J. Histochem. and Cytochem., 29 (4): 577-580.*
23. **Sutmoller, P., Cowan, K.M.** (1974). *The detection of Foot-and Mounth-Disease virus antigens in infected cell cultures by immunoperoxidase techniques. J. Gen. Virol., 23: 287-291.*
 24. **Taylor, C.R.** (1978). *Immunoperoxidase techniques. Arch. Pathol. Lab. Med., 102:113-121.*
 25. **Terptra, C., Bloembraad, M., Gielkend, A.L.J.** (1984). *The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of antibidy against Swine Fever virus. Veterinary Microbiology 9:113-120.*
 26. **Ward, A.C.S., Kaerberle, M.L.** (1984). *Use of an immunoperoxidase stain for the demoststration of bovine viral diarhea virus by light and electron microscopies. Am. J. Vet. Res., 45: 165-169.*
 27. **Yolken, R.H., Leister, F., Whitcomb, L., Davis, D., Mears, M.J.** (1983). *Enzyme immunoassay for the diagnosis of viral infections. Ann. N.Y. Acad. Sci., 420:371-390.*