

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE  
Katedra za patološku morfologiju

mr Nikola Lj. Vasković

**KARAKTERISTIKE PROMENA,  
DISTRIBUCIJA ANTIGENA I  
EKSPRESIJA PROINFLAMATORNIH  
CITOKINA U MOZGU LISICA PRIRODNO  
INFICIRANIH VIRUSOM BESNILA**

Doktorska disertacija

Beograd,  
2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE  
Department of Pathomorphology

M.Sc. Nikola Lj. Vasković

**LESION FEATURES, ANTIGEN  
DISTRIBUTION AND  
PROINFLAMMATORY CYTOKINES  
EXPRESSION IN THE BRAIN OF FOXES  
NATURALLY INFECTED WITH RABIES  
VIRUS**

Doctoral Dissertation

Belgrade,  
2015

## **Mentor:**

**dr Milijan Jovanović, redovni profesor,**  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine,  
Katedra za patološku morfologiju

## **Članovi komisije:**

**dr Milijan Jovanović, redovni profesor,**  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine,  
Katedra za patološku morfologiju

**dr Miroslav Valčić, redovni profesor,**  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine,  
Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela

**dr Darko Marinković, docent,**  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine,  
Katedra za patološku morfologiju

**dr Vladimir Kukulj, docent,**  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine,  
Katedra za patološku morfologiju

**dr Vojin Ivetić, viši naučni saradnik,**  
Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd,  
Odeljenje za patološku morfologiju

## **Datum odbrane:**

# KARAKTERISTIKE PROMENA, DISTRIBUCIJA ANTIGENA I EKSPRESIJA PROINFLAMATORNIH CITOKINA U MOZGU LISICA PRIRODNO INFICIRANIH VIRUSOM BESNILA

## REZIME

U ovoj disertaciji ispitani su uzorci mozga 10 odraslih riđih lisica (*Vulpes vulpes*), oba pola, prirodno inficiranih virusom besnila. Za dokazivanje prisustva virusa besnila u ispitivanom materijalu korišćene su metode direktne imunofluorescencije i RT-PCR. Patohistološka i imunohistohemijska analiza izvršena je na uzorcima kore velikog mozga, hipokampusa, malog mozga i produžene moždine, koji su fiksirani u puferizovanom 10% formalinu, obrađeni u automatskom tkivnom procesoru i uklapani u parafin. Parafinski isečci debljine 4-5 $\mu$ m bojeni su hematoksilin-eozinom. Ispitivanje prisustva virusnog antigena i proinflamatornih citokina izvršeno je streptavidin-biotin (LSAB) metodom, uz upotrebu antitela za virusni antigen, interleukin 1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ) i tumor nekrotični faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). U proceni distribucije virusnog antigena po regijama mozga korišćena je semikvantitativna analiza. Morfometrijskom analizom utvrđen je broj inficiranih nervnih ćelija, a ovi podaci su obrađeni korišćenjem deskriptivnih statističkih parametara, ANOVA i Tukey testa.

Prisustvo virusa besnila dokazano je kod svih 10 ispitivanih mozgova metodom direktne imunofluorescencije i RT-PCR.

Patohistološkim pregledom ustanovljene su promene u tipu akutnog negnojnog encefalitisa, pre svega umnožavanje glija ćelija i perivaskularni infiltrati limfocita i makrofaga. Pored toga, uočene su i distrofične promene na neuronima, satelitoza, neuronofagija, endotelioza i leptomeningitis. Negrijeva tela su bila prisutna u piramidalnim neuronima kore velikog mozga i hipokampusa u 30% slučajeva.

Ekspresija virusnog antigena je dokazana u perikarionu neurona, kao i u njihovim aksonskim i dendritskim produžecima. Njegova distribucija je bila veoma široka, a najintenzivnija ekspresija zabeležena je u hipokampusu i produženoj moždini.

Ekspresija IL1- $\beta$  i TNF- $\alpha$  utvrđena je u zonama sa zapaljenskim promenama, i to u mikroglia ćelijama, makrofagima i limfocitima perivaskularnih nakupina i meke moždanice.

Uočena je direktna pozitivna zavisnost između intenziteta ekspresije citokina i stepena zapaljenskih promena.

Zavisnost između distribucije virusnog antigena i proinflamatornih citokina nije uočena.

**Ključne reči:** lisica, besnilo, prirodna infekcija, patomorfološke promene, distribucija, citokini.

**Naučna oblast:** Klinička patologija i terapija životinja

**Uža naučna oblast:** Patološka morfologija

**UDK broj:** 616.9:577:599.17

# **LESION FEATURES, ANTIGEN DISTRIBUTION AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES EXPRESSION IN THE BRAIN OF FOXES NATURALLY INFECTED WITH RABIES VIRUS**

## **SUMMARY**

In this dissertation, brain samples of 10 adult red foxes (*Vulpes vulpes*), of both sexes, naturally infected with rabies, were examined. Direct immunofluorescence and RT-PCR method were used to prove the presence of rabies virus in the examined material. Histopathologic and immunohistochemical analysis were performed on samples of the cerebral cortex, the hippocampus, the cerebellum and the medulla, which were fixed in buffered 10% formalin, processed in an automatic tissue processor, and embedded into the paraffin. Four to five  $\mu\text{m}$  thick paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin. Investigation of the presence of viral antigen and pro-inflammatory cytokines was performed with streptavidin-biotin (LSAB) method, with the use of an antibody to a viral antigen, interleukin  $1\beta$  (IL1- $\beta$ ), and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). In assessing the distribution of viral antigen by regions of the brain semiquantitative analysis was used. The number of infected neurons was determined by morphometric analysis, and these data were analyzed using descriptive statistical parameters, ANOVA and Tukey test.

The presence of rabies virus was confirmed in all of 10 examined brains by direct immunofluorescence and RT-PCR.

Histopathological examination revealed lesions characteristic for acute nonsuppurative encephalitis, primarily multiplication of glial cells and perivascular infiltrates of lymphocytes and macrophages. In addition, dystrophic changes in neurons, satellitosis, neuronophagia, endotheliosis and leptomeningitis were observed. Negri bodies were present in pyramidal neurons of the cerebral cortex and hippocampus in 30% of cases.

The expression of viral antigen has been demonstrated in neuronal perikaryon, axons and dendrites. Its distribution was very broad, and the most intense expression was observed in the hippocampus and medulla oblongata.

Expression of IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  was found in areas with inflammatory lesions, in microglial cells, macrophages and in the lymphocytes of perivascular infiltrates and leptomeninges.

Direct positive correlation between the intensity of cytokine expression and the degree of inflammatory changes was established.

The correlation between the distribution of the viral antigen and pro-inflammatory cytokines was not observed.

**Key words:** fox, rabies, natural infection, pathomorphological lesions, distribution, cytokines.

**Scientific field:** Clinical Pathology and Therapy of Animals

**Field of academic expertise:** Pathological Morphology

**UDK number:** 616.9:577:599.17

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	3
2.1. Istorijat .....	3
2.2. Etiologija .....	7
2.2.1. Morfologija virusa .....	8
2.2.2. Intracelularni životni ciklus virusa.....	17
2.2.3. Otpornost virusa na fizičke i hemijske agense .....	23
2.3. Epizootiologija .....	24
2.4. Patogeneza .....	32
2.4.1. Mehanizmi disfunkcije i smrti neurona .....	38
2.5. Klinička slika.....	40
2.5.1. Klinička slika kod pasa .....	42
2.5.2. Klinička slika kod mačaka .....	44
2.5.3. Klinička slika kod preživara .....	45
2.5.4. Klinička slika kod svinja i konja .....	46
2.5.5. Klinička slika kod divljih životinja .....	47
2.5.6. Klinička slika kod ljudi .....	48
2.6. Patomorfološke promene .....	50
2.6.1. Makroskopske promene .....	50
2.6.2. Mikroskopske promene .....	51
2.7. Dijagnostika bolesti .....	56
2.7.1. Diferencijalna dijagnostika .....	62
2.8. Imunologija .....	63
2.9. Terapija i profilaksa .....	69
2.9.1. Vakcine .....	71
2.10. Kontrola bolesti .....	75
3. CILJ I ZADACI .....	79
4. MATERIJAL I METODE .....	80
4.1. Materijal .....	80
4.2. Direktna imunofluorescencija .....	80
4.3. Lančana reakcija polimeraze RT-PCR .....	81



4.3.1. Ekstrakcija RNK .....	81
4.3.2. Izvođenje metode RT-PCR u jednom koraku (One Step).....	81
4.4. Histološko i imunohistohemijsko ispitivanje .....	82
4.5. Semikvantitativna analiza .....	84
4.6. Morfometrijska analiza .....	84
4.7. Statistička analiza podataka .....	85
5. REZULTATI .....	86
5.1. Direktna imunofluorescencija .....	86
5.2. Lančana reakcija polimeraze RT-PCR .....	87
5.3. Patohistološki nalaz .....	88
5.4. Imunohistohemijski nalaz .....	92
5.4.1. Antigen virusa besnila.....	92
5.4.2. Citokini (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ).....	97
5.5. Morfometrijska analiza .....	99
6. DISKUSIJA .....	104
7. ZAKLJUČCI .....	115
8. SPISAK LITERATURE .....	116

# 1. Uvod

Besnilo je akutna infektivna bolest koja se karakteriše dugom inkubacijom, simptomima oboljenja centralnog nervnog sistema, kratkim tokom i letalnim završetkom. Iako se smatra za jednu od najduže poznatih bolesti, a verovatno za najduže poznatu zoonozu, i danas predstavlja ozbiljnu pretnju po zdravlje ljudi i životinja.

Uzročnik bolesti je virus koji pripada familiji *Rhabdoviridae*, rodu *Lyssavirus*. Ima karakterističan oblik puščanog metka i jednolančanu RNK spiralu. Relativno je neotporan u spoljašnjoj sredini, oštećuju ga autolitički procesi, a osetljiv je i na uobičajena dezinfekciona sredstva.

Bolest je rasprostranjena na svim kontinentima, izuzimajući Antarktiku. Glavni rezervoari besnila su divlje životinje, u Evropi lisica, a u Americi rakun i tvor, u poslednje vreme i pojedine vrste slepih miševa. Bolest se gotovo isključivo prenosi ujedom obolele životinje, vrlo retki su slučajevi inficiranja ljudi kontaktom povređene kože i predmeta kontaminiranog pljuvačkom besne životinje. Zabeleženi su i slučajevi aerogene infekcije kod speleologa, gde su izvor infekcije bili slepi miševi. Dokazano je da se, pored pljuvačke, virus iz obolelog organizma izlučuje i mokraćom.

Virus besnila je izrazito neurotropan, sa mesta prodora se preko nervnih završetaka, kasnije nerava, prenosi do centralnog nervnog sistema, gde se umnožava u citoplazmi nervnih ćelija. Nakon toga, dolazi do centrifugalnog širenja virusa po organima koji ne moraju pripadati nervnom sistemu (pljuvačne žlezde, kornea). Inkubacioni period je dug, od 10 dana do nekoliko godina, kod životinja u proseku iznosi 2 do 8 nedelja. U kliničkoj slici dominiraju simptomi akutnog encefalitisa. Kod većine životinja bolest ima karakterističan tok, sa prodromalnim, ekscitacionim i

paralitičkim stadijumom. Bolest obično traje do 7 dana, vrlo retko duže, i završava se uginućem.

Dijagnoza se postavlja pregledom uzoraka mozga metodom direktne imunofluorescencije i biološkim ogledom na belim miševima, kao i patohistološkim pregledom. U poslednje vreme koriste se i imunohistohemijske i molekularne metode (RT-PCR).

Mehanizmi patogeneze kojima virus besnila kod ljudi i životinja izaziva encefalitis sa tako visokom smrtnošću i dalje nisu potpuno objašnjeni. Novija saznanja govore da virus besnila ne uništava neurone tako što izaziva njihova strukturna oštećenja, već dovodi do funkcionalnih alteracija. Smatra se da su u neuropatogenezu besnila uključeni i imunski mehanizmi domaćina, stvaranjem citokina (interleukin  $1\beta$ , tumor nekrotični faktor  $\alpha$ ) koji mogu imati ulogu u replikaciji i širenju virusa. Istovremeno, postoje pretpostavke da citokini pospešujući inflamaciju mogu ograničiti neuroinvazivnost virusa besnila. Ipak, ostaje da se ove pretpostavke potvrde budućim istraživanjima.

Novija istraživanja distribucije virusa i uloge citokina u patogenezi besnila se mahom odnose na besnilo kod ljudi i laboratorijskih životinja. To je i bio jedan od glavnih razloga zbog koga smo se opredelili da naše istraživanje izvršimo u uslovima prirodne infekcije, i to kod lisice, vrste koja još uvek predstavlja jedan od glavnih rezervoara i vektora bolesti.

## 2. Pregled literature

### 2.1. Istorijat

Besnilo se smatra jednom od najranije poznatih bolesti, prema nekim izvorima u Indiji i Kini je postojala još pre pet hiljada godina (Cvetnić, 1989). Najstariji pisani dokumenti u kojima se pominje termin "besan pas" su nastali u Mesopotamiji, 2.300 godine pre nove ere. U njima se utvrđuje odgovornost vlasnika takvih životinja za smrt ljudi koja je nastala ujedom besnih pasa. Demokrit (500 god pre nove ere) je prvi pomenuo takozvano "seme bolesti", a ovu pretpostavku je razvio Aristotel 400 godina pre nove ere (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989; Wilkinson, 2002). On je prvi detaljno opisao simptome bolesti kod pasa, ali i njeno prenošenje: "*Besnilo izludi životinju, i svaka životinja izuzev čoveka će se razboleti ako je ujede besan pas; bolest je fatalna za besnog psa i za životinju koju on ujede, izuzev čoveka*". Celsus, rimski lekar (100 godina pre nove ere), se bavio besnilom kod ljudi, naročito profilaksom i terapijom. Smatrao je da nakon ujeda treba izvršiti kauterizaciju rane, i da je treba držati otvorenom, kako bi se otrov izbacio napolje. Nakon razboljevanja, obelelom su davane male šanse za oporavak, a terapija se sastojala iz iznenadnog ubacivanja obolelog u bazen sa hladnom vodom, odnosno vrućim uljem (Wilkinson, 2002). Plinije Stariji (23-79. god) je iznenadni nastanak bolesti kod pasa pripisivao ekstremnim vrućinama, žeđi, seksualnoj frustraciji i drugim oblicima stresa. Umesto kauterizacije rane, on je preporučio mazanje rane mašću i pepelom spaljene glave psa, ali i preventivnu meru uklanjanja "crvića" iz jezika štenadi, koja su na taj način doživotno zaštićena od bolesti. Stotinu godina kasnije, Galen je došao do zaključka da su psi jedini prirodni domaćini bolesti, i da jedna kap pljuvačke besnog psa može izazvati hidrofobiju kod

ljudi (Wilkinson, 2002; Neville, 2004). U periodu nakon Galena, bilo je veoma malo saznanja o prirodi besnila, sve do šesnaestog veka, kada je Đirolamo Frakastoro 1546. godine objavio prvu knjigu o zaraznim bolestima u kojoj iznosi pretpostavku da je uzročnik besnila živi agens. On je zaključio da se bolest ne može preneti na čoveka običnim kontaktom i "na daljinu", već samo ujedom besnog psa. Sem toga, u svojoj knjizi je jasno opisao simptome besnila, kao i period inkubacije (Cvetnić, 1989; Wilkinson, 2002; Neville, 2004).

Pisanih tragova o epizootijama besnila u ovom periodu ima veoma malo, uglavnom se svode na opisivanje pojedinačnih slučajeva bolesti kod pasa, lisica, vukova, goveda i čoveka. To je neke autore navelo na zaključak, koji ipak treba uzeti sa dozom rezerve, da su epizootije bile veoma retke, sve do Srednjeg veka (Wilkinson, 2002).

Prvi pisani podaci o kretanju bolesti u Evropi potiču iz 1271. godine, kada je zabeležena pojava epizootije kod čopora vukova u Frankoniji, koji su napadali krda goveda i ljude (Wilkinson, 2002). Velike epizootije zabeležene su u Belgiji i Španiji 1500. godine, i oko 1600. u Belgiji, Francuskoj, Austro-Ugarskoj i Turskoj (Cvetnić, 1989; Neville 2004). U narednim decenijama besnilom su zaražene gotovo sve evropske države.

Prvi izveštaji o pojavi besnila u Novom svetu potiču iz Meksika 1709. godine, Barbadosa 1741, Virdžinije 1753. i severnih država SAD i Kanade 1762. godine. U Južnoj Americi besnilo je prvi put registrovano 1803. godine u Peruu i 1835. u Čileu, gde se pretpostavlja da su se ljudi zarazili jedući meso vola uginulog od besnila (Bell i Moore, 1971; Cvetnić, 1989).

U Aziji se 1810. kao glavni prenosilac besnila navodi vuk, a u Persiji i u celoj Rusiji pas. Iz Afrike, pretežno iz južnih delova kontinenta, prvi izveštaji o besnilu potiču iz dvadesetih godina devetnaestog veka.

Nedovoljno poznavanje uzroka besnila odrazilo se i na različite pokušaje lečenja koji su se primenjivali sve do devetnaestog veka. Preporučivani su razni lekovi mineralnog i biljnog porekla, za spoljašnju i unutrašnju upotrebu, pri čemu su od pomoći bili i dijeta, klistir, magija, isterivanje đavola i slično. U Srednjem veku lovci su

za lečenje besnila koristili takozvani ključ Svetog Huberta, gvozdeni ključ dužine desetak centimetara, išaran različitim simbolima, kojim su spaljivane ugrizne rane. Lečeni bolesnici su obeleženi i žigosani na čelu (Cvetnić, 1989).

Početak devetnaestog veka zabeleženi su prvi pokušaji eksperimentalnog proučavanja besnila. Zaraznost pljuvačke kod psa je potvrdio Cinke 1804. godine, kada je premazujući svežu ranu na telu psa i kunića pljuvačkom besnog psa izazvao besnilo. Gruner i Salm su to potvrdili 1813, Bernt je 1822. godine isto dokazao za biljojede, a Magendi za čoveka. Galtier je 1879. godine eksperimentalno zarazio kuniće ubrizgavanjem virulentne pljuvačke i moždanog tkiva i ukazao na nerve kao puteve prenošenja bolesti do centralnog nervnog sistema. Doduše, njegova pretpostavka da se uzročnik besnila prenosi nervnim putem dobila je naučnu potvrdu tek kada su Di Vestea i Zagari 1887. godine dokazali se nastajanje bolesti može sprečiti presecanjem ili kauterizovanjem nerava inficirane regije (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989; de Mattos i sar., 2001).

Dok je poznavanje distribucije virusa bilo ograničeno samo na pljuvačku besnih životinja, vrlo se malo moglo eksperimentalno raditi na proučavanju besnila, jer se virus nije redovno nalazio u pljuvački ogleđnih životinja, ili ga je imalo u veoma malim količinama. Sem toga, virus se u pljuvački nije dugo održavao. Zbog toga je veliki napredak u izučavanju bolesti postignut kada je Paster 1881. godine, zajedno sa svojim saradnicima Šamberlanom, Ruom i Tilijeom, dokazao da su svi delovi centralnog nervnog sistema besnih životinja redovno virulentni i da se uzročnik u njima može najlakše dokazati intracerebralnom inokulacijom laboratorijskim životinjama. Uzastopnim višekratnim intracerebralnim prenošenjem uličnog virusa, sa kunića na kunića, Paster i Ru su dobili virus stalno kratke inkubacije od pet do šest dana i nazvali ga *virus fixé*. Virusom tako kratke inkubacije bilo je omogućeno preciznije izvođenje oglada i rad na proizvodnji prvih vakcina i ispitivanju imuniteta protiv besnila (Ercegovac, 1987). Nakon Pasterovih ispitivanja, Remlinger i Rifat-Bej su 1903. godine uspeali da uzročnika besnila profiltruju i tako dokažu da spada u viruse, a Galovej i Elford su 1936. ustanovili da veličina virusa besnila iznosi 100-150 nm i da spada u veće viruse (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989; de Mattos i sar., 2001).

Na polju dijagnostike besnila, veoma veliki doprinos je dao Babes, koji je 1887. godine u ganglijskim ćelijama centralnog nervnog sistema obolelih životinja opisao citoplazmatske eozinofilne inkluzije. Međutim, njih je tek 1903. godine Negri detaljno opisao i nedvosmisleno utvrdio njihovu vezu sa virusom besnila, pa po njemu i nose ime Negrijeva telašca. Ova ispitivanja nastavili su Nelis i Van Gehuhten, a Selers i Felou su 1927. pojednostavili njihovo dokazivanje. Goldvaser i Kisling su 1958. godine dokazali prisustvo virusa besnila u ispitivanom materijalu metodom fluorescentnih antitela, koja je nedugo potom uvedena u praktičnu dijagnostiku (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989; de Mattos i sar., 2001).

Veliki napredak postignut je kultivisanjem virusa besnila na kulturi ćelija, što je omogućilo bolje poznavanje njegovih morfoloških i biohemijski karakteristika. Webster i Clou su 1936. godine uspjeli da prvi put umnože virus besnila na kulturi tkiva mozga mišjih embriona, a Peragalo 1939. na kokošijim embrionima. Kasnije je Viktor 1964. godine kultivisao virus na diploidnim ćelijama humanog tkiva (Ercegovac, 1987). Zahvaljujući kulturi tkiva i elektronskom mikroskopu, Almeida i saradnici su 1962. ustanovili da virus besnila ima oblik metka, dok su Lepin i Soter 1946. godine utvrdili da se unutrašnja struktura Negrijevih telašaca boji toluidin plavim kao i ribonukleinska kiselina, koja je oivičena proteinskim omotačem. Lepin i Atanasiu su ga 1963. godine svrstali u grupu rabdovirusa (Ercegovac, 1987; de Mattos i sar., 2001).

Prvu eksperimentalnu imunizaciju životinje protiv besnila izveo je 1879. godine Galtije, profesor Veterinarskog fakulteta u Lionu, inokulacijom virulentne pljuvačke i moždanog tkiva u jugularnu venu ovaca i koza. Postoje nepotpuni podaci da je na kunićima ispitivao i mogućnosti profilaktičke i terapijske imunizacije atenuiranim materijalom. Veliki potencijal njegovih ispitivanja par godina kasnije je prepoznao francuski hemičar Luj Paster, koji je sa svojim saradnicima Ruom, Nokarom, Šamberlanom i Tilijeom subkutano inokulisao pse i kuniće suspenzijom kičmene moždine kunića koji su uginuli nakon intracerebralne inokulacije *virusa fixé*. Smatra se sa je Paster 1884. godine izvršio prvu uspešnu imunizaciju pasa, a 1885. godine prvu imunizaciju ljudi protiv besnila. Devetogodišnjeg dečaka Jozefa Majstera doveli su u Pasterovu ambulantu sa teškim ugriznim ranama koje mu je naneo besan pas. Posle konsultacija sa vodećim lekarima toga vremena o etičkim aspektima svoga postupka,

odlučio je da na njemu po prvi put sprovede postekspozicionu imunizaciju, koja je na sreću bila uspešna. Simptomi bolesti se kod dečaka nisu pojavili, a na taj način su postavljeni prvi principi postekspozicione profilakse besnila (Ercegovac, 1987; Wilkinson, 2002).

Vest o uspešnoj imunizaciji je odjeknula širom Evrope i sveta, a veliki uspesi Pastera u izučavanju besnila i preteća opasnost po ljude i životinje nametnuli su potrebu za osnivanjem ustanove za buduća proučavanja bolesti. Francuska vlada je u Parizu 14. novembra 1888. godine otvorila prvu takvu ustanovu koja je u čast velikog naučnika nazvana Pasterov institut. Nedugo potom, sestrinski instituti u kojima se razvijala proizvodnja vakcine protiv besnila otvoreni su i u Lilu, Nansiju, Sajgonu, Tunisu, Alžiru, odnosno širom Evrope i sveta. U Srbiji je prvi Pasterov zavod osnovan u Nišu 1903. godine, a 1921. godine i u Novom Sadu (Cvetnić, 1989; Wilkinson, 2002; Blancou, 2004).

Međutim, Pasterov metod proizvodnje vakcina bio je relativno složen, a sama vakcinacija vezana za institut u kome se vakcina proizvodi, pa je bio nepodesan za najširu primenu. Zbog toga se prešlo na jednostavniji metod koji se mogao primenjivati i van proizvodnog centra, a sastojao se u inokulaciji fenolizovane suspenzije virulentne moždane supstance kunića. Vidan napredak u tehnologiji dobijanja vakcine učinjen je pasažom uličnog virusa kroz pileće i pačije embrione, čime su dobijeni atenuirani sojevi virusa besnila: Flury (Leach i Jonson 1940), Kelev (Komarov i Horenstein 1953) i Nishigahara (Takamatsu i Oshima 1959), od kojih se neki i danas koriste za profilaktičku vakcinaciju pasa i drugih životinja protiv besnila (Ercegovac, 1987).

## 2.2 Etiologija

Uzročnik besnila je virus koji pripada rodu *Lyssavirus* (od grčkog *lyssa*, što znači bes) i familiji *Rhabdoviridae* (od grčkog *rhabdos*, što znači štapić). U familiju *Rhabdoviridae* svrstano je preko 175 virusa izolovanih iz biljaka i životinja, kojima je



zajednički štapićast oblik i jednolančana, negativno orjentisana ribonukleinska kiselina. Najznačajniji virusi ove familije pripadaju rodovima *Lyssavirus*, *Ephemerovirus* i *Vesiculovirus* (Rose i Whitt, 2001). Familija *Rhabdoviridae*, zajedno sa virusima iz familija *Paramixoviridae*, *Filoviridae* i *Bornaviridae* čini red *Mononegavirales*.

Smatra se da je virus besnila najrodniji virusu vezikularnog stomatitisa, koji predstavlja prototip roda *Vesiculovirus*. Ova dva virusa imaju sličnu morfologiju, hemijsku stukturu i životni ciklus, a mogu inficirati sisare. Ipak, s obzirom da je virus besnila u organizmu inficiranog domaćina isključivo neurotropan i uvek izaziva fatalni encefalomijelitis, on i njemu srodni virusi svrstani su u zasebni rod (Murphy i sar., 1995).

Rod *Lyssavirus* trenutno sadrži sedam genotipova virusa (Bourhy i sar., 1992; Bourhy i sar., 1993; Kissi i sar., 1995). Jedan od njih je virus besnila (genotip 1, serotip 1), dok ostalih šest predstavljaju specifične besnilu-srodne viruse koji imaju sposobnost da izazovu encefalitise slične besnilu. To su Lagos bat virus (LBV, genotip 2, serotip2), Mokola virus (MOKV, genotip 3, serotip 3), Duvenhage virus (DUVV, genotip 4, serotip 4), Evropski bat lyssavirus tip 1 (EBL - 1, genotip 5), Evropski bat lyssavirus tip 2 (EBL - 2, genotip 6), Australijski bat lyssavirus (ABLV, genotip 7). U rod *Lyssavirus* spadaju i Kotonkon (KOTV), Obodhiang (OBOV) i Rochambeau (RBUV), koji su antigenski veoma udaljeni od ostalih članova roda i ne izazivaju infekcije slične besnilu kod sisara. Iako se antigenske karakteristike njihovih strukturnih proteina mogu značajno razlikovati, svi lyssavirusi imaju zajedničke mnoge biološke i fizičko-hemijske karakteristike, morfologiju, strukturu i organizaciju genoma i proteinskog omotača, a koriste i gotovo istovetne mehanizme ulaska u ćeliju i umnožavanja (Wunner, 2002).

### **2.2.1. Morfologija virusa**

Virus besnila se sastoji iz spoljašnje membrane i unutrašnjeg ribonukleoproteinskog jezgra. Tipična virusna čestica ima oblik puščanog zrna, dužine 130-250 nm (prosečno 180 nm), i prečnika 60-110 nm (prosečno 75 nm) (Davies i sar., 1963; Hummeler i sar., 1967; Sokol, 1975) . Prilikom umnožavanja *in vitro* opisane su i

virusne čestice čiji se oblik i struktura donekle razlikuju od tipičnih, takozvanih B viriona (B – bottom band, bullet shape), koji su naziv dobile zbog karakterističnog oblika, odnosno zbog činjenice da se nakon centrifugiranja zadržavaju na dnu cezijum-hloridnog sedimentacionog stuba. Takvi virioni imaju kupast oblik, kraći su i lakši od B viriona, te se stoga nalaze na vrhu sedimentacionog stuba (top-band, T virioni). (Holland, 1987). Njihov genom ima svega trećinu ili polovinu dužine standardnog genoma, neinfektivni su, a njihova uloga u patogenezi bolesti nije u potpunosti utvrđena, iako se pretpostavlja da utiču na umnožavanje standardnih B viriona u inficiranoj ćeliji (Wunner, 2002).

Membrana virusa je dvoslojna, debljine 7,5 do 10 nm. Izgrađena je od molekula fosfolipida (sfingomijelin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilholin), neutralnih lipida (trigliceridi i holesterol) i glikolipida. Na njoj spoljašnjoj površini nalaze se brojne peplomere, nastavci u obliku klinova dužine 8,3 do 10 nm, koje se sastoje od po tri molekula virusnog G proteina (Gaudin i sar., 1992). Pod elektronskim mikroskopom peplomere se vide kao kratki, ka spolja prošireni šiljci, koji na distalnom kraju imaju tvorevinu nalik dugmetu (Murphy i Harrison, 1979).

Ribonukleoprotein virusa besnila sastoji se iz desno orjentisane helikoidne strukture, prosečnih dimenzija 165 x 50 nm. Dužina prosečnog navoja je oko 7,5 nm, a ispravljenog heliksa 4,2 do 4,6 nm. Čine ga ribonukleinska kiselina i tri proteina: N protein, nekatalitički P protein i katalitički L protein (RNK polimeraza). Sva tri proteina su uključena u aktivnost RNK polimeraze (Wunner, 2002). Za razliku od ostalih virusa iz familije *Rhabdoviridae*, kod kojih je samo P protein fosforilisan, kod virusa besnila su fosforilisani i N i P protein. U svakom virionu nalazi se 1325 molekula N, 691 molekul P i 72 molekula L proteina. Između ribonukleoproteina i membrane nalazi se matriks koji se sastoji od oko 1800 molekula virusnog M proteina (de Mattos i sar., 2001).

Genom virusa besnila čini nesegmentisana, negativno orjentisana jednostruka ribonukleoproteinska kiselina (RNK), koja nije infektivna i ne može samostalno sintetisati proteine. Sastoji se od 11928 do 11932 nukleotida, a na njenom 3' kraju je nekodirajuća Le (leader) sekvenca koja se sastoji iz 58 nukleotida. Iza nje se nalaze sekvence pet strukturnih gena (N, P, M, G i L), nakon kojih dolazi nekodirajuća T

(trailer) sekvenca na 5' kraju lanca. Između gena nalaze se relativno kratke sekvence od dva do pet nukleotida, izuzev sekvence između G i L gena, koja se sastoji iz 423 nukleotida (Wunner, 2002). Ona je dovoljno duga da bi predstavljala gen, ali ne sadrži ORF, pa se pretpostavlja da je u pitanju ostatak gena tj. pseudogen, koji je u toku evolucije izgubio funkciju (Tordo i sar., 1986). Ovaj, takozvani  $\Psi$  region u genomu virusa besnila, istovremeno predstavlja i najdivergentniji deo genoma, odnosno region u kojem su mutacije najčešće (Sacramento i sar., 1991).

### **Nukleoprotein (N)**

N protein se sastoji iz 450 aminokiselina, ima molekularnu težinu od oko 57000. Predstavlja glavni protein nukleoproteinskog jezgra, i smatra se najkonzerviranijim od svih virusnih proteina, u smislu sličnosti sekvenci aminokiselina kod različitih genotipova rabdovirusa (Conzelmann i sar., 1990; Bourhy i sar., 1993; Kissi i sar., 1995). Kod različitih izolata virusa besnila, sličnost između aminokiselinskih sekvenci u N proteinu je jako velika, 98 – 99% (Wunner i sar., 1988; Conzelmann i sar., 1990), dok je kod različitih genotipova rabdovirusa oko 92%. Razlog za ovako visok nivo konzervacije N proteina je i to što ima veoma bitnu ulogu u životnom ciklusu virusa, između ostalog štiti virusnu RNK od aktivnosti ribonukleaze i reguliše RNK transkripciju i replikaciju (Wunner, 2002). Istovremeno, neke razlike u sekvencama kod N proteina dovode do stvaranja jedinstvenih, genotip-specifičnih epitopa, koji se koriste za utvrđivanje genotipa i serotipa virusa na osnovu njihove reakcije sa specifičnim anti-N monoklonskim antitelima (Dietzschold i sar., 1987; Smith, 1989), a pouzdane su i kod tipizacije virusa na nivou nukleotida, korišćenjem reakcije lančane polimeraze (PCR) (Sacramento i sar., 1991; Bourhy i sar., 1993).

Nascentni N protein se imunocitohemijskim tehnikama može dokazati difuzno raspoređen u citoplazmi inficirane ćelije. Neposredno nakon formiranja, molekuli N proteina stvaraju homologne (N-N), i znatno češće heterologne (N-P) komplekse i formiraju nascentne virusne nukleokapside. Molekuli N proteina u inficiranoj ćeliji mogu biti koncentrisani, takođe u vidu N-P kompleksa, u citoplazmatskim inkluzijama *in vitro* ili Negrijevim telašcima *in vivo* (Chenik i sar., 1994; Kawai i sar., 1999).

Tokom formiranja nukleokapsida, ribonukleinska kiselina se vezuje za N-terminalni deo N proteina, najčešće između 298. i 352. aminokiseline, nakon čega dolazi do konformacione promene i fosforilacije serina na 389. mestu u aminokiselinskom lancu (Dietzschold i sar., 1987; Kawai i sar., 1999). Fosforilacija N proteina u toku formiranja nukleokapsida je svojstvena samo virusu besnila, tj. ne događa se kod ostalih virusa iz familije *Rhabdoviridae*, i prema nekim autorima, delimično objašnjava sporije razmnožavanje virusa besnila u odnosu na virus vezikularnog stomatitisa (Yang i sar., 1999; Wunner, 2002).

Fosforilisani molekul N proteina se blago savija i formira bilobularni oblik, koji mu omogućava vezivanje za naredni monomer N proteina. Ovi N monomeri su "gusto pakovani", na svakih 9-11 nukleotida duž lanca ribonukleinske kiseline, što je dovoljno da se RNK zaštiti od ribonukleaze (Iseni i sar., 1998). Molekuli P proteina se potom vezuju za specifična mesta blizu C terminalnog kraja N proteina, okrenuti su ka spolja i unutra i smatra se da dovode do novih konformacionih promena koje su bitne u formiranju virusne čestice (Dietzschold i sar., 1987; Kouznetzoff i sar., 1998; Kawai i sar., 1999).

Na N proteinu se nalazi nekoliko specifičnih epitopa za B i T ćelije. Sa sigurnošću se može reći da se linearni epitopi za B ćelije nalaze između 374. i 383, odnosno između 313. i 337. aminokiseline. Neki linearni epitopi mogu biti prisutni samo na nezrelim formama N proteina, dok se neki mogu ispoljiti tek nakon njihovog sazrevanja (Dietzschold i sar., 1987; Goto i sar., 2000). N protein predstavlja i glavni antigen za T-helper (pomagače) ćelije, koje reaguju i na viruse srodne besnilu (Celis i sar., 1988; Ertl i sar., 1989). Dokazano je da se između 404. i 418. aminokiseline N virusnog proteina nalazi imunodominantni epitet koji stimuliše stvaranje Th ćelija specifičnih za virus besnila i pojačava stvaranje specifičnih antitela protiv virusa besnila (Ertl i sar., 1989).

Zanimljivo je da N protein ima sposobnost da, u odsustvu specifičnih antitela, delimično zaštiti organizam od periferne infekcije virusom besnila. Sem toga, utvrđeno je i da pojačava imunski odgovor kod životinja nakon vakcinacije inaktivisanom vakcinom (Tollis i sar., 1991).

## **Fosfoprotein (P)**

Fosfoprotein virusa besnila se sastoji od 297 aminokiselina, dobro je konzervisan (preko 97% sličnosti) među lisavirusima genotipa 1, a može se javiti u više fosforilisanih formi (Gupta i sar., 2000). Između ostalog, P protein ima ulogu šaperona za nascentne molekule N proteina, sprečava njihovu polimerizaciju i nespecifično vezivanje za ćelijsku ribonukleinsku kiselinu, a u N-P kompleksima omogućava kapsidaciju virusne RNK. Kao subjedinica RNK-polimeraza kompleksa (P-L), P protein ima bitnu ulogu u transkripciji i replikaciji virusnog genoma, stabilizujući L protein, i omogućavajući vezivanje polimeraza kompleksa na RNK (Chenik i sar., 1994; Wunner, 2002).

Novija istraživanja govore da se u toku umnožavanja virusa u ćeliji nascentni P protein vezuje za C terminalni kraj RNK-N protein kompleksa. Na samom P proteinu dokazana su dva mesta za vezivanje sa N proteinom: prvo je na samom C terminalnom kraju, u dužini od 30 aminokiselina, a drugo na N terminalnom kraju, između 69. i 177. aminokiseline (Chenik i sar., 1994). Pretpostavlja se da su oba mesta aktivna, ali u različito vreme i za različitu svrhu. Vezivanje N proteina za N-terminalni kraj P proteina se dešava odmah nakon njihovog *in vivo* formiranja, a pretpostavlja se da u toj reakciji postoji kompeticija sa još jednim molekulom koji se može vezati za N protein (endogena RNK). Ovaj model dvostrukog vezivanja oslikava regulatornu ulogu P proteina i transkripciji i replikaciji virusne ribonukleinske kiseline (Wunner, 2002).

Nakon vezivanja za RNK-N u primarnoj ribonukleoproteinskoj formaciji, P protein se vezuje za L protein, stvarajući potpuno aktivni RNK-polimeraza kompleks. Mesto vezivanja L proteina nalazi se u okviru prvih 19 aminokiselina P proteina a smatra se da u toj reakciji učestvuju nefosforilisani P oligomeri, iako se ne može sa sigurnošću reći da li se radi o trimerima ili tetramerima (Gigant i sar., 2000; Wunner, 2002).

Novija istraživanja govore da se na N-terminalnoj polovini P proteina (138-172. aminokiselina) nalazi mesto za koje se vezuje Dinein LC8, deo miozin V kompleksa, koji ima važnu ulogu u intracelularnom transportu makromolekula (Raux i sar., 2000). Pretpostavlja se da P protein-dinein LC8 kompleks reguliše transport virusnog

ribonukleoproteina kroz mrežu citoplazmatskih mikrotubula u ćeliji, ali i između neurona (Wunner, 2002).

### **Veliki (L) protein**

L virusni protein ima 2127 do 2142 aminokiselina i predstavlja katalitičku komponentu polimeraza kompleksa, zajedno sa nekatalitičkim kofaktorom P. Odgovoran je za većinu enzimskih aktivnosti u procesu transkripcije i replikacije virusne RNK. Virusna RNK-polimeraza ima jedinstvenu ulogu na početku infekcije, jer inicira primarnu transkripciju genoma RNK nakon ulaska nukleokapsidnog jezgra u citoplazmu inficirane ćelije. Enzimske faze transkripcije uključuju i inicijaciju i elongaciju Le+ RNK i iRNK, kao i modifikacije iRNK (Wunner, 2002).

Upoređivanjem sekvenci L proteina različitih virusnih izolata utvrđeno je da postoje domeni koji su visoko konzervirani, sa gotovo identičnim rasporedom aminokiselina, ali i oni koji su jako varijabilni, što se objašnjava njegovom multifunkcionalnošću. Četiri motiva, označeni A-D, koji predstavljaju regione sa najvećom sličnošću i za koje se smatra da su nosioci enzimske aktivnosti, su po rasporedu i položaju veoma slični sa odgovarajućim sekvencama svih ostalih virusnih RNK i DNK polimeraza (Tordo i sar., 1988; Barik i sar., 1990).

Sem toga, na L proteinu utvrđeno je postojanje još najmanje dva mesta (između 754-778. i 1332-1351. aminokiseline) za vezivanje i iskorišćavanje ATP-a (slično kao kod ćelijske kinaze), koji je neophodan u enzimskim reakcijama u kojima učestvuje L protein (Barik i sar., 1990; Canter i sar., 1993; Wunner, 2002).

Pošto aktivnost L proteina u potpunosti zavisi od njegove interakcije sa fosforilisanim P proteinom, postavlja se pitanje da li P protein učestvuje u nekoj od njegovih specifičnih enzimskih funkcija, ili je on samo regulatorni protein u procesu transkripcije i replikacije RNK. Ovaj kooperativni odnos katalitičkog L i nekatalitičkog P proteina u polimeraza kompleksu je veoma značajan i predstavljaće bitno pitanje svih budućih istraživanja (Wunner, 2002).

### **Matriksni (M) protein**

M protein je najmanji protein virusa besnila, sadrži svega 202 aminokiseline (25 kDa). On formira omotač oko ribonukleoproteinskog jezgra virusa, stvarajući skeletnu strukturu viriona. Sem toga, on je i multifunkcionalni protein koji deluje u interakciji sa virusnim proteinima i sa proteinima ćelijske membrane. Između ostalih, njegove funkcije su regulacija transkripcije virusne RNK, kondenzacija helikoidnih nukleokapsidnih jezgara u guste kalemove, vezivanje virusa sa dvoslojnom membranom, a ima udela i u citopatogenezi inficiranih ćelija (Ito i sar., 1996; Wunner, 2002). Njegov N-terminalni region ima veoma važnu ulogu u regulaciji transkripcije virusne RNK, dok se u središnjem delu nalazi hidrofobni domen (89-107. aminokiselina) za koji se pretpostavlja da reaguje sa membranskim lipidima (Tordo i sar., 1986).

Oko 1200 do 1500 molekula M proteina se vezuje za nascentno ribonukleoproteinsko jezgro, i kondenzuje ga formirajući gusti kalem, takozvani ribonukleokapsid – M protein kompleks. M protein daje virionu karakterističan oblik pušćanog metka, bez obzira da li se nalazi unutar ribonukleoproteinskog jezgra ili na njegovoj površini. U isto vreme, M protein omogućava vezivanje ove strukture za membranu inficirane ćelije i inicira pupljenje virusne čestice iz ćelije domaćina (Mebatsion i sar., 1999; Wunner, 2002). Smatra se da je za mehanizam pupljenja virusa bitan takozvani PY domen koji se nalazi blizu N-terminalnog kraja M proteina i koji je bogat prolinom. Inače, veoma slični domeni nađeni su i u M proteinima Ebola i Marburg virusa, kao u Gag proteinima humanog sarkoma virusa i virusa imunodeficijencije, koji su takođe značajni za pupljenje virusnih čestica iz ćelija domaćina (Wunner, 2002). PY motiv virusnog M proteina reaguje sa WW motivom (sadrži 38-40 aminokiselina od kojih je položaj dva triptofana stalan), koji se nalazi na proteinima koji ulaze u sastav citoskeleta ili su uključeni u prenos signala i gensku regulaciju (Sudol, 1996). Zbog toga se smatra da M protein uključuje i ćelijske proteine u oslobađanje viriona iz inficirane ćelije, a da je za ovaj proces, odnosno povećavanje njegove efikasnosti, bitna i njegova interakcija sa virusnim G proteinom (Mebatsion i sar., 1996).

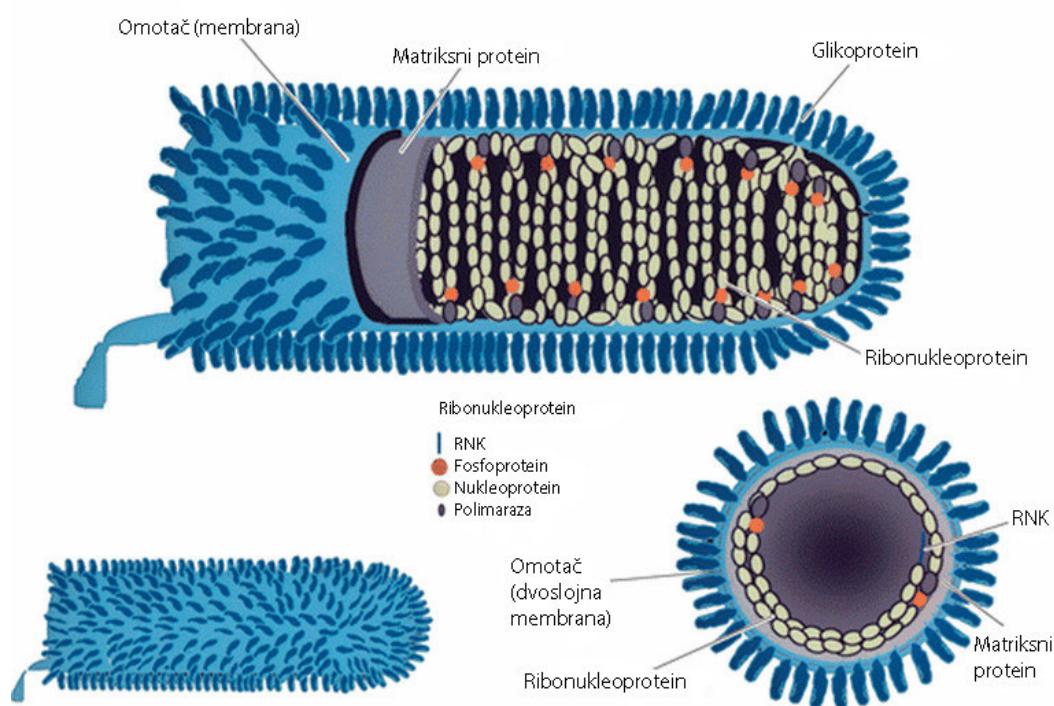
## **Glikoprotein (G)**

Virusni glikoprotein se sastoji od 505 aminokiselina, od kojih prvih 19 na N terminalnom kraju predstavljaju signalni peptid. Signalni peptid omogućava transport nascentnog proteina kroz membrane endoplazmatskog retikuluma, Goldžijevog kompleksa i plazma membranu, da bi se na kraju u Goldžijevom kompleksu odstranio. G protein je jedini površinski protein virusa besnila. On formira trimere u vidu klinastih izraštaja sa površine virusne membrane, dužine oko 8,2 nm. Svaki od molekula G proteina je povezan sa virusnom ovojnicom pomoću transmembranskog domena, koji se sastoji iz 22 aminokiseline (439 - 461) (Gaudin i sar., 1992). Na C terminalnom kraju se nalazi citoplazmatski domen, koji je okrenut ka unutrašnjoj strani viriona i vezuje se sa M virusnim proteinom, dok je ektodomen G proteina (aminokiseline 1 – 439) okrenut ka spolja i funkcionalno je najbitniji deo molekula. On je odgovoran za vezivanje virusa besnila za ćelijske receptore, te je veoma značajan u patogenezi. Nakon vezivanja za receptore na ciljnim ćelijama domaćina, virus ulazi u ćeliju, a G protein na niskom pH sredine (6,2 – 6,3) trpi određene konformacione promene, postaje hidrofoban i spaja se sa hidrofobnom membranom endozoma. Na taj način se inaktiviše, i postaje jako osetljiv na ćelijske proteaze (Gaudin i sar., 1995).

Mutacije na virusnom G proteinu imaju veoma bitnu ulogu u patogenezi bolesti. Amino kiselina arginin 333 u divljem tipu G proteina se smatra odgovornom za virulencu virusa besnila. Sojevi virusa koji umesto arginina na 333. mestu u polipeptidnom lancu G proteina imaju glutamin, izoleucin, glicin, metionin ili serin, su avirulentni ili zatno manje patogeni u odnosu na divlje sojeve virusa (Dietzschold i sar., 1983; Seif i sar., 1985). Smatra se da je arginin 333 bitan ne samo za neuropatogenost virusa besnila, već i za njegovo aksonalno, odnosno transsinaptičko širenje *in vivo* (Yang i Jackson, 1992). Sa druge strane, neka istraživanja govore u prilog tome da razlika u patogenezi kod virulentnih i manje virulentnih sojeva virusa besnila nije u putevima njihovog širenja, već u sposobnosti virulentnih sojeva da inficiraju znatno veći broj neurona. U takvim okolnostima, patogeni soj virusa može koristiti više različitih mesta za ulazak u centralni nervni sistem, dok avirulentni virus neće prepoznati te iste receptore (Jackson 1991; Wunner, 2002).



Glikoprotein je bitan i za imunski odgovor domaćina na infekciju, jer indukuje stvaranje virus neutralizacionih antitela i predstavlja njihovu metu, baš kao i za virus specifične T limfocite. Na njegovom ektodomenu do danas je lokalizovano osam antigenskih mesta, koja su obeležena oznakama I – VI, a i G1. Sem toga, korišćenjem sintetisanih peptida i klonova T limfocita, mapirani su epitopi za koje se vezuju helper i citotoksične T ćelije. Ipak, za potpuno razumevanje funkcije G virusnog proteina neophodno je u potpunosti determinisati njegovu konformaciju, odnosno trodimenzionalnu strukturu, što je do sada bilo jako teško, jer je osetljiv na kristalizaciju (Celis i sar., 1988; Benmansour i sar., 1991; Wunner, 2002).



Šema 1. Prikaz strukture virusa besnila (Rupprecht i sar., 2002)

## 2.2.2. Intracelularni životni ciklus virusa

Životni ciklus virusa besnila može se podeliti u tri faze. Prva, odnosno rana faza obuhvata vezivanje virusa za receptore na ćeliji, njegov ulazak u ćeliju i oslobađanje ribonukleoproteina. Druga faza obuhvata transkripciju i replikaciju virusnog genoma, a treća sklapanje virusne čestice i njen izlazak iz ćelije (Wunner, 2002).

### Ulazak virusa u ćeliju

Infekcija počinje vezivanjem virusa za površinu ćelije domaćina, tačnije najverovatnije za specifične receptore. Do sada najbolje proučen receptor za virus besnila je nikotinski acetilholon receptor (AChR), koji se nalazi na neuromuskularnim sinapsama. U nekoliko studija (Lentz i sar., 1982; Burrage i sar., 1985), korišćenjem holinergičnih antagonista i kompetitivnih peptida koji se vezuju za acetilholinske receptore, dokazan je njihov značaj u patogenezi. Međutim, dokazano je da i neke ćelije kod kojih je *in vitro*, pa čak i *in vivo* zabeležena infekcija nemaju acetilholinske receptore (Tsiang, 1993; Wunner, 2002). Zbog toga se postavlja pitanje da li virus besnila koristi još neki tip receptora, ili možda više vrsta receptora učestvuje istovremeno u penetraciji virusa. Dalja istraživanja umnogome otežava činjenica da se virus besnila *in vitro* može umnožavati u gotovo svim linijama ćelija, dok je u organizmu skoro u potpunosti ograničen na nervne ćelije. Istraživanjima na kulturi ćelija, nedavno su otkrivena dva receptora za virus besnila: adhezioni molekul nervnih ćelija CD56 i receptor p75NTR (faktor rasta nervnih ćelija), ali njihov značaj nije u potpunosti dokazan (Thoulouze i sar., 1998; Jackson i Park, 1999).

Nakon vezivanja za receptor, virus ulazi u ćeliju fuzionisanjem virusnog omotača sa ćelijskom membranom ili formiranjem vezikula ili jama u kojima se nalazi dva do pet viriona. Nakon toga, virusni G protein, na odgovarajućoj kiselosti sredine (pH 6,3) omogućava spajanje virusnog omotača sa membranom endozoma (Whitt i sar., 1991; Gaudin i sar., 1992; Wunner, 2002).

## Transkripcija

U drugoj fazi životnog ciklusa virusa, transkripcija virusnog RNK genoma počinje izbacivanjem ribonukleoproteina iz ćelijskog endozoma. Gusto navijen nukleokapsid se raspliće i formira labavu helikoidnu strukturu. Sam proces transkripcije se odvija zahvaljujući RNK polimeraza kompleksu i nezavisan je od ćelije domaćina. Polimeraza kompleks obično inicira transkripciju sa 3' kraja ribonukleinske kiseline, ili nastavlja transkripciju na sledećem mestu sinteze iRNK, tamo gde je ostala nakon sastavljanja virusne čestice u prethodnoj inficiranoj ćeliji. Ovaj deo replikacionog procesa se naziva primarnom transkripcijom, zato što se odigrava na roditeljskim nukleokapsidima i ne zahteva sintezu virusnih proteina. Svaki od pet virusnih gena stvara iRNK transkript, koji u procesu translacije stvara pet virusnih proteina (Wunner, 2002).

Prvi proizvodi transkripcije virusnog genoma su mali, 55 do 58 nukleotida dugi, pozitivno orjentisani, leader RNK (Le+) transkripti. Smatra se da su upravo oni inicijatori transkripcije virusne iRNK, a sam model aktiviranja RNK polimeraze, kao i zaustavljanja transkripcije i otpočinjanja replikacije nije potpuno jasan. Sem toga, Le+ transkripti imaju ulogu u vezivanju N virusnog proteina za ribonukleinsku kiselinu, odnosno stvaranju ribonukleoproteinskog kompleksa (Yang i sar., 1999).

Odmah nakon Le+ transkripata, sintetišu se informacione ribonukleinske kiseline za pet virusnih gena. U toku sinteze nascentnih iRNK, L virusni protein poklapa 5' kraj svake iRNK, vezujući za njega 7-metilguanozin. Na kraju svakog virusnog gena nalazi se sekvenca koju čine nukleotidi AC i 7-8 U nukleotida. Kada virusna polimeraza u toku procesa transkripcije dođe do ove sekvence, ona pauzira, tj. "zamuckuje", i kopira U nukleotide stvarajuću dugačak niz A nukleotida na transkriptu (i do 200). Tek tada se iRNK oslobađa i kreće transkripcija narednog virusnog gena (Wunner, 2002).

Sve sem jedne iRNK proizvode po jedan protein sa jednog ORF-a. Za ove informacione kiseline, translacija počinje prvim inicijalnim AUG kodonom (kodira metionin), sa 5' kraja, a završava se UAA ili UGA stop kodonom u blizini 3' kraja. Izuzetak je P- iRNK, u kojoj se nalazi nekoliko inicijalnih AUG kodona, tako da se u procesu translacije može stvoriti tri ili četiri manjih proteinskih fragmenata. Funkcija

ovih proteina, od kojih dva manja završe u nukleusu, a dva veća ostanu u citoplazmi ćelije domaćina, nije poznata (Chenik i sar., 1995). Glavni ORF-ovi informacionih RNK kodiraju proteine koji se sastoje od 450 (N), 297 (P), 202(M), 524 (G) i 2142 (L) aminokiselina. Neke iRNK mogu da sadrže i nekoliko kodona više ili manje, u zavisnosti od genotipa virusa.

### **Replikacija virusa**

Nakon primarne transkripcije, replikacija virusne RNK postaje dominantan događaj u kasnoj fazi umnožavanja virusa besnila. Čim se u citoplazmi pojave slobodni molekuli N virusnog proteina, koji su stvoreni iz primarnih iRNK transkripta, neki od njih okružuju Le+ RNK transkripte, čime sprečavaju kompletiranje njihove transkripcije, odnosno sprečavaju Le+ RNK da inicira transkripciju pojedinačnih informacionih kiselina. Kao posledica toga, nastaje komplementarna, pozitivno orjentisana kopija virusne RNK. Iako precizan mehanizam prelaska sa procesa transkripcije na proces replikacije virusne RNK nije u potpunosti poznat, smatra se da virusni proteini imaju bitnu ulogu u njemu, i da utiču na polimeraza kompleks, koji od tada ne prepoznaje pojedinačne gene u virusnom genomu. Dakle, početak replikacije virusnog genoma je sinteza komplementarne kopije virusne RNK, poznate pod nazivom antigenom ili replikativna prelazna RNK (Yang i sar., 1999; Wunner, 2002). Ona služi kao muštra za sintezu novostvorene, negativno orjentisane, takozvane progene RNK, koja je takođe okružena slobodnim molekulima N virusnog proteina u citoplazmi ćelije domaćina. U toku infekcije ova dva RNK lanca se sintetišu nesrazmerno. Smatra se da se u inficiranoj ćeliji stvori 50 puta više progene virusne RNK nego antigene RNK, zašta su zaslužne sekvence nukleotida na 3' kraju progene RNK (Wunner, 2002).

### **Sinteza virusnih proteina**

Virusni proteini se sintetišu u poliribozomima ćelije domaćina. Virusni G protein se stvara na ribozomima vezanim za membranu, dok se translacija ostalih proteina vrši na slobodnim ribozomima. Nascentni molekuli G proteina se tokom translacije ubacuju u lumen endoplazminog retikuluma, gde dolazi do njihove

modifikacije, glikozilacije, formiranja disulfidnih veza i sklapanja homotrimeri. Finalna obrada ugljenohidratnih bočnih lanaca se odvija u Goldžijevom kompleksu, nakon čega se virusni G trimeri pojavljuju na membrani inficirane ćelije (Wunner, 2002).

### **Formiranje virusne čestice**

Kada se u inficiranoj ćeliji stvore dovoljne količine progene RNK i virusnih proteina, formiraju se virusni nukleokapsidi i počinje sklapanje virusne čestice, koje se odigrava dok god je ćelija domaćin metabolički kompetentna. Morfogeneza virusa besnila je povezana sa formiranjem intracitoplazmatske supstance, takozvanog matriksa, koja se često može naći u moždanom tkivu i u kulturama ćelija. Ova filamentozna supstanca čini Negrijeva telašca u neuronima inficiranog mozga, čije stvaranje prethodi formiranju virusnih čestica (Wunner, 2002). Sam proces počinje inkapsidacijom progene RNK i formiranjem RNK – N kompleksa, čime virusna RNK biva potpuno zaštićena od ćelijskih ribonukleaza (Kouznetzoff i sar., 1998; Iseni i sar., 2000). Kako se nascentni molekuli N i P virusnih proteina nakupljaju u citoplazmi inficirane ćelije, oni formiraju homologne i heterologne (N – P) komplekse. Molekuli N proteina se u visokim koncentracijama međusobno spajaju i formiraju velike intracitoplazmatske inkluzije (Negrijeva telašca), dok se molekuli P proteina oligomerizuju stvarajući trimere ili tetramere za koje se smatra da imaju ulogu u procesu transkripcije. Sa druge strane, kada su koncentracije slobodnih N i P molekula uravnotežene, formiraju se heterologni kompleksi, najčešće u odnosu 2N:1P, slično kao u samom virusu. Na taj način oni ostaju u obliku koji im omogućava efikasnu inkapsidaciju virusne RNK (Gigant i sar., 2000).

Način na koji se L virusni protein dodaje nukleokapsidnom kompleksu nije u potpunosti poznat, ali se veruje da P protein u RNK – N – P kompleksu ima ulogu medijatora u tom procesu (Wunner, 2002).

Nakon toga, M virusni protein se vezuje za ribonukleoproteinsko jezgro, pri čemu dolazi do kondenzacije RNP kalema, što je događaj koji inicira pupljenje virusa (Mebatsion i sar., 1996). M protein potom odvodi ribonukleoproteinski kalem do ćelijske membrane, gde je koncentrisan nascentni virusni G protein, sa kojim se spaja

formirajući virusnu česticu. U zreloj virusnoj čestici, koja se pupljenjem oslobađa sa površine ćelije domaćina, M protein leži između dvoslojnog lipidnog omotača koji je formiran u interakciji sa membranom ćelije domaćina, i helikoidnog ribonukleoproteina. Smatra se da on ima važnu ulogu u morfogenezi virusa besnila (sam proces pupljenja je znatno manje efikasan u odsustvu ili manjku M molekula) i da je zaslužan za karakterističan oblik virusne čestice (Wunner, 2002).

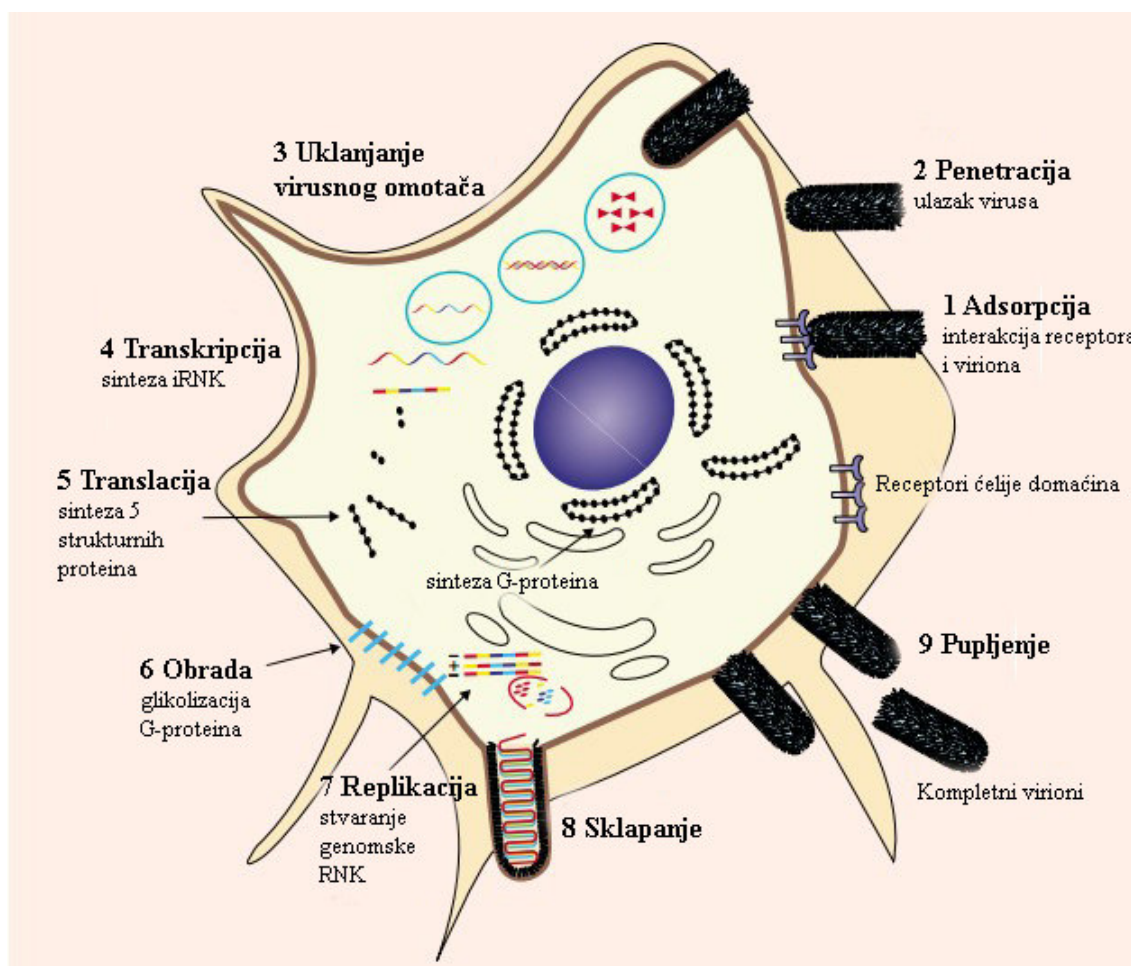
U završnoj fazi formiranja virusne čestice, zreli virioni dobijaju svoju dvoslojnu lipidnu ovojniciu prilikom pupljenja kroz plazma membranu ćelije domaćina. Pupljenje zrelih virusnih čestica kroz plazma membranu je uobičajeno kod ekstraneuralnih tkiva *in vivo*, kao i kod mnogih ćelijskih kultura *in vitro*. Ponekad, virioni sazrevaju i u citoplazmi inficiranih ćelija centralnog nervnog sistema, i to pupljenjem kroz Goldžijev kompleks ili još češće kroz endoplazmatski retikulum ćelije domaćina. Ukoliko se na mestu pupljenja virusa u plazma membrani nalaze molekuli G virusnog proteina, stvoriće se infektivni virioni, na čijoj će se površini nalaziti šiljci G trimera.

Međutim, pupljenje se može dogoditi i na onim mestima gde u plazma membrani nema G proteina. U tom slučaju sam proces pupljenja je znatno manje efikasan, stvaraju se male količine neinfektivnih virusnih čestica na čijoj površini nema pomenutih šiljaka. Ukoliko se pupljenje vrši kroz membrane endoplazmatskog retikuluma ili Goldžijevog kompleksa, virusne čestice dospevaju u lumen vezikula, koje se potom izbacuju iz ćelije domaćina uobičajenim sekretornim putevima (Mebatsion i sar., 1996; Wunner, 2002)

### **Širenje virusa**

Nakon izlaska iz ćelije domaćina, novostvorena virusna čestica se može širiti na susedne ćelije, koje su u direktnom kontaktu sa ćelijom-domaćinom, ili na ćelije koje su okružene intersticijalnim prostorom. U prvom slučaju, virus besnila se širi uprkos prisustvu serum neutralizacionih antitela. Kod indirektnog širenja virusa, odnosno širenja virusa na ćelije okružene intersticijumom, serum neutralizaciona antitela blokiraju vezivanje virusa za receptore i time otežavaju ulazak virusa u prijemčivu ćeliju (Flamand i sar., 1993; Wunner, 2002). *In vivo*, virus besnila se može širiti u samoj

ćeliji, što naročito važi za ćelije perifernih nerava i centralnog nervnog sistema, intraaksonalnim transportom kroz mrežu mikrotubula. Na ovaj način virus može da pređe velika rastojanja, naročito u bipolarnim neuronima, pre nego što naiđe na sinapsu (Wunner, 2002). Postavljena je i pretpostavka da je moguć intraaksonalni, odnosno interneuronski transport ogoljenog virusnog nukleokapsida, međutim novija istraživanja su dokazala da je za transsinaptički transport virusa besnila neophodno prisustvo molekula G virusnog proteina (Etesami i sar., 2000).



Šema 2. Prikaz intracelularnog životnog ciklusa virusa besnila (Rupprecht i sar., 2002)

### 2.2.3. Otpornost virusa na fizičke i hemijske agense

Virus besnila nije otporan u spoljašnjoj sredini. Optimalna kiselost sredine za virus besnila je 6,4-7,0. Promenom pH vrednosti prema kiselosti njegova koncentracija se naglo smanjuje, a pri pH 3,0-3,5 virus se inaktivira u roku od pola sata (Ercegovac, 1987).

Prilikom delovanja toplote stabilnost virusa se takođe brzo smanjuje. Pri 18°C nakon 23 dana, a pri 37°C nakon 120 sati ne može se više dokazati njegova infektivnost. U jednoprocennoj suspenziji virulentnog mozga, temperatura od 60 °C uništava aktivnost virusa za dva minuta. Temperatura od 80 °C uništava ga za dva minuta u svakoj sredini. Hladnoća, naprotiv, povoljno deluje na aktivnost virusa. Delovi mozga na temperaturi od 4 °C ostaju nedeljama virulentni, ako je sprečeno njihovo isušivanje. Smrznuti delovi virulentnog mozga zadrže mesecima svoju prvobitnu virulenciju. Na -70 °C virus može ostati aktivan i nekoliko godina.

Truležni i autolitički procesi lagano slabe aktivnost virusa besnila, naročito na nižim temperaturama. Na 10 °C virus u mozgu ostaje aktivan i nakon 72 dana, a u mozgu ekshumiranih leševa dokazan je i nekoliko nedelja nakon uginuća.

Sunčeva svetlost inaktivira virus za dva sata, a ultravioletni zraci za pet minuta. Inaktivirajuće deluje i ultrazvuk, kao i elektronski i gama zraci. Virus je u tečnoj pljuvački aktivan i nakon 24 časa, dok u sasušenoj gubi virulenciju nakon 14 časova (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989).

Od hemijskih sredstava treba pomenuti glicerol, koji deluje kao svojevrsni konzervans, pa se njegov 50% rastvor koristi za održavanje aktivnosti virulentnog materijala. Dokazano je da ulični soj virusa u mozgu držanom u glicerolu na temperaturi frižidera može da ostane aktivan i do dve i po godine.

Formalin u koncentraciji 0,15% ubija potpuno virus za 24 časa na temperaturi 37 °C. Dvopostotni rastvor sode uništava virus za nekoliko minuta, a slično deluje i 1% rastvor kalijum-permanganata, 2% sumporna kiselina, 5% karbolna kiselina i vodeni



rastvor hlora i broma. Jod i vodonik peroksid slabije deluju na virus besnila. Želudačni sok ga uništava za 5 sati, a žuč za nekoliko minuta (Ercegovac, 1987).

## 2.3. Epizootiologija

Besnilo je bolest sisara, koju izaziva virus iz familije *Rhabdoviridae*. Predstavnici ove familije mogu se umnožavati u kičmenjacima, beskičmenjacima i biljkama. Sam virus besnila se *in vitro* može umnožavati u kulturama tkiva hladnokrvnih kičmenjaka, dok su takvi pokušaji *in vivo* do sada bili bezuspešni (Seganti i sar., 1990). Ptice su prijemčive na infekciju virusom besnila u eksperimentalnim uslovima, ali je virus ograničen samo na centralni nervni sistem i efikasno ga neutrališe odbrambeni sistem domaćina. Verovatno zbog toga virus ne može da dođe do odgovarajućih izlaznih vrata, u ovom slučaju pljuvačnih žlezda. Iako su ranije postojali nepotvrđeni izveštaji, u novijem periodu nisu dokazani slučajevi prirodne infekcije kod ptica, uprkos znatno savremenijim dijagnostičkim tehnikama. Sem toga, ni serološka istraživanja na divljim pticama nisu potvrdila postojanje specifičnih antitela na virus besnila (Shannon i sar., 1988; Niezgoda i sar., 2002).

Adaptacija virusa besnila na određene životinjske vrste koje imaju relativno uzak opseg metabolički regulisanih telesnih temperatura mogao je biti efikasan način njegove evolucije. Homeotermi sa zubima i socijalnim ponašanjem se čine kao idealni "inkubatori" virusa besnila, naročito ako se uzme u obzir da je za infekciju potrebna duboka intramuskularna inokulacija virusa ili obilna salivarna kontaminacija mukoznih membrana. Izumrli preci današnjih ptica imali su zube, ali njihovo odsustvo, kao i ograničen razvoj pljuvačnih žlezda kod sadašnjih pripadnika ove klase kičmenjaka, zajedno sa razlikama u sociobiologiji i demografiji u odnosu na sisare, su verovatno faktori koji su uticali na različit afinitet lisavirusa prema pticama i sisarima (Niezgoda i sar., 2002).

Međutim, ove pretpostavke ne objašnjavaju u potpunosti specifičnosti virusa besnila u odnosu na druge rabdoviruse, kao ni poreklo neurotropizma ili favorizovanje jedne grupe kičmenjaka kao domaćina. Eventualni izolati virusa besnila iz ptica se čine beznačajnim, ako se imaju u vidu prilagodljivost i istrajnost rabdovirusa, što se ogleda u njihovoj širokoj rasprostranjenosti kod biljaka, beskičmenjaka, riba, vodozemaca, gmizavaca i sisara. Slično tome, od preko četiri hiljade vrsta sisara, koje su u teoriji prijemčive na virus besnila, samo nekoliko vrsta predstavlja glavne rezervoare bolesti. Svi rezervoari besnila su istovremeno i vektori, tj. sposobni su za transmisiju bolesti, ali nisu svi vektori bolesti ujedno i njeni rezervoari.

Uspešnost infekcije virusom besnila zavisi od tri glavna događaja: početnog direktnog kontakta virusne čestice sa površinom ćelije domaćina; replikacije nukleinske kiseline, transkripcije virusnih gena i translacije proteina, što rezultira sklapanjem virusnih čestica; i izlaska virusa iz ćelije domaćina i započinjanja novog ciklusa. Strategija ulaska, umnožavanja i izlaska virusa iz ćelije domaćina, u korelaciji sa biohemijskim i ćelijskim nivoom organizacije celog organizma, čini osnovu prijemčivosti, odnosno prirodne sposobnosti životinje da oboli i postane infektivna za druge. Teoretski, jedna virusna čestica je dovoljna za infekciju, ali u praksi je za to potreban veći broj infektivnih jedinica. Vrlo prijemčive vrste bi u teoriji bile one kod kojih je mali broj virusnih čestica dovoljan za izazivanje produktivne infekcije (Niezgoda i sar., 2002).

Prijemčivost na virus besnila u najvećoj meri zavisi od osobina vrste, a u manjoj meri od individualnih osobina domaćina, na primer imunološkog statusa ili starosti. Međutim, važno je istaći da su svi zaključci vezani za prijemčivost vrste izvedeni na osnovu određenih eksperimentalnih istraživanja ili dostupnih epidemioloških podataka i veoma su ograničeni, jer je nemoguće uzeti u obzir različite virusne izolate, ekološke karakteristike vrste koji umnogome utiču na rizik infekcije, kao i ograničenja u broju i izvoru pregledanih uzoraka. U praksi, takozvane visoko rizične vrste su pripadnici familija *Canidae* (pas, lisica, kojot), *Viverridae* (mungos), *Procyonidae* (rakuni), kao i tvorovi i slepi miševi. Umereno rizične vrste su *Felidae* (mačke), *Mustelidae* (jazavac, lasica, kuna), kopitari i primati. U niskorizične vrste ubrajaju se insektivori, glodari, zečevi i torbari. Na primer, oposum je vrsta koja je relativno otporna na virus besnila, a

tome u prilog, pored eksperimentalnih studija, govori i činjenica da se u Severnoj Americi godinama beleži veoma mali broj prirodnih infekcija među pripadnicima ove vrste. Uz to, oposumi dele prirodno stanište sa rakunima, koji predstavljaju jedan od glavnih rezervoara i vektora besnila (Niezgoda i sar., 2002). Međutim, i pored toga sve vrste sisara se još uvek smatraju prijemčivim za virus besnila, čak i morski sisari. Zabeležen je slučaj foke u Norveškoj koja je imala ujedne rane na telu i pokazivala znake agresivnosti i kod koje je potvrđeno besnilo. Pretpostavlja se da ovaj slučaj ima veze sa epizootijom besnila među arktičkim lisicama u toj oblasti (Odegaard i Krogsrud, 1981).

Rezervoarima besnila smatraju se one vrste sisara kod kojih se određeni soj virusa može konstantno održavati unutar vrste u određenoj geografskoj oblasti. Na to umnogome utiče i geografska distribucija, brojnost i gustina populacije, kao i neki sociološki momenti (kontakti među jedinkama i sl.). Pored toga, održavanje virusa u ovakvoj populaciji, mogu se iskoristiti i potencijalno kompetentne koegzistirajuće vektorske vrste, koje se često preklapaju i veoma su bliske sa rezervoarima bolesti u ekološkim i sociološkim karakteristikama. Primer za to je prenošenje virusa besnila na pse u pograničnim oblastima Meksika i Teksasa osamdesetih godina prošlog veka, u čemu je veliku ulogu odigrala populacija kojota kao novog rezervoara virusa (Clark i sar., 1994; Niezgoda i sar., 2002).

Pored vrste domaćina, podjednako važnu ulogu u infekciji imaju i specifične osobine virusnog izolata, njegovo poreklo, istorija pasaža, koncentracija i način inficiranja. Transmisija kroz intaktnu kožu nije moguća, pa se stoga običan kontakt ne smatra ekspozicijom. Međutim, postavlja se pitanje da li neke uobičajene aktivnosti, poput predatorstva, ishrane leševima ili ektoparazitoza mogu doprineti prenošenju virusa. U vezi sa tim, treba imati u vidu da se virus besnila umnožava u specifičnoj niši, nervnom tkivu sisara, i da ne preživljava van domaćina. Ultravioletno zračenje, ekstremne pH vrednosti, organski rastvarači, isušivanje, toplota i putrefakcija dovode do relativno brze inaktivacije virusa, obično za nekoliko dana. Upravo zbog toga spoljašnja sredine ne igra bitnu ulogu u transmisiji virusa (Niezgoda i sar., 2002).

Način ekspozicije koji najčešće dovodi do infekcije virusom besnila je svakako ujed. Oralna ekspozicija, najčešće ishrana zaraženim leševima, takođe može rezultirati

infekcijom, ali u znatno manjem procentu. Verovatnoća transmisije virusa se može povećati ukoliko koštani fragmenti kontaminirani visoko infektivnim materijalom (mozak, pljuvačne žlezde) oštete sluznicu usne duplje ili jednjaka. Pretpostavlja se da oralni put prenošenja virusa ima veoma važnu ulogu u održavanju besnila u populaciji arktičkih lisica, gde su kontakti među potencijalnim domaćinima minimalni, ali se virus može jako dugo održati u zaleđenim leševima (Crandell, 1991). Kontaminacija drugih mukoznih membrana, na primer oka i nosa, takođe se smatra potencijalnom ekspozicijom. Međutim, potrebno je istaći da se ovakav stav temelji na slučajevima infekcije ljudi koji su nastali nakon transplantacije rožnjače, i na slučajevima gde se mogla dogoditi kontaminacija sluznica. Zavisno od doze, oralna ekspozicija ne mora izazvati fatalnu infekciju. Kod određenog broja životinja razvije se klinički simptomi besnila, dok određen broj može postati imun. Intranazalna ekspozicija dovodi do infekcije češće nego oralna, ali ipak znatno ređe u odnosu na intramuskularnu inokulaciju. Transmisija virusa aerosolom je takođe moguća. Poznati su slučajevi zaražavanja laboratorijskog osoblja na ovaj način, a u prirodnim uslovima je zabeležen slučaj zaražavanja speleologa u pećini sa milionskim brojem zaraženih slepih miševa (Niezgoda i sar., 2002). Direktna kontaminacija otvorene rane infektivnim materijalom (npr. pljuvačka ili moždano tkivo) se takođe smatra ekspozicijom i može dovesti do razvoja bolesti.

I sam tip virusnog izolata u velikoj meri utiče na prijemčivost domaćina na infekciju i čini se da je specifično adaptiran na svaku rezervoarsku vrstu. Virusni sojevi mogu posedovati karakteristike koje direktno utiču na tropizam, ponašanje domaćina ili kliničku sliku bolesti, pa zbog toga i prijemčivost onih vrsta koje nisu rezervoari besnila na virus može umnogome da varira. Štaviše, patogeneza bolesti kod ovakvih vrsta može da se znatno razlikuje od one kod rezervoara. Na primer, "pseći virus" može kod rakuna da izazove perakutni encefalitis, koji rezultira uginućem i pre nego što se virus nađe u pljuvački (Hamir i sar., 1996), dok "rakunski virus" kod pasa može da izazove blaži oblik bolesti, favorizujući transmisiju virusa u novoj vrsti domaćina (Niezgoda i sar., 2002).

Besnilo domaćih životinja aktuelno je i u dvadeset prvom veku i još uvek predstavlja pretnju po zdravlje ljudi. Psi i dalje u mnogim zemljama u razvoju

predstavljaju glavne rezervoare besnila, dok su druge domaće životinje uključene u sekundarnu transmisiju virusa koji se održava u populaciji pasa ili divljih životinja. Za prenošenje bolesti veoma važni su psi mlađi od godinu dana. Pre svega, oni čine veliki udeo u populaciji pasa, smatra se da su prijemčiviji na besnilo od starijih životinja, a i u vakcinisanih mladih pasa imunitet je često diskutabilan. Psi obično izlučuju virus pljuvačkom deset dana pre pojave prvih kliničkih simptoma besnila, ali su u literaturi poznati slučajevi takozvanih kliconoša, koji su imali veoma dug inkubacioni period tokom kojeg su izlučivali virus (Childs, 2002).

Za razliku od virusa besnila koji su izolovani iz divljih životinja, pseći izolati iz različitih delova sveta su genetski i antigenski veoma slični. Štaviše, oni su veoma slični i vakcinalnom soju virusa besnila iz tridesetih godina prošlog veka. Ova činjenica se objašnjava pretpostavkom da su svi pseći izolati u stvari deo globalnog rezervoara virusa besnila i da potiču iz istog izvora. Njihova sličnost je u stvari posledica kolonizacije od strane Evropljana i unošenja inficiranih životinja na nove lokalitete (Smith i Seidel, 1993; Childs, 2002).

Virus koji cirkuliše u populaciji pasa, naročito u urbanim područjima predstavlja najveću pretnju za ljude. Enzoosko besnilo kod pasa se može kontrolisati ili suzbiti samo sveobuhvatnim programima vakcinacije i kontrole. Sem toga, vakcinacija pasa je jako bitna i u oblastima gde nema enzooskog besnila pasa, jer se na taj način populacija čuva od silvatičnog besnila, odnosno virusa koji cirkuliše među divljim vrstama. Literaturni podaci govore da je nivo vakcinacije populacije pasa od 70% dovoljan da spreči transmisiju virusa i pojavu žarišta (Beran, 1991; Coleman i Dye, 1996).

Kontrola internacionalnog transporta pasa je takođe veoma važna u preveniranju pojave besnila. Lokacije i države slobodne od besnila (npr. Ujedinjeno Kraljevstvo i Japan) imaju striktne zakone koji u zavisnosti od zemlje porekla životinje zahtevaju i šestomesečni karantin prilikom ulaska u zemlju. Između ostalog i to predstavlja razlog što je Britanija slobodna od besnila još od 1922. godine. Doduše, poslednjih godina su i u ovim državama propisi donekle promenjeni, odnosno uvedene su alternativne mere bezbednosti kojima se karantin u mnogim situacijama skraćuje ili ukida (Childs, 2002).

Mačke predstavljaju važne incidentne domaćine i kariku u lancu prenošenja besnila na ljude i domaće životinje. U poslednjih dvadeset godina u Sjedinjenim Američkim Državama mačka je najbrojnija vrsta domaćih životinja kod kojih je laboratorijski potvrđeno besnilo. Na primer, u 1998. godini je prijavljeno 282 besne mačke, a svega 113 pasa kod kojih je utvrđeno besnilo. Ovi slučajevi uglavnom potiču iz oblasti u kojima je endemično besnilo kod rakuna (Krebs i sar., 1999). Slično je i u Evropi, u poslednjim decenijama dvadesetog veka znatno je više laboratorijski potvrđenih slučajeva besnila u mačaka nego u pasa. Sem toga, većina ovih slučajeva predstavlja ekspoziciju ljudi, pa stoga dobijaju još više na značaju. Ilustracije radi, 1998. godine u Francuskoj je sprovedeno 88 postekspozicionih tretmana ljudi nakon ozleđivanja od strane pasa, a 285 nakon ozleđivanja od strane mačaka kod kojih je laboratorijski potvrđeno besnilo (Sureau, 1990).

Mačke kod kojih je potvrđeno besnilo su uglavnom nevakcinisane, i u velikom broju slučajeva nepoznatog vlasnika. Kao i kod pasa, većinom su mlade životinje, mlađe od godinu dana, a vrlo često se radi o neprovociranom ozleđivanju ljudi. Interesantno je i da je mogućnost inficiranja virusom slepih miševa znatno veća kod mačaka nego kod pasa, a ovakvi slučajevi su dokazani u Sjedinjenim Državama i Latinskoj Americi (Smith, 1988; Diaz i sar., 1994). Transmisija virusa besnila na mačke dešava se u svim područjima gde je virus endemičan, a mačiji ujedi predstavljaju pretnju po zdravlje ljudi u većini lokacija u svetu. Besnilo mačaka je laboratorijski dokazano i u zemljama u razvoju, ali je frekvencija znatno manja nego među psima, i čini svega 2% slučajeva u Aziji, 6% u Latinskoj Americi i 9% u Africi (Childs, 2002).

Važno je napomenuti da su mačke uključene u transmisiju i drugih lisavirusa (npr. Mokola virusa) na ljude, i da se njihov značaj za javno zdravlje ne može proceniti samo na osnovu trenutne situacije u zemljama gde je besnilo pasa endemski prisutno (Childs, 2002).

U ekonomskom smislu besnilo goveda predstavlja veliki problem, naročito u Argentini u Meksiku, gde se javlja endemsko paralitičko besnilo goveda, čiji su glavni rezervoari i vektori slepi miševi vampiri. Troškovi izazvani besnilom goveda su 1980. godine procenjeni na 500 miliona dolara (Baer, 1991). U Severnoj Americi se godišnje prijavi preko stotinu slučajeva besnila kod goveda, i to uglavnom u područjima gde

postoji besnilo rakuna ili tvorova (Krebs i sar., 1999). U južnim delovima Afrike govedo predstavlja drugu najbrojniju vrstu domaćih životinja kod koje je ustanovljeno besnilo, a glavni vektor su šakali (King i sar., 1994). U ostalim delovima sveta besnilo goveda predstavlja sporadičan problem.

Crvena lisica (*Vulpes vulpes*) predstavlja jednu od najrasprostranjenijih vrsta mesojeda u svetu, i svakako glavni rezervoar besnila. Besnilo lisica se pominje u zapisima starijim od hiljadu godina, a u zapadnoj i centralnoj Evropi je bilo prilično često tokom srednjeg veka. Tokom devetnaestog veka je bilo prisutno širom Evrope, da bi u prvim decenijama dvadesetog veka broj žarišta naglo opao. Tridesetih godina prošlog veka ponovo se povećao broj žarišta, prvo u istočnoj Evropi, a potom je došlo deo njenog širenja na gotovo čitav kontinent, sve do početka oralne vakcinacije lisica krajem sedamdesetih godina, od kada je u regresiji (Blancou, 1988; Steele i Fernandez, 1991; Blancou i sar., 1991). U Severnoj Americi velika epidemija besnila kod crvenih i arktičkih lisica je počela u Kanadi četrdesetih, da bi se šezdesetih godina dvadesetog veka proširila na severoistočne države SAD (Childs, 2002).

Smatra se da je virus besnila koji je prisutan kod lisica u Evropi nastao adaptacijom psećeg virusa na promene ekološke ravnoteže koje su se desile tokom Drugog svetskog rata. Kasnije su fizičke barijere dovele do lokalizovane evolucije nekoliko genetičkih linija virusa besnila u populacijama evropskih lisica (Blancou, 1988; Bourhy i sar., 1999). Poreklo virusa besnila kod lisica u Severnoj Americi nije potpuno jasno, ali se pretpostavlja da vodi poreklo iz populacije arktičkih lisica (Blancou, 1988).

Prijemčivost životinjskih vrsta na virus besnila najveća je kod crvene lisice (*Vulpes vulpes*), kao i procenat životinja koje izlučuju virus, dok kod drugih vrsta pogresivno opada. Lisice su znatno otpornije na besnilo ako se inficiraju izolatima poreklom iz pasa, rakuna ili slepih miševa. Postinfektivni imunitet kod lisica usled velike prijemčivosti praktično ne postoji, što zajedno sa visokim stepenom izlučivanja virusa stvara veoma povoljne uslove za utemeljivanje virusa u određenoj populaciji (Blancou, 1988; Blancou i sar., 1991).

Iako lisica nije više predodređena da bude vektor i rezervoar besnila nego neke druge životinjske vrste, neke njene karakteristike umnogome to potenciraju: lisica je ubikvitarna vrsta u palearktičkoj zoni, i mapa njene rasprostranjenosti se gotovo podudara sa mapom raširenosti besnila; kapacitet prilagođavanja svakom okruženju, čak i onom gusto naseljenom ljudima, i lako prevazilazi prirodne i veštačke prepreke; prirodna plodnost, koja je povezana sa načinom ishrane, specifičnom reproduktivnom fiziologijom i relativno dugim životnim vekom, faktorima koji omogućavaju brz oporavak nakon smanjenja populacije i obezbeđuju adekvatan broj vektora i rezervoara virusa; i na kraju njena etologija – kao socijalna i teritorijalna životinja, besna lisica ’’rado deli’’ virus besnila sa svojim komšijama. Iako su ove karakteristike prisutne i kod drugih karnivora (pasa, rakuna, mungosa), njihova kombinacija kod lisica je, čini se, izuzetno efikasna (Blancou, 1988).

Slepi miševi koji se hrane krvlju, takozvani vampiri (*Desmodus rotundus*), su prvi put označeni kao vektori besnila 1911. godine u Brazilu, kada je dokazano da su oni preneli virus besnila na govedo. Prvi slučajevi besnila ljudi koji su nastali kao rezultat ujeda slepih miševa zabeleženi su tridesetih godina prošlog veka na Trinidadu, a kasnije su prijavljeni i u Peruu (Lopez i sar., 1992), Brazilu (Batista da Costa i sar., 1993), Venecueli (Caraballo, 1996) i Meksiku (Martinez-Burnes i sar., 1997). Oni se uglavnom hrane krvlju krupne stoke, i mogu dovesti do velikih ekonomskih gubitaka izazivajući paralitički oblik besnila. Procenjuje se da je tokom šezdesetih godina u Latinskoj Americi od besnila stradalo i do pola miliona grla goveda. Zbog toga su mere kontrole usmerene prema populaciji ovih životinja, počev od tretiranja uhvaćenih slepih miševa antikoagulansima, do tretiranja krda goveda sistemskim preparatima koji su smanjili broj ujeda i do 95 % (Flores-Crespo i Arellano-Sota, 1991; Childs, 2002).

Kolonije slepih miševa vampira nakon infekcije virusom besnila često budu desetkovane i ne mogu lako vratiti brojnost, a samim tim i održati transmisiju virusa. Upravo zbog toga je održavanje gustine njihove populacije blizu kritične preporučeno kao efikasna kontrolna strategija (Delpietro i Russo, 1996).

Slepi miševi insektivori su kao rezervoari besnila označeni 1953. godine, kada je na Floridi besnilo laboratorijski dokazano kod slepog miša koji je napao dečaka. Od



tada, broj slučajeva besnila kod slepih miševa raste iz godine u godinu, a 1998. godine je dostigao 992 (Krebs i sar., 1999; Childs, 2002).

Besnilo među ovim sisarima postalo je naročito interesantno u poslednjoj deceniji dvadesetog veka, tokom koje je u SAD od 32 slučajeva besnila kod ljudi 24 bilo izazvano virusom koji vodi poreklo iz slepih miševa, i to mahom iz dve vrste: *Lasionycterus noctivagans* i *Pipistrellus subflavus* (Noah i sar., 1998). Interesantno je da slepi miševi u tom periodu nisu donošeni na laboratorijsko testiranje na besnilo tako često kao druge vrste životinja. Takođe, treba istaći da je prevalenca besnila najveća kod vrsta koje žive usamljениčki ili u manjim kolonijama, nego kod onih koje formiraju velike kolonije (Childs i sar., 1994).

Zbog teško sprovodljivih mera kontrole bolesti, naročito vakcinacije, njihove brojnosti i geografske rasprostranjenosti, slepi miševi danas predstavljaju najčešći izvor humanog besnila u delovima Severne Amerike, Južne Amerike (Čile), zapadne Evrope i Australije, naročito u oblastima gde je besnilo divljih mesojeda suzbijeno i kontrolisano (Niezgoda i sar., 2002).

## 2.4. Patogeneza

Virus besnila u najvećem broju slučajeva u telo životinje ili čoveka dospeva preko rane nastale ujedom besne životinje, ili ubodom i grebanjem materijalom koji je zaražen virusom. Samo u retkim prilikama dokazan je ulazak virusa u organizam udisanjem, posredstvom aerosola. Na životinjskom modelu utvrđeno je da virus može ostati na ulaznim vratima infekcije ili u neposrednoj blizini dve nedelje do nekoliko meseci, a da sa druge strane umnožavanje virusa na ulaznim vratima možda i nije neophodno za početak infekcije (Cvetnić, 1989).

Rane studije o patogenezi besnila, koje su izvođene sa ciljem utvrđivanja puteva i brzine širenja virusa, zasnivane su na amputaciji udova eksperimentalnih životinja

proksimalno od mesta aplikacije virusa. Utvrđeno je da se amputacijom može sprečiti razvoj besnila, i da je suštinski važno vreme kada se taj zahvat obavi. U kasnijim eksperimentima, u kojima je umesto amputacije vršeno presecanje nerava, ustanovljeni su isti rezultati. Na ovaj način je dokazano da kod razvoja besnila postoji inkubacioni period u toku kojeg se virus kreće perifernim nervima od mesta inokulacije do centralnog nervnog sistema (Jackson, 2002a).

U prirodnim uslovima, inkubacioni period obično traje između 20 i 90 dana, kod ljudi po pravilu duže nego kod životinja, u veoma retkim slučajevima i preko godinu dana. Još uvek nije u potpunosti poznato šta se sve dešava u toku tog perioda. Postoje neke pretpostavke da na mestu infekcije makrofagi mogu da izoluju virus besnila (Ray i sar., 1995), ali one još uvek nisu potvrđene u eksperimentalnim studijama. U eksperimentu na tvorovima koji su zaraženi kanadskim izolatom uličnog virusa, nakon 62-64 dana, metodom RT-PCR dokazano je prisustvo virusnog genoma u mišićnim ćelijama, ali ne i u spinalnim ganglijama i kičmenoj moždini (Charlton i sar., 1997). Imunohistohemijski je infekcija takođe dokazana u skeletnim mišićima i fibrocitima na mestu inokulacije, i to pre pojave kliničkih simptoma bolesti. Na osnovu ovoga se može zaključiti da je virus prisutan na mestu ujeda u toku većeg dela inkubacionog perioda. Iako nije u potpunosti jasna, infekcija mišićnih vlakana je značajna u patogenezi bolesti, odnosno težnji virusa da uđe u periferni nervni sistem (Jackson, 2010).

Međutim, kod miševa eksperimentalno inficiranih fiksiranim virusom besnila, nije zabeležena rana infekcija mišićnog niti drugih ekstraneuralnih tkiva (Coulon i sar., 1989). Trideset sati nakon inokulacije fiksiranog virusa u maseter eksperimentalnih miševa, prisustvo virusne RNK nije utvrđeno u mišićnom tkivu na mestu inokulacije, a utvrđeno je u trigeminalnim ganglijama i moždanom stablu (Shankar i sar., 1991). Ovim eksperimentima je dokazano da je virus besnila sposoban da u periferni nervni sistem uđe direktno, bez prethodnog replikacionog ciklusa u ekstraneuralnim tkivima, što umnogome skraćuje inkubacioni period. Nažalost, ovi modeli daju malo informacija o dešavanjima kod dugih inkubacionih perioda besnila u prirodnim uslovima (Jackson, 2002a).

Eksperimentalno je dokazano da se virus besnila prilikom ulaska u periferne nerve vezuje za acetilholinske receptore na neuromišićnim sinapsama. Upravo

neuromišićna sinapsa predstavlja glavno mesto ulaska virusa u neurone (Lenz i sar., 1982; Lewis i sar., 2000). Pretpostavlja se da vezivanje virusa za ove receptore indukuje endocitozu, pošto su virusne čestice dokazane u endozomima neurona (Lenz i sar., 1986). Kisela unutrašnost endozoma izaziva fuziju membrane endozoma i virusa, pri čemu se virusni nukleokapsid oslobađa u citoplazmu neurona.

Različita prijemčivost za infekciju virusom besnila na nivou vrste je poznata više vekova. Nakon intramuskularne inokulacije virusa, utvrđeno je da su lisice veoma osetljive na infekciju, psi su manje osetljivi, a oposumi najotporniji. Istovremeno je utvrđena značajna razlika u broju receptora u mišićnom tkivu lisice i oposuma (Baer i sar., 1990). Zbog toga se pretpostavlja da je prijemčivost vrste na virus besnila, bar delom, u vezi sa brojem acetilholinskih receptora u njihovim mišićima (Jackson, 2002a).

Velika većina slučajeva besnila kod ljudi u Severnoj Americi koji nemaju istoriju ujeda, nastali su površinskim i ponekad neprimetnim ujedom zaraženih slepih miševa, što je dokazano molekularnom karakterizacijom virusa (Noah i sar., 1998). Eksperimentalna istraživanja pokazala su da se virus izolovan iz slepih miševa jako dobro razmnožava na temperaturi nešto nižoj od telesne (34°C), kao i da ima znatno višu infektivnost prema ćelijama koje su prisutne u koži, kao što su fibrociti i ćelije epitela, nego virusi besnila izolovani iz drugih životinjskih vrsta (Morimoto i sar., 1996). Ipak, nije potpuno jasno kako i na kojim mestima nakon površinske infekcije virus invadira periferne nerve u koži i potkožnom tkivu (Jackson, 2002a).

Infekcija virusom besnila preko olfaktorne i oralne sluznice je neuporedivo ređa nego ujedom. Dokazan je slučaj inficiranja ljudi preko vazduha u pećinama u kojima su se nalazili milioni slepih miševa (Constantine, 1962; Jackson, 2002a), i u laboratorijskim incidentima sa virusom u obliku aerosola. Eksperimentalnim zaražavanjem zamoraca, miševa i hrčkova utvrđeno je da sluznica gornjih respiratornih puteva može biti mesto ulaska virusa besnila u organizam (Jackson, 2002a). Sem toga, antigen virusa besnila dokazan je u receptorskim ćelijama olfaktorne sluznice slepih miševa, koji su prirodno inficirani u pećinama Meksika (Constantine i sar., 1972). Ipak, smatra se da je neophodno prisustvo jako velikog broja zaraženih slepih miševa u

neventilisanom prostoru da bi došlo do prenošenja virusa besnila preko vazduha (Jackson, 2002a).

Oralno prenošenje virusa besnila se može desiti u prirodnim uslovima, kada divlje životinje jedu leševe besnih životinja, ili, što je u nekim kulturama običaj, kada ljudi jedu sveže pseće meso. Kod miševa i tvorova koji su eksperimentalno peroralno zaraženi uličim sojem virusa, zapažena je mala prijemčivost. Kod peroralno zaraženih miševa, zamoraca i hrčkova, virusni antigen nije dokazan u intestinalnoj mukozni, ali je dokazan u neuronima Auerbahovog i Majsnerovog pleksusa želuca i creva (Fischman i Schaeffer, 1971; Charlton i Casey, 1979). Sve ovo govori u prilog pretpostavci da se ulazak virusa oralnim putem odvija preko lezija na gastrointestinalnoj sluznici. Ipak, značaj oralne transmisije virusa besnila u prirodnim uslovima nije u potpunosti ispitan (Jackson, 2002a).

Sa mesta ulaska u organizam, virus besnila se centripetalno kreće ka centralnom nervnom sistemu. To kretanje se odvija u motornim, a možda i senzornim aksonima perifernih nerava. Aplikacijom kolhicina, inhibitora brzog aksonalnog transporta, u išijadični nerv pacova, zaustavljeno je dalje napredovanje virusa besnila ka centralnom nervnom sistemu. Na taj način dokazano je da virus putuje sa mesta ulaska ka centralnom nervnom sistemu retrogradnim brzim aksonalnim transportom. Korišćenjem kulture ćelija humanih neurona dorzalnih ganglija dokazano je da se virus transportuje brzinom od 50 do 100 mm na dan (Tsiang i sar., 1991). Novija istraživanja su pokazala da fosfoprotein virusa besnila, koji ulazi u sastav ribonukleoproteinskog kompleksa, reaguje sa lakim lancem (LC8) dineina, važnom komponentom aktinskog transporta (važan u ranoj fazi infekcije) i mikrotubulinskog transporta (važan za brzi aksonalni transport) (Jacob i sar., 2000; Raux i sar., 2000). Eksperimentima na miševima i hrčcima dokazano je da se virus besnila može gotovo istovremeno naći u motornim neuronima kičmene moždine i primarnim senzornim neuronima dorzalnih ganglija (Coulon i sar., 1989; Jackson and Reimer, 1989). Međutim, novijim istraživanjima zasnovanim na molekularnim tehnikama, koja su vršena na pacovima i rezus majmunima, u prvim danima nakon infekcije nije ustanovljeno prisustvo virusa u primarnim senzornim neuronima (Shankar i sar., 1991; Kelly i Strick, 2000). Ova istraživanja govore da je motorni put ipak znatno važniji od senzorskog u širenju virusa

besnila ka centralnom nervnom sistemu. Još uvek nije potpuno jasno da li su rezultati ranijih istraživanja nastali zbog korišćenja različitih životinjskih vrsta u eksperimentima ili nedostataka u dijagnostici (Jackson, 2002a).

Kada neuroni centralnog nervnog sistema, najčešće kičmene moždine, postanu inficirani virusom besnila, dolazi do brzog širenja infekcije kroz neuroanatomske puteve. Virus besnila se kroz centralni nervni sistem širi kao i kroz periferni, brzim aksonalnim transportom (Jackson, 2002a), što je dokazano eksperimentima na pacovima (Gillet i sar., 1986; Ceccaldi i sar., 1989). Ispitivanja na eksperimentalno inficiranim rezus majmunima govore da se virus besnila u centralnom nervnom sistemu širi isključivo pomoću retrogradnog aksonalnog transporta, dok se transsinaptički transport takođe vrši isključivo u retrogradnom smeru (Kelly i Strick, 2000). U studiji koja je izvršena na eksperimentalno inficiranim tvorovima utvrđeno je da se većina virusnih pupljenja dešava na sinaptičkim ili na plazma membrani dendrita u neposrednoj blizini sinapse, znatno ređe na plazma membrani prokariota. Virusne čestice su uglavnom nađene okružene invaginiranom membranom susednog aksona, što govori o transneuralnom dendroaksonalnom transferu virusa. U manjem broju slučajeva zapaženo je pupljenje virusnih čestica direktno u intercelularni prostor (Jackson, 2002a).

Istraživanjem na miševima, koji su eksperimentalno inficirani virusom u stopalo, utvrđeno je da se virus besnila prvo pojavio u moždanom stablu i dubokim jedrima malog mozga, da bi se nakon toga infekcija proširila i na Purkinje ćelije malog mozga, neurone međumozga, bazalnih ganglija i kore velikog mozga. Virus se relativno kasno nakon periferne inokulacije širi na hipokampus, gde se prvo može naći u piramidalnim neuronima (Jackson i Reimer, 1989).

U ovom sveobuhvatnom širenju virusa besnila po centralnom nervnom sistemu, inficirani su gotovo svi tipovi nervnih ćelija, dok se infekcija ostalih ćelija, uključujući i astrocite, znatno ređe dešava (Jackson, 2011).

Centrifugalno širenje virusa od centralnog nervnog sistema do periferije je veoma važno za prenošenje besnila na prirodne domaćine. Širenje virusa na pljuvačne žlezde omogućava transfer virusa preko pljuvačke na novog domaćina. U više eksperimenata je dokazano da se virus u pljuvačnim žlezdama širi preko terminalnih

aksona, a ne preko epitelnih ćelija same žlezde (Charlton i sar., 1983; Jackson, 2002a). Najveća koncentracija virusa je dokazana u apikalnim regionima acinarnih ćelija, a na apikalnom delu plazma membrane zabeleženo je pupljenje virusa u lumen žlezde, odnosno međućelijske kanaliće. Koncentracija virusa besnila u pljuvačnim žlezdama često može da bude veća nego u centralnom nervnom sistemu (Balachandran i Charlton, 1994; Jackson, 2002a).

Pored pljuvačnih žlezda, virus besnila se, doduše u manjoj meri, centrifugalno širi i na mnoge druge organe. Prisustvo virusa je dokazano u nervnim ćelijama mrežnjače i epitelnim ćelijama rožnjače oka, koje su inervisane senzornim aferentnim neuronima trigeminalnog nerva (Balachandran i Charlton, 1994). Detekcija antigena virusa besnila u otisak preparatima rožnjače koristila se za dijagnostiku besnila kod ljudi, a zabeleženi su i slučajevi prenošenja virusa transplantacijom rožnjače. Virus besnila se može naći i u slobodnim završecima senzornih nerava u koži, odnosno oko dlačnih folikula, tako da je biopsija kože jedna od najboljih antemortem dijagnostičkih metoda za potvrđivanje besnila kod ljudi. Pored kože, virus se može dokazati i u senzornim završecima usne i nosne šupljine, uključujući olfaktorni epitel i receptore čula ukusa u jeziku (Jackson, 2002a).

U brojnim istraživanjima prirodne i eksperimentalne infekcije virusom besnila dokazano je prisustvo virusa u neuronima mnogih organa, kao što su: kora nadbubrežne žlezde, kardijačna ganglija, plexusi gastrointestinalnog trakta, pljuvačne žlezde, jetra i egzokrini pankreas. Pored toga, virus je dokazan i u ćelijama koje ne pripadaju nervnom sistemu: žlezdanim ćelijama pljuvačnih žlezda, epitelu jezika, srčanom mišiću, skeletnim mišićima, dlačnim folikulima i Langerhansovim ostrvcima pankreasa (Balachandran i Charlton, 1994; Jackson i sar., 1999).

Opšte je prihvaćena činjenica da se virus besnila u organizmu domaćina širi takozvanim neuronskim putevima, dakle preko nervnih ćelija. Međutim, u poslednje vreme se ponovo razmatra mogućnost širenja virusa preko krvi. Kod miševa koji su intramuskularno zaraženi virusom besnila, metodom RT-PCR je u 94% slučajeva u krvi ustanovljeno prisustvo virusne RNK u toku prva dva dana od infekcije (Lodmell i sar., 2006). To bi moglo biti objašnjeno traumom krvnog suda na mestu inokulacije, i ulaska inokulisanog virusa u cirkulaciju. Međutim, virusna RNK je dokazana kod 84% miševa

kod kojih se razvila klinička slika, dok je kod više od polovine dokazano prisustvo antitela protiv virusa besnila. Ipak, prisustvo virusne RNK ne mora uvek da govori o tome da je i virus prisutan u cirkulaciji, jer je moguće "curenje" neinfektivne RNK iz nervnog tkiva u cirkulaciju (Jackson, 2011).

Preus i saradnici su eksperimentalno inficirali miševe virusom besnila tako što su im inokulisali virus intramuskularno, odnosno intravenski. Nakon intramuskularne inokulacije, virus je najpre ustanovljen u motornim neuronima kičmene moždine i neuronima moždanog stabla, a nakon toga se širio u neurone prednjeg mozga. Nakon intravenske inokulacije, virus je najpre ustanovljen u jedrima hipotalamusa, koja su neurosekretornim vlaknima povezana sa neurohipofizom i infundibulumom, kod kojih je hematoencefalna barijera nepotpuna (Preuss i sar., 2009). Ova otkrića sugerišu da širenje virusa besnila putem krvi dovodi do retrogradne invazije centralnog nervnog sistema preko neurovaskularne veze hipotalamusa i hipofize.

Virus besnila bi mogao doći do centralnog nervnog sistema preko krvotoka i u slučajevima transplantacije organa, jer je za njihovu inervaciju potrebno mnogo vremena, a u takvim slučajevima se bolest kod primaoca organa relativno brzo razvija. Ipak, ovaj mehanizam nije potpuno jasan, jer se pretpostavlja da bi se virus mogao preneti iz povređenog neurona doniranog organa u neuron domaćina. Tome u prilog govori i činjenica da je prenošenje besnila zabeleženo i kod transplantacije rožnjače, gde je malo verovatno da dođe do ulaska virusa u krvotok domaćina. Ipak, intravenski aplikovan virus u velikim dozama sasvim sigurno može da dovede do infekcije mozga na mestima gde je krvno-moždana barijera slabije razvijena. Naravno, veoma je mala verovatnoća da će se to desiti kod prirodnih infekcija, a ne postoji nijedan dokaz da hematogeni put širenja virusa besnila ka centralnom nervnom sistemu ima bitnu ulogu u patogenezi bolesti u prirodnim uslovima ili kod transplantacije organa (Jackson, 2011).

### **2.4.1. Mehanizmi disfunkcije i smrti neurona**

Besnilo se kod prirodnih infekcija obično karakteriše ozbiljnim neurološkim simptomima i fatalnim ishodom, ali relativno blagim patomorfološkim promenama u centralnom nervnom sistemu, koje se uglavnom svode na blagu inflamaciju i

degenerativne promene na neuronima. Upravo ove blage morfološke promene govore u prilog pretpostavci da disfunkcija neurona ima važnu ulogu u patogenezi bolesti (Jackson, 2002a). U brojnim eksperimentalnim studijama istraživane su potencijalne nepravilnosti u neurotransmisiji u koju su uključeni acetilholin, serotonin i  $\gamma$ -aminobuterna kiselina. Zapažene su određene nepravilnosti, ali nisu ustanovljene fundamentalne greške kojima bi se mogla objasniti disfunkcija neurona kod besnila (Jackson, 2011).

Ispitivanjem na kulturi mišjih neuroblastoma ćelija inficiranih virusom besnila, utvrđeno je da u inficiranim ćelijama dolazi do disfunkcije jonskih kanala, tačnije kanala za jone natrijuma i kalijuma (Iwata i sar., 1999). Ova disfunkcija dovodi do problema u stvaranju akcionog i sinaptičkog potencijala i rezultira greškama u funkciji neurona.

Pretpostavlja se da ulogu u disfunkciji neurona kod besnila ima i azot monoksid, čije je prisustvo dokazano u neuronima eksperimentalno inficiranih glodara (Hooper i sar., 1995). Ipak, ne može se sa sigurnošću tvrditi da li je ima i kolika je njegova uloga u disfunkciji i smrti neurona.

U mozgovima miševa koji su eksperimentalno inficirani uličnim i fiksiranim sojem virusa besnila, utvrđeni su neodgovarajući nivoi enzima koji regulišu homeostazu jona, kao i enzima koji regulišu fiziologiju nervnih sinapsi. Ova odstupanja mogu imati ulogu u disfunkciji neurona (Jackson, 2011).

Virus besnila može izazvati smrt neurona apoptozom ili nekrozom. Nekroza je povezana sa nedostatkom energije, dok apoptoza zavisi od sinteze makromolekula i zahteva energiju. To je normalan proces fiziološke smrti ćelije koji se dešava posredstvom određenih stimulusa. Morfološki, kod apoptoze dolazi do kondenzacije nukleusa i citoplazme, a zatim i do fragmentacije hromatina i formiranja fragmenata kondenzovanog nuklearnog materijala i citoplazme. Zapaljenska reakcija obično izostaje, ali se događa fagocitoza ovih fragmenata. Nasuprot tome, kod nekroze su obrisi ćelija očuvani, a fragmentacija se dešava u njenim kasnim fazama (Jackson, 2002a). U mnogobrojnim istraživanjima na laboratorijskim životinjama i kulturi ćelija utvrđeno je da i ulični i fiksirani sojevi virusa besnila dovode do apoptoze neurona



(Jackson i Rossiter, 1997; Jackson, 2002a). Međutim, poslednjih godina preovlađuje mišljenje da apoptoza nema značajnu ulogu u patogenezi besnila, već predstavlja mehanizam domaćina koji ima za cilj da ograniči širenje virusa (Jackson i sar., 2008; Jackson, 2011).

Novija istraživanja govore da degeneracija neurona može stvoriti osnovu za disfunkciju kod infekcije virusom besnila (Li i sar., 2005). U studiji koja je izvedena na eksperimentalno inficiranim miševima, korišćenjem klasičnih patohistoloških metoda u centralnom nervnom sistemu su utvrđene blage inflamatorne promene. Međutim, korišćenjem elektronskog mikroskopa i specijalnih bojenja ustanovljene su mnogobrojne promene: difuzna i nodozna zadebljanja aksona i dendrita kortikalnih neurona, moždanog stabla i malog mozga, vakuolizacija neurona i neuropila u kori velikog mozga, vakuolizacija aksona i presinaptičkih nervnih završetaka i oticanje mitohondija u neuronima. Ovim morfološkim promenama može se objasniti izražena klinička slika i fatalni ishod bolesti, i zaključiti da značajni procesi koji se dešavaju u inficiranom neuronu dovode do promena koje se ne mogu videti rutinskim patohistološkim metodama (Jackson, 2011).

## **2.5. Klinička slika**

Nakon infekcije virusom besnila, razvija se akutni encefalitis koji se po pravilu završava letalno. Inkubacioni period najčešće traje od dve do osam nedelja, mada su zabeleženi slučajevi inkubacije od sedam dana, ali i od nekoliko meseci (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989; de Mattos i sar., 2001; Niezgoda i sar., 2002). Dužina inkubacionog perioda zavisi od virulencije zaraznog materijala, količini inokuliranog virusa, mesta infekcije, vrste i starosti životinje, kao i od njenog imunološkog statusa. Kod mesoždera, malih preživara i svinja inkubacija je obično kraća, i traje u proseku dve do šest nedelja, dok je kod konja i goveda duža i uglavnom traje jedan do tri

meseca. Takođe, zabeleženo je da višestruki ujedi po glavi, vratu i jako inervisanim regijama tela mogu rezultirati kraćim inkubacionim periodom (Niezgoda i sar., 2002).

S obzirom da virus izaziva promene mahom u centralnom nervnom sistemu, u kliničkoj slici besnila kod svih životinjskih vrsta, pa i kod čoveka, postoji velika sličnost. Nisu poznati klinički znaci bolesti koji su specifični isključivo za određenu životinjsku vrstu (Ercegovac, 1987; Niezgoda i sar., 2002).

Početni simptomi su nespecifični i uključuju: anoreksiju, letargiju, groznicu, disfagiju, povraćanje, proliv, nemogućnost uriniranja ili defeciranja. Sem toga, mogu se javiti i postepene promene u ponašanju, agresivnost, promene u glasu i češće oglašavanje životinje, asimetrija lica, trizmus, davljenje, opušten jezik, balavljenje, opuštanje donje vilice, prolapsus trećeg očnog kapka i anizokorija.

Nakon obično kratkog prodromalnog perioda sledi akutni neurološki period bolesti, koji se manifestuje hiperestezijom na zvučne, taktilne i vizuelne stimulse i iznenadnom neisprovociranom agresijom prema pokretnim i nepokretnim objektima. Divlje životinje mogu izgubiti urođenu opreznost, dok se domaće životinje mogu osamiti i izdvojiti iz grupe. Može se primetiti i udaranje ili upiranje glavom o tvrde predmete, kao i "gledanje u zvezde". U nekim slučajevima, životinja može da se češe ili da grize mesto infekcije, verovatno zbog izmenjene senzacije usled ekscitacije senzornih ganglija, a često napada nepokretne objekte ili druge životinje, bez ikave reakcije na bol, što može dovesti do ozbiljnih oštećenja jezika, zuba ili viličnih kostiju (Niezgoda i sar., 2002).

Klinička slika besnila se generalizovano može svrstati u dve forme: furioznu i tihu. Kod furiozne forme besnila dominiraju simptomi jake razdražljivosti i agresivnosti, dok kod tihe forme agresivnost može u potpunosti izostati. Kod ove forme bolesti dominira paraliza, a mogu se javiti i anoreksija, depresija, poremećaji kranijalnih nerava, pojačana salivacija, često i pareza koja prethodi paralizi i uginuću. Ove dve ekstremne forme bolesti verovatno nastaju kao posledica infekcije različitih delova centralnog nervnog sistema. Kod iste životinje se mogu manifestovati obe forme bolesti, sa furioznim znacima na početku, a paralitičkim u kasnijoj fazi, ili obrnuto. Simptomi

karakteristični za besnilo kod ljudi, hidrofobija i aerofobija, nisu dokumentovani kod životinja (Hemachuda, 1994).

Bolest ima veoma brz klinički tok, sa progresivnim pogoršanjem iz dana u dan. U većini slučajeva traje do deset dana, iako ima izuzetaka, koji su najčešći kod životinjskih vrsta koje predstavljaju rezervoare besnila u prirodi. Tako je na primer zabeleženo da kod lisica bolest može da traje i do 17 dana, a izlučivanje virusa i do 30 dana pre uginuća (Blancou i sar., 1991).

Kako napreduje infekcija centralnog nervnog sistema, javljaju se i novi klinički simptomi: izraženi tremor, pareza, ataksija, paraliza. Može doći do dodatne ekscitacije sa izraženom hiperaktivnošću, konfuzijom, dezorjentisanošću, gubitkom koordinacije, fotofobijom, poremećenim apetitom i konvulzivnim napadima. Ekscitacije autonomnog nervnog sistema mogu dovesti do hipertenzije, hiperventilacije, priapizma, izraženog libida, hipotermije ili hipertermije. Nakon ascedentne paralize, koja može biti simetrična ili asimetrična, dolazi do respiratorne i srčane insuficijencije. Na kraju bolest se najčešće završava komom i multiorganskom insuficijencijom, pri čemu do uginuća obično dolazi u prvih deset dana od pojave prvih kliničkih simptoma (Niezgoda i sar., 2002).

### **2.5.1. Klinička slika kod pasa**

U kliničkoj slici besnila kod pasa mogu se razlikovati tri stadijuma: prodromalni, ekscitacioni i paralitični. U početnom stadijumu, *stadium prodromum seu melancholicum*, životinja pokazuje promene u ponašanju koje nisu naročito izražene, pa se mogu i prevideti. Raspoloženje im je ćudljivo, zlovoljni su, zavlache se u tamna skrovišta ili kućicu, nevoljno se odazivaju na vlasnikov poziv, nemirni su, često menjaju mesto, grebu prednjim nogama, laju ili grizu bez ikakvog razloga na prazno. Mogu se zapaziti i iznenadni, ali kratkotrajni poremećaji u disanju, kao i različita raširenost zenica. Mnogi psi ližu, češu i grizu mesto ujeda, što može dovesti do ozbiljnih povreda. Apetit je smanjen, a često gutaju najrazličitije predmete. Bolesna životinja teško guta, pri gutanju isteže vrat, hrana joj ispada iz usta, ponekad i povraća. Učestalo traži vodu, ali popije veoma malo. Javlja se i pojačana salivacija, otežano mokrenje i defeciranje,

ponekad proliv, a neki psi ispoljavaju pojačani polni nagon. Prodromalni stadijum obično traje dva do tri dana.

U drugom stadijumu, *stadium excitationis seu acmes*, ovi simptomi postaju još izraženiji. Naročito se pojačavaju nemir i uzbuđenost, verovatno pod uticajem halucinacija. Psi ližu zemlju, besno grizu predmete, imaju izraženu želju za bežanjem i lutanjem. Bez razloga napadaju druge životinje, a prilikom napada se često uopšte ne oglašavaju. Kod pasa koji su zatvoreni u kavezu obično se zapažaju mahnuti napadi, pri kojima psi grizu rešetke, pregrade i predmete koji su im dostupni tako snažno da mogu slomiti zube ili vilične kosti, a da pritom obično ne laju niti reže. Periodi uzbuđenosti se smenjuju sa dužim ili kraćim periodima depresije, u toku kojih se pas sruši i nepomično leži na tlu, pogled mu je ukočen, deluje preplašeno, kreće se u krug ili srlja napred. Zbog paralize mišića larinksa javlja se promukao lavež, gutanje je otežano, psi ne uzimaju ni hranu ni vodu, a salivacija postaje sve jača. Ekscitacioni stadijum kod pasa traje jedan do četiri dana.

U tećem stadijumu, *stadium paralyseos seu depressionis*, koji obično traje jedan do dva dana, dolazi do potpune ili delimične paralize mišića donje vilice, jezika i očiju. Usta su stalno otvorena, a jezik nepokretno isplažen. Iz otvorenih usta se neprekidno cedi viskozna i lepljiva pljuvačka, jer životinja ne može da je proguta. Zbog promena u kičmenoj moždini dolazi do paralize mišića trupa i udova. Prvo budu zahvaćene zadnje noge, pa se životinja u hodu zanosi, posrće i vuče noge, rep visi između nogu, i na kraju više ne može da se kreće. Životinja je tada već potpuno iznemogla, ulazi u komu i uginjava (Niezgoda i sar., 2002).

Telesna temperatura je u ekscitacionom stadijumu povišena za 1–3 °C, dok je u paralitičkom nekoliko stepeni ispod normalne. Puls je od početka bolesti ubrzan, a disanje otežano. U mokraći se može naći velika količina glukoze (3%), u krvi leukocitoza, sa povećanjem polimorfonuklearnih leukocita i smanjenjem limfocita i monocita.

Međutim, kod nekih životinja javlja se i nešto drugačija klinička slika bolesti. Stadijum ekscitacije može biti jako kratak i sa slabo izraženim znacima razdražljivosti, pa se praktično na prodromalni stadijum nastavlja paraliza muskulature vrata i zadnjih

nogu. Većina takvih pasa je od samog početka bolesti veoma slaba, ne laju niti ujedaju. Ovaj oblik bolesti se naziva tiho besnilo, nema posebno izražene kliničke simptome i često prođe nezapaženo, naročito kod pasa kojima se ne posvećuje dovoljno pažnje. Takav pas je obično miran, ugrize samo kad je izazvan, ima prestrašen pogled, bali, ne može da guta, a paraliza obično naglo zahvata zadnje noge. Smatra se da se besnilo u ovom obliku javlja kod 15-20% obolelih pasa. Uginuće u oba oblika besnila, furioznom i tihom, nastupa 3-7 dana nakon prodromalnog stadijuma (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989; Niezgoda i sar., 2002).

Pored ova dva klasična oblika besnila, u retkim slučajevima se kod pasa može javiti i atipična forma bolesti, koja ima perakutni tok, uz bolovanje najviše do tri dana, i bez ikakvih znakova paralize, a takav pas može da ima očuvan apetit svega nekoliko sati pre uginuća. Veoma retko se može javiti i intermitirajuća forma, kod koje se klinički znaci naglo poboljšaju, ali se nakon nekog vremena ponovo pojave i životinja uginu.

## **2.5.2. Klinička slika kod mačaka**

Inkubacioni period kod mačaka može trajati od 10 dana do 6 meseci, u proseku 3 do 8 nedelja. Klinički simptomi su uglavnom slični kao kod pasa.

Prodromalni stadijum traje dva do tri dana, i u toku njega obično dolazi do povišenja telesne temperature, zenice se prošire, a mačke se obično povlače na skrovnita mesta.

Tokom ekscitacionog stadijuma bolesti, koji traje tri do sedam dana, životinja postaje nemirna, uzbuđena i nervozna. Javlja se fotofobija, pa se mačka skriva u tamne uglove, a na svetlosne i zvučne nadražaje pojačano reaguje. Dolazi do promene glasa, smetnji u gutanju, pojačane salivacije, a javlja se i agresivnost prema životinjama i čoveku. Pri kraju ove faze bolesti česte su konvulzije i mišićna inkoordinacija.

U paralitičkom stadijumu uočava se obešena donja vilica zbog paralize žvakaće muskulature, a pljuvačka se obično cedi iz otvorenih usta. Paraliza se brzo širi na celo

telo i mačka uginjava dva do četiri dana od početka ovog stadijuma bolesti (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989).

Kod tihe forme bolesti, koja je kod mačaka nešto češća nego kod pasa, mačka obično ne napada druge životinje i čoveka.

### **2.5.3. Klinička slika kod preživara**

Inkubacioni period kod goveda obično iznosi od tri nedelje do šest meseci. Prodromalni stadijum bolesti traje do dva dana, i može početi uz znakove indigestije. Životinja ne jede, javlja se nadun, opstipacija ili dijareja. Potištena je i odvaja se od stada. Ponekad već od samog početka bolesti se javlja nemir, razdražljivost i agresivnost. Obolela životinja pokazuje znake preplašenosti, nemirna je, trese glavom, kopa prednjim nogama, grize jaslje, nasrće glavom na zid i slično. Zbog disfagije se cedi slina, ne pije ili vrlo malo pije vodu, zalogaj dugo zadržava u ustima, napinje se pa može doći do prolapsusa rektuma. Polni nagon može biti pojačan, životinja je osetljiva na svetlosne i zvučne nadražaje, a iznenadni nadražaji mogu izazvati burne reakcije. Objekti u pokretu mogu izazvati izraženu agresivnost ili strah. Kod većine životinja može se čuti promuklo otegnuto mukanje, javlja se i češanje, lizanje ili glodanje mesta ujedaja, škriganje zubima, prestanak mlečnosti, podrhtavanje određenih grupa mišića. Na kraju dolazi do paralize nogu, prvo zadnjih pa prednjih, i nakon dan ili dva životinja uginjava.

Tiha forma bolesti kod goveda se može manifestovati samo jakim salivacijom, otežanim gutanjem i paralizom zadnjih nogu, a uginuće nastupa četiri do pet dana od prvih simptoma bolesti. U Južnoj i Srednjoj Americi javlja se paralično besnilo goveda, koje najčešće prenose slepi miševi, i koje se u osnovi karakteriše simptomima tihog besnila.

Kod ovaca i koza besnilo ima veoma slične simptome kao kod goveda. Kod njih se nešto češće javlja tiha forma bolesti, obično nema ekscitacionog stadijuma ili je on kratkotrajan. Obolele ovce obično su potištene, promuklo bleje, besciljno tumaraju, škripe zubima, ispružaju vrat i glavu, ližu mesto ujedaja, retko ispoljavaju agresivnost

prema drugim ovcama i psima. Kod koza su znakovi razdraženosti nešto izraženiji, one postaju nemirne i agresivne, nasrću na zid, životinje i ljude. Udaraju i grizu jarad, a polni nagon kod jarčeva je izrazito pojačan. Bolest kod ovaca obično traje tri do pet dana, kod koza do osam dana, a životinje uginjavaju sa simptomima paralize (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989).

U kliničkoj studiji koja je izvršena na govedima i ovcama koje su inficirane uličnim sojem virusa besnila, inkubacioni period je u proseku iznosio 15 dana. Glavni klinički znaci su bili: pojačana salivacija (100%), promene u ponašanju (100%), mišićni tremor (80%), vokalizacija (70%), agresivnost i razdražljivost (70%) i faringealna pareza ili paraliza (60%). Furiozna forma bolesti je zabeležena kod 70% goveda i 80 % ovaca (Hudson i sar., 1996a).

#### **2.5.4. Klinička slika kod svinja i konja**

Kod svinja besnilo gotovo uvek počinje simptomima velikog uzbuđenja i razdražljivosti. Zapaža se nemir, salivacija, promuklo groktanje, grčeviti pokreti glave, hiperestezije kože, jurenje bez cilja, agresivnost prema životinjama i čoveku. Često se kreću u klečećem stavu po više metara, ili nepomično stoje u mestu sa paralizovanim jednim ili oba uveta. Ostali simptomi u osnovi odgovaraju kliničkoj slici besnila kod pasa. Životinja uginje za dva do četiri dana od pojave prvih znakova paralize, a ponekad već sledećeg dana .

Kod konja je često prvi znak bolesti svrab na mestu ugriza, zbog čega životinja trlja i glođe taj deo tela. Javlja se pojačana razdražljivost, nemir, plašljivost, životinja kopa nogama, često se premešta, grize jaslje ili druge predmete, steže usne tako da joj se vide zubi, a iz usta se cedi penušava pljuvačka. Neki konji se ponašaju slično kao kod žuravosti, upiru glavom o zid, dok su drugi vrlo agresivni i napadaju druge životinje, naročito pse, i ljude. Zapaženo je i često mokrenje, kao i pojačan polni nagon. Pastuvi često kopaju nogama, ponekad i ejakuliraju, dok se kobile ponašaju kao pri raspasanosti.

Ubrzo nakon ovih simptoma javlja se otežano gutanje, odbijanje hrane i vode, promukao glas, paraliza zadnjeg dela tela, klecanje i zanošenje pri hodu. Na kraju životinja padne na tlo i brzo uginjava. U izuzetnim slučajevima bolest se manifestuje samo ascendentnom parezom. Uginuće nastupa dva do sedam dana nakon pojave prvih znakova bolesti (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989).

U kliničkoj studiji koja je izvršena na eksperimentalno inficiranim konjima, prosečna dužina inkubacionog perioda je iznosila dvanaest dana. Najčešći klinički simptomi bili su: mišićni tremor (81%), kao najčešći početni simptom bolesti, potom faringealna pareza ili paraliza (71%), ataksija ili pareza (71%) i letargija ili somnolentnost (71%). Od ukupnog broja inficiranih, kod 43% konja se razvila furiozna slika bolesti (Hudson i sar., 1996b).

### **2.5.5. Klinička slika kod divljih životinja**

Inkubacioni period kod lisica može da traje od četiri dana do čak petnaest meseci, zavisno od virulencije virusa, količine virusa koji dospe u organizam, kao i stanja same životinje (Cvetnić, 1989; Niezgoda i sar., 2002). Obolele lisice izgube strah od čoveka, ulaze u naselja, štale, čak i u kuće. Ponekad se mogu videti kako nepomično stoje. Domaće životinje i čoveka po pravilu napadaju samo kad su izazvane, dok bez ikakvog razloga grizu drveće i različite predmete. Sem toga, javlja se gubitak apetita, nemir, karakteristično lajanje ili zavijanje, progresivna paraliza i nekoordinisano kretanje, sve do potpunog gubitka lokomotorne funkcije. U retkim slučajevima mogu se zapaziti respiratorni ili digestivni simptomi. Na kraju dolazi do tonično-kloničnih grčeva i, pet do šest dana od prvih simptoma, uginuća.

Kod srneće divljači besnilo počinje gubitkom apetita. Obolela životinja se besciljno kreće i glasno muče, udara glavom o drveće, ne beži od čoveka, već ga čak i napada. Apatične srne se mogu lako uhvatiti, pogled im je ukočen, a usta otvorena. U završnoj fazi dolazi do paralize, a vrlo brzo i do uginuća. I ostali divlji biljojedi imaju slične simptome kao srna (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989).



Kod slepih miševa bolest se manifestuje besciljnim letenjem, povećanom razdražljivošću, agresivnošću prema životinjama i ljudima ili simptomima paralize nogu i krila. Kao i kod ostalih životinja, bolest se može javiti u furioznoj i tihoj formi, a inkubacioni period se ne razlikuje od drugih životinjskih vrsta (Ercegovac, 1987; Niezgodna i sar., 2002).

### **2.5.6. Klinička slika kod ljudi**

Inkubacioni period kod ljudi iznosi osam dana do više godina, a najčešća je između dve nedelje i dva meseca. Kod oko 80 % pacijenata razvije se klasična, odnosno furiozna forma bolesti, dok se paralitička forma razvije u 20 % slučajeva (Jackson, 2002b). Kod furiozne forme prodromalni stadijum traje jedan do četiri dana. On započinje nepribranošću, nervozom, isprekidanim snom, lakšom glavoboljom, gađenjem prema jelu i piću, neobjašnjivim strahom, nemirom, povlačenjem u samoću i slično. Kasnije isprekidan san prelazi u nesanicu, gađenje u povraćanje, a nervoza u naizmeničnu uzbuđenost i depresiju. Sem toga, javljaju se svrab, utrnulost, bockanje oko mesta ujeda, potom preosetljivost na svetlo, hladnoću ili strujanje vazduha, koje može izazvati jak spazam mišića vrata i farinksa (aerofobija). Ranije je čak u dijagnostici besnila korišćen takozvani fen test, kada se struja vazduha usmeravala direktno na kožu obolelog. Oboleli ljudi stalno govore, često pljuju, viču, ljute se, lice im je blede, oči upale, zenice proširene, puls ubrzan, a disanje plitko i ubrzano. Senzorni stadijum bolesti se manifestuje pojačanom osetljivošću, parestezijom, razdražljivošću, salivacijom, suzenjem i znojenjem. Nakon dva do sedam dana javlja se pojačana razdražljivost (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989; Jackson, 2002b).

U stadijumu ekscitacije bolesnici su obično jako razdražljivi, besciljno lutaju po sobi, telesna temperatura je povišena i do 42°C, a česti su manijakalni napadi praćeni jakim grčevima koji mogu biti fatalni. U ovom stadijumu kod 50 – 80 % obolelih javlja se hidrofobija, koja nije karakteristična ni za jednu drugu neurološku bolest, i predstavlja najšire poznatu manifestaciju besnila kod ljudi. U početku oboleli oseća bol u grlu i teškoće pri gutanju (grčevi dijafragme i mišića inspirijuma), kasnije se javljaju grčevi mišića vrata, koji dovode do njegove fleksije i ekstenzije, kašalj, povraćanje,

aspiracija, konvulzije i hipoksija. U toku ovih napada može doći i do smrti pacijenta, zbog velikog pritiska na srce i pluća (Warrell i Warrell, 1991). Bolesnici odbijaju da piju vodu, što rezultira dehidracijom. Kasnije, zvuk ili samo pominjanje vode može dovesti do ovih napada. Hidrofobni napadi se pri kraju bolesti mogu pojaviti i spontano. Smatra se da hidrofobija nastaje kao posledica infekcije motornih neurona inspirijuma u regionu *nucleus ambiguus*-a u moždanom stablu (Jackson, 2002b), što dovodi do jako izraženih odbrambenih refleksa koji štite respiratorni trakt. Kasnije se mogu javiti pojačana salivacija, tremor i pareza, naročito mišića lica, refleksi počinju da se gube, a vrat je često ukočen. Bolesnik retko preživi stadijum ekscitacije, smrt obično nastupi uz jaku konvulziju i tonično-klonične grčeve.

Pacijenti koji prežive akutnu razdraženost, prelaze u paralitički stadijum. Bolesnik postane apatičan, javljaju se paralize udova, i na kraju padne u komu. Smrt može da nastupi već za nekoliko sati, a zabeleženo je da neki bolesnici u ovom stadijumu bolesti mogu živeti i do deset dana (Cvetnić, 1989).

Furiozna forma besnila obično traje do 14 dana od pojave prvih simptoma, mada se bolovanje može produžiti intenzivnom negom pacijenta. U literaturi čak postoje podaci da je jedan pacijent živeo 133 dana (Emmons i sar., 1973; Jackson, 2002b).

Kod paralitičke ili tihe forme besnila, jedan od prvih simptoma je izražena mišićna slabost. Na početku su pacijenti svesni i sa normalnim mentalnim statusom, a mišićna slabost se ascedentno širi. Obično pacijenti izgube glas, ili on postane veoma tih, zbog slabosti mišića larinksa. Iako se može javiti lokalni bol, parestezija i svrab na mestu ujeda, senzorijum je najčešće očuvan. Često se javlja urinarna inkontinencija. Za razliku od klasične forme, kod paralitičkog besnila hidrofobija je znatno ređi simptom, iako se često javljaju blagi grčevi disajne muskulature. Smatra se da na razvijanje paralitičkog besnila mesto ujeda nema nikakvog uticaja (Tirawatnpong i sar., 1989), inkubacioni period je u proseku isti kao furizne forme, dok je bolovanje nešto duže. Razlika u patogenezi ove dve forme besnila kod ljudi još uvek nije utvrđena (Jackson, 2002b).

## 2.6. Patomorfološke promene

### 2.6.1. Makroskopske promene

Makroskopski nalaz je, čak i kod životinja koje su uginule nakon dužeg trajanja bolesti, najčešće vrlo oskudan i slabo karakterističan.

Na lešu psa se može zapaziti mršavost, isplažen, otečen i ranjav jezik, neuredan dlačni pokrivač i rane po telu. U usnoj duplji su prisutne lezije, često polomljeni zubi, pa i vilične kosti. U želucu se često umesto hrane mogu naći različiti strani predmeti (komadi drveta, stakla, kamenje i sl.), a sluznica želuca je jako zažarena, otečena i prožeta krvavljenjima i erozijama. Mokraćna bešika je obično prazna ili sa malom količinom mokraće koja po pravilu sadrži glukozu. Navedene promene su znatno ređe kod životinja kod kojih se razvila tiha forma bolesti (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989).

Kod goveda je burag obično pun hrane, sa izraženim submukoznim krvavljenjima, listavac ispunjen jako stvrdnutom hranom, sitne ulceracije su prisutne na sluznici sirišta, a na serozi predželudaca i creva sitna krvavljenja. Limfni folikuli creva su izrazito hiperemični. Upadljiva su i mnogobrojna tačkasta i prugasta krvavljenja na grudnoj muskulaturi, perikardu i epikardu. Unutrašnji organi su hiperemični, ponekad su jetra i srce degenerisani, žučna kesa je često prepunjena. U nekim slučajevima je nalaz kod goveda negativan, ali je listavac obično ispunjen čvrstim sadržajem.

Promene kod lisica takođe nisu karakteristične. Mogu se zapaziti tragovi neprirodnog ponašanja, na primer strana tela u želucu, automutilacija, prelomi viličnih kostiju i slično (Cvetnić, 1989)

Makroskopske promene na centralnom nervnom sistemu su po pravilu slabo izražene. Obično se uočava edem mozga, kao i edem i hiperemija moždanih ovojnica. Retko se mogu videti subarahnoidna krvavljenja (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989; Iwasaki i Tobita, 2002). Krvavljenja i nekroze moždanog tkiva se jako retko viđaju i nisu karakteristika besnila (Iwasaki i Tobita, 2002).

## 2.6.2. Mikroskopske promene

Mikroskopske promene nisu srazmerne intenzitetu kliničke slike besnila. Uglavnom su ograničene na centralni nervni sistem, a mogu se dokazati i u ganglijama, ponekad i u drugim organima. Iako se patohistološke promene mogu razlikovati od slučaja do slučaja, one su najčešće blage i ponekad jedva primetne. Najznačajnije, odnosno najčešće su inflamatorne reakcije, degeneracija neurona i prisustvo specifičnih citoplazmatskih inkluzija – Negrijevih telašaca (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989; Iwasaki i Tobita, 2002; Maxie i Youssef, 2007).

Inflamatorne promene su obično prisutne, iako mogu da budu i veoma blage, gotovo neprimetne. U centralnom nervnom sistemu su najizraženije u predelu od ponsa do hipotalamusa i u cervikalnom delu kičmene moždine, pri čemu je produžena moždina kod domaćih životinja relativno pošteđena. Najintenzivnije promene zapažaju se kod pasa, dok su kod preživara, koji su visokoprijemčiva vrsta, znaci zapaljenskih reakcija veoma slabi, uprkos prisustvu Negrijevih telašaca (Maxie i Youssef, 2007; Zachary, 2007).

Zapaljenske reakcije su u tipu negnojnog encefalomijelitisa, sa perivaskularnim infiltratima i fokalnom gliozom. Perivaskularne nakupine inflamatornih ćelija su debljine jednog do nekoliko slojeva i sastoje se uglavnom od limfocita i histiocita, sa veoma malo polimorfonukleara i plazma ćelija, u zavisnosti od stadijuma i intenziteta bolesti (Iwasaki i Tobita, 2002; Maxie i Youssef, 2007; Zachary, 2007; Jovanović, 2012). Fenotip ovih ćelija nije u potpunosti proučen, a u jednom ispitivanju besnila kod ljudi je utvrđeno da 50-70% mononuklearnih ćelija u perivaskularnim prostorima čine CD3 T-limfociti, u velikom broju su utvrđeni CD4 T-limfociti, ima i CD68 makrofaga, dok su CD20 B-limfociti utvrđeni u zanemarljivom procentu. U istoj studiji je utvrđeno da se više od polovine CD3 ćelija na mestu inflamacije nalazi van perivaskularnih prostora (Iwasaki i sar., 1993).

Među slučajevima besnila, mali je broj onih sa ekstenzivnim inflamatornim procesom na leptomeningama, i to obično iznad baze mozga. Infiltrati se sastoje od istih

celularnih elemenata kao i parenhimatozni perivaskularni infiltrati, preovlađuju limfociti, ima i makrofaga, katkad i plazma ćelija. U retkim slučajevima, kada su inflamatorne promene intenzivne, preovlađuju polimorfonuklearne ćelije (Ercegovac, 1987).

Kao i kod ostalih virusnih encefalitisa, neuronofagija i čvorići glija ćelija često se mogu videti u područjima mozga gde su upadljivi infiltracija zapaljenskim ćelijama i degeneracija neurona. Babes je prvi 1892. godine zapazio fokalne nakupine "embrionalnih ćelija", odnosno makrofaga, koje okružuju degenerisane neurone i nazvao ih rabičnim tuberkulima. Oni su godinama bili poznati pod imenom Babesovi čvorići. To su u stvari ograničena ognjišta nabujalih mikroglia ćelija, čije je prisustvo u moždanom stablu i kičmenoj moždini Babes smatrao promenom koja je patognomonična za besnilo. Međutim, identične promene postoje i kod drugih virusnih encefalitisa, pa i kod toksičnih stanja, kao što su uremija ili hronično trovanje arsenom (Iwasaki i Tobita, 2002; Maxie i Youssef, 2007).

Degenerativne promene na neuronima u vidu piknoze jedara ili hromatolize mogu se videti u svim delovima centralnog nervnog sistema, ali su najčešće u moždanom stablu, naročito na podu četvrte moždane komore. Region izraženih degenerativnih promena može se pružati naniže do sive mase kičmene moždine i naviše do talamusa, ili nešto ređe do kore velikog mozga. U najvećem broju slučajeva ovi degenerisani neuroni ne sadrže u sebi Negrijeva telašca, ali se u njima imunohistohemijski može dokazati virusni antigen, a oko njih se često može zapaziti inflamatorna reakcija (Iwasaki i Tobita, 2002).

Kod mesojeda degeneracija neurona može biti jako izražena i u disproportiji sa inflamatornim promenama, dok je kod svinja i biljojeda obično veoma blaga (Maxie i Youssef, 2007). U poređenju sa prirodnim infekcijama uličnim sojem virusa, fiksirani soj virusa besnila izaziva znatno intenzivnije citopatogene efekte u kulturi ćelija i u organizmu. Kod eksperimentalnih životinja inficiranih fiksiranim virusom kondenzacija hromatina je standardni nalaz u inficiranim neuronima, dok u takvim neuronima Negrijeva telašca obično nisu prisutna (Iwasaki i Tobita, 2002).

Kod ljudi umrlih od besnila postoje velike razlike u patohistološkim promenama, počev od jedva uočljive inflamacije i neuronalne degeneracije do izraženih i široko rasprostranjenih perivaskularnih infiltracija i nakupljanja mikroglije, povezanih sa degeneracijom neurona i neuronofagijom. Inače, ove promene su izraženije kod furioznog nego kod tihog oblika bolesti, i kod dece u odnosu na odrasle oslobe (Ercegovac, 1987).

Spongiformne promene, koje se kvalitativno ne razlikuju od onih kod transmisivnih spongiformnih encefalopatija (TSE), u centralnom nervnom sistemu životinja inficiranih virusom besnila prvi put su opisane 1984. godine (Charlton, 1984). One su prvo ustanovljene kod lisica i tvorova koji su eksperimentalno inficirani virusom besnila, a kasnije i kod prirodno inficiranih tvorova, lisica, konja, goveda, ovaca i mačaka. Promene su obično lokalizovane u neuropilu sive mase, najčešće u talamusu i kori velikog mozga. U početku izgledaju kao intracitoplazmatske, membranom oivičene vakuole, koje se nalaze u neuronskim dendritima, ređe aksonima ili astrocitima. Ove vakuole se uvećavaju, pritiskaju okolno tkivo, i na kraju pucaju formirajući prazan prostor. Iako mehanizam koji je odgovoran za njihovo nastajanje nije u potpunosti utvrđen, smatra se da on predstavlja indirektni efekat virusa besnila na nervno tkivo, u šta su vrlo verovatno uključene alteracije u metabolizmu neurotransmitera (Zachary, 2007).

Pored nespecifičnih alteracija, u centralnom nervnom sistemu ustanovljene su za besnilo specifične intracitoplazmatske inkluzije. Prvi ih je uočio Babes, a 1903. godine Adelhi Negri ih je detaljno opisao i istakao njihov značaj u dijagnostici. Od tada se ove inkluzije nazivaju Negrijevima telašcima.

Na preparatima obojenim hematoksilin-eozinom ova telašca se vide kao eozinofilne, jasno ograničene inkluzije, okružene bistrim tankim oreolom. Okruglog su, ovalnog ili vretenastog oblika, veličine 1–20  $\mu\text{m}$ , prosečno 2–8  $\mu\text{m}$ . Njihova veličina zavisi i od životinjske vrste, pa su obično najveća kod goveda, a najmanja kod kunića i rakuna. Obično ih u ćeliji ima jedno ili dva, retko nekoliko. Većina ih je homogeno obojena eozinom, ali se male blede tačke mogu videti u eozinofilnoj masi. Ove tačkice predstavljaju unutrašnja telašca i nastaju invaginacijom komponenata citoplazme,

uključujući virusne čestice, u matriks inkluzije (Iwasaki i Tobita, 2002; Maxie i Youssef, 2007).

Inkluzije u kojima nema unutrašnjih telašaca nazivaju se lyssa telašcima. Imunohistohemijskim i ispitivanjima njihove ultrastrukture pod elektronskim mikroskopom nisu uočene bitnije razlike u odnosu na Negrijeva telašca. U mozgu besnih životinja ona su brojnija od Negrijevih telašaca, ali su nespecifična, tako da njihov nalaz nema veliki dijagnostički značaj. Ova telašca, odnosno njima veoma slične inkluzije mogu se naći i kod zdravih životinja, kao i kod životinja obolelih od drugih bolesti centralnog nervnog sistema, na primer kod pasa obolelih od štenećaka (Iwasaki i Tobita, 2002). Eozinofilne homogene citoplazmatske inkluzije mogu se naći u piramidalnim ćelijama hipokampusa zdravih mačaka, tvorova i pasa. Može ih biti više u ćeliji, a njihova veličina je do 1,5  $\mu\text{m}$ . Kod starih ovaca i goveda, u velikim neuronima produžene i kičmene moždine mogu se naći nespecifične acidofilne inkluzije, veličine oko 1  $\mu\text{m}$ , obično brojne i difuzno raspoređene (Maxie i Youssef, 2007).

Međutim, iako se nalaz Negrijevih telašaca smatra patognomoničnim za besnilo, važno je napomenuti da se kod infekcije uličnim sojevima virusa ona mogu naći kod 40-70% sigurno besnih životinja, dok ih kod infekcija fiksiranim sojem virusa uopšte nema (Iwasaki i Tobita, 2002; Maxie i Youssef, 2007; Zachary, 2007). Učestalost njihovog pojavljivanja zavisi od načina infekcije, virulencije i količine virusa, kao i od vrste i starosti inficirane životinje (Cvetnić, 1989). Sem toga, njihova brojnost, a po nekim autorima i veličina je srazmerna dužini trajanja bolesti, pa se stoga znatno češće mogu naći kod uginulih nego kod ubijenih životinja (Ercegovac, 1987; Iwasaki i Tobita, 2002; Maxie i Youssef, 2007).

Negrijeva telašca se mogu naći u neuronima gotovo svih delova centralnog nervnog sistema besne životinje. Ipak, znatno se češće mogu sresti u velikim neuronima, kao što su piramidalni neuroni hipokampusa, neuroni produžene moždine i Purkinje ćelije malog mozga (Iwasaki i Tobita, 2002; Zachary, 2007). Sem toga, inkluzije su najčešće prisutne u neuronima koji se ne nalaze u regijama zahvaćenim inflamacionim procesom. One se uglavnom mogu videti u neuronima koji su histološki potpuno normalni, dok ih kod neurona koji su zahvaćeni degenerativnim procesom nema (Maxie i Youssef, 2007).

Pored intracitoplazmatskih inkluzija, slične eozinofilne tvorevine su zapažene povremeno i u neuropilu. Smatra se da one imaju veze sa virusnim antigenom koji je imunohistohemijski dokazan u neuropilu, odnosno virusnim česticama koje su ultrastrukturnim ispitivanjima dokazane u dendritima inficiranih neurona (Iwasaki i Tobita, 2002).

Negrijeva telašca su, doduše prilično retko, pored centralnog nervnog sistema dokazana i u epitelnim ćelijama pljuvačne žlezde, srži nadbubrežne žlezde i retine (Cvetnić, 1989; Maxie i Youssef, 2007).

Ispitivanjem pod elektronskim mikroskopom utvrđeno je da se Negrijeva telašca sastoje od virusnih čestica povezanih zrnastim elektron-gustim matriksom. Prema rasporedu virusnih čestica u matriksu mogu se razlikovati tri tipa Negrijevih telašaca. Prvi tip se karakteriše jasno ograničenim okruglastim skupinama matriksa na čijoj se periferiji nalaze virioni u obliku metka, veličine 90-180 nm, dok je centralni deo matriksa bez viriona. Ovaj tip Negrijevih telašaca obično se sreće u neuronima talamusa i *nucleus caudatusa*. Drugi tip sadrži izdužene tubularne strukture rasute po celom matriksu, i u njima se obično nalazi unutrašnje telašce specifičnog oblika. Najčešće se sreću u neuronima baze mozga, malog mozga i kičmene moždine. Treći tip Negrijevih telašaca sastoji se od ekstremno velikih skupina matriksa, obično veličine 10-15 nm. U njima se retko mogu videti čestice virusa, koje su malobrojne i obično tubularnog oblika. Takve inkluzije se najčešće sreću u hipokampusu (Ercegovac, 1987; Iwasaki i Tobita, 2002).

Morfološke promene mogu se uočiti i na perifernom nervnom sistemu, koji je neminovno uključen u patogenezu besnila, odnosno u centripetalno i centrifugalno širenje virusa. O promenama na ganglijama prvi su izvestili Babes, Van Gehuhten i Nelis, krajem devetnaestog veka. Ispitujući ganglije kranijalnih nerava i spinalne ganglije izvesnog broja besnih životinja, oni su uočili proliferaciju kapsularnih, odnosno satelitskih ćelija koje okružuju ganglijske neurone. U neuronima je zapažena hromatoliza u različitim stepenima. Ovaj tip promena na ganglijama besnih životinja je često nazivan Van Gehuhten i Nelisovom lezijom ili Van Gehuhtenovim čvorićem. Još ranije ih je na *ganglionu Gasseri* kod ljudi umrlih od besnila zapazio Nepveu, ali im nije pridavao nikakav dijagnostički značaj (Ercegovac, 1987; Iwasaki i Tobita, 2002).



Pored proliferacije kapsularnih tj. satelitskih ćelija, u ganglijama se mogu zapaziti promene u vidu difuznog ganglionitisa sa bujanjem endotela, limfocitno-plazmocitne ćelijske infiltracije i degeneracije ganglijskih ćelija. Komparativnim ispitivanjem promena na ganglijama i prisustva Negrijevih telašaca, utvrđeno je da su promene na *ganglionu Gasseri* i *ganglionu nodosum* nervusa vagusa češće od pojave Negrijevih telašaca kod besnih životinja. Na osnovu ovih ispitivanja, promenama u ganglijskim neuronima je pridavan veliki dijagnostički značaj, dok slične alteracije nisu ustanovljene i kod drugih virusnih encefalitisa, na primer štenećaka, polioencefalomijelitisa svinja, pa čak i kod zdravih pasa (Iwasaki i Tobita, 2002; Maxie i Youssef, 2007).

Antigen virusa besnila je dokazan u podviličnim i parotidnim pljuvačnim žlezdama, skeletnoj muskulaturi, ezofagusu, želucu, crevima, pankreasu, tiroidnoj žlezdi, timusu, plućima, srcu, nadbubrežnim žlezdama, bubrezima, ureteru, bešici, nadbubrežnim žlezdama, prostati, uretri i testisima lisica koje su prirodno inficirane virusom besnila. Replikacija virusa je dokazana u epitelnim ćelijama pljuvačnih žlezda i rožnjače, dok je u ostalim organima ona ograničena na ganglijske ćelije, nervna vlakna ili nervne pleksuse. U svim ovim organima moguće su inflamatorne promene, naročito u pljuvačnim žlezdama, gde se često mogu sresti degenerativne promene acinusa praćene mononuklearnom ćelijskom infiltracijom (Iwasaki i Tobita, 2002).

## 2.7. Dijagnostika bolesti

U savremenoj dijagnostici besnila koristi se širok spektar metoda. Definitivna dijagnoza se postavlja detekcijom Negrijevih telašaca, virusnih proteina ili gena u uzorku, odnosno izolacijom i identifikacijom samog virusa.

U dijagnostici bolesti, naročito u početnim stadijumima, veoma važnu ulogu imaju anamnestički podaci. Naročitu pažnju treba obratiti na nagle promene u ponašanju

životinje i podatke o eventualnom ujedu od strane sumnjive ili divlje životinje, izloženosti životinje silvatičnom besnilu na paši, neograđenom dvorištu ili otvorenoj staji, kao i vakcinaciji. U anamnezi se često navodi da životinja ima smetnje pri gutanju, što kliničara treba da navede da to može da bude simptom besnila, a ne kako se to često pretpostavlja, posledica prisustva stranog tela u jednjaku (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989).

Klinička sumnja na besnilo se kod klasične forme bolesti može relativno lako postaviti ako se posmatra celokupni tok bolesti. Karakteristični klinički simptomi su promenjeno ponašanje, koje ide od depresije do izraženog nemira i agresivnosti, gubitak straha od ljudi kod divljih životinja, promukao glas, paraliza donje vilice, isplažen jezik, jaka salivacija i paraliza ekstremiteta. Međutim, ne postoji klinički simptom bolesti koji je patognomoničan, i veoma često je besnilo klinički veoma teško razlikovati od drugih virusnih encefalita, na primer nervne forme štenećaka ili poliomijelitisa kod ljudi. Sem toga, u nekim slučajevima ovi simptomi su veoma blagi ili ih i nema, naročito u tihoj formi besnila (Ercegovac, 1987; Trimarchi i Smith, 2002).

Zbog specifične patogeneze besnila, nemoguće je dijagnostikovati bolest tokom najvećeg dela njenog inkubacionog perioda, koji može biti prilično dug. U tom periodu virus, odnosno njegovi antigeni i ribonukleinska kiselina, ne mogu se pouzdano identifikovati zbog nepredvidive distribucije u organizmu domaćina. Takođe, titar specifičnih cirkulišućih antitela se obično povećava tek nedelju dana od pojave prvih kliničkih simptoma (Crepin et al., 1998). Upravo zbog toga se dijagnoza besnila sa apsolutnom sigurnošću može postaviti jedino postmortalnim ispitivanjem moždanog tkiva, gde se pre ispoljavanja prvih kliničkih simptoma odigrava nekoliko ciklusa umnožavanja virusa. Sem toga, za praktičnu dijagnostiku je bitna činjenica da se tek nakon umnožavanja u mozgu virus besnila retrogradno širi u pljuvačne žlezde (Trimarchi i Smith, 2002).

Patoanatomska dijagnoza, odnosno sumnja na besnilo se temelji na odsustvu normalne hrane i prisustvu stranih predmeta u želucu. Naravno, i takav nalaz treba oprezno prosuđivati, s obzirom da se strani predmeti mogu naći u želucu životinja koje nisu besne, naročito kod mladih pasa (Cvetnić, 1989).

Patohistološki, dijagnoza se može postaviti na osnovu prisustva Negrijevih telašaca, patognomoničnih inkluzija koje se nalaze u neuronima besnih životinja. Sveži otisci moždanog tkiva, ili klasični histološki parafinski isečci boje se hematoksilin-eozinom ili kombinacijom baznog fuksina i metilenskog plavog (Lepine i Atanasiu, 1996; Tierkel i Atanasiu, 1996). Patohistološki nalaz uključuje znake encefalitisa, odnosno inflamatornih reakcija najčešće u vidu perivaskularnih infiltrata. Acidofilne intracitoplazmatske inkluzije, Negrijeva telašca, najčešće se sreću u piramidnim ćelijama Amonovog roga, velikim neuronima produžene moždine i Purkinje ćelijama malog mozga, a njihov nalaz predstavlja pouzdanu dijagnozu besnila (Trimarchi i Smith, 2002). Nažalost, prisustvo, distribucija i veličina Negrijevih telašaca u mnogome zavise od vrste životinje, varijante virusa i dužine bolesti. Senzitivnost, a samim tim i pouzdanost metode je slaba, a brojne studije pokazuju da se kod više od 25% besnih životinja Negrijeva telašca ne mogu dokazati (Perl i Good, 1991). Stoga ova metoda ima prilično ograničenu vrednost u rutinskoj dijagnostici besnila.

Metoda koji se danas najčešće i najšire upotrebljava u dijagnostici besnila je tehnika fluorescentnih antitela, odnosno direktna imunofluorescencija. Ova metoda je prvi put primenjena 1950. godine, a u dijagnostiku besnila su je 1958. godine uveli Goldvaser i Kisling. Najčešće se primenjuje na svežim otisak preparatima mozga ispitivane životinje. Za ispitivanje se koriste uzorci Amonovih rogova, moždanog stabla i malog mozga, gde je i koncentracija virusa najveća. Molekuli imunoglobulina koji su obeleženi bojom koja fluorescira, najčešće fluorescein izotiocijanatom (FITC), vezuju se za specifične epitope na antigenima virusa. Nakon ispiranja, preparat se gleda pod fluorescentnim mikroskopom. Ova metoda može se primeniti i za ispitivanje otisak preparata pljuvačnih žlezda, odnosno rožnjače (cornea test), doduše sa znatno manjom pouzdanošću (Ercegovac, 1987; Trimarchi i Smith, 2002).

Veoma visoka pouzdanost, lako i brzo izvođenje učinili su da direktna imunofluorescencija postane najšire primenjivana metoda u svakodnevnoj dijagnostici besnila. Ipak, za dokazivanje virusnog antigena u ispitivanom tkivu koriste se i neke druge metode, među kojima je najznačajnija imunohistohemija. Ova metoda se uglavnom primenjuje na tkivu koje je fiksirano u formalinu, što omogućava njegovu konzervaciju i u mnogome smanjuje rizike transporta i rukovanja uzorcima. Sa druge

strane, ona ima i određena ograničenja jer se iz takvih uzoraka virus ne može kultivirati, a senzitivnost je smanjena zbog izlaganja antigena hemikalijama i visokim temperaturama. Ipak, sa nedavnim poboljšanjima metode, u smislu promene protokola sa ciljem što boljeg demaskiranja i što manjeg oštećenja antigena, korišćenjem savremenih sistema za vizuelizaciju i monoklonskih antitela, imunohistohemija se po pouzdanosti gotovo potpuno izjednačila sa direktnom imunofluorescijom u svežim otiscima (Hamir i sar., 1995; Niezgodna, 1999; Trimarchi i Smith, 2002).

Virusni proteini u ispitivanom uzorku mogu se dokazati i metodom direktne ELISA-e. Ona pruža solidnu senzitivnost, pod uslovom da se koriste sveži uzorci, a rezultati se dobiju za par časova, što je čini pogodnom za korišćenje u terenskim uslovima. Međutim, iako se može koristiti za potvrdno testiranje kao podrška direktnoj imunofluorescenciji, ova metoda se u laboratoriji ne koristi za primarnu dijagnostiku besnila (Trimarchi i Smith, 2002).

Kao potvrdni testovi u dijagnostici besnila najčešće se koriste biološki ogled i kultivacija virusa na kulturi ćelija. Njihova velika prednost je što daju mogućnost dalje karakterizacije virusa antigenim ili genetičkim analizama. Biološki ogled na miševima je osetljiva i veoma pouzdana metoda (Surreau i sar., 1991). Mali komadi svakog dela mozga koji su već ispitani direktnom imunofluorescijom se zajedno homogenizuju, a potom se taj homogenizat intracerebralno inokuliše miševima. Miševi se posmatraju narednih trideset dana, a oni koji razviju znake bolesti se odmah žrtvuju i pregledaju metodom direktne imunofluorescije. Prednosti biološkog ogleda su visoka senzitivnost kod slabo pozitivnih uzoraka, mogućnost primene kod delimično autolizovanih uzoraka i relativno lako izvođenje. Glavna mana, pored etičkih principa, je svakako njegovo relativno dugo trajanje, s obzirom da se prvi znaci bolesti obično jave sedam do dvadeset dana nakon inokulacije (Trimarchi i Smith, 2002).

Problem trajanja izolacije virusa *in vivo*, odnosno korišćenjem biološkog ogleda, može se znatno smanjiti inokulacijom i detekcijom virusa na kulturi ćelija. Obično se koristi linija mišjih neuroblastoma ćelija, u koje se inokuliše homogenizat. Nakon jednog do par dana vrši se pregled metodom direktne imunofluorescije, a kod pozitivnih uzoraka zapažaju se intracitoplazmatske inkluzije, takozvani fluorescentni čvorići. Osetljivost metode, koja se može dodatno povećati dodavanjem DEAE-

dekstrana ćelijskoj kulturi, je ista kao kod biološkog ogleda (Webster i Casey, 1996). Obzirom da se rezultati mogu dobiti u kraćem vremenskom periodu, izolacija virusa na kulturi ćelija ima znatno veću praktičnu primenu od biološkog ogleda, naročito kod dijagnostike slabo pozitivnih uzoraka koji nisu otkriveni primarnim testom direktne imunofluorescencije (Rudd i Trimarchi, 1980; Trimarchi i Smith, 2002).

Poslednjih decenija u dijagnostici mnogih bolesti, pa i besnila, koriste se molekularne metode, koje se zasnivaju na hibridizaciji ili amplifikaciji nukleinske kiseline u ispitujućem uzorku. U ove metode se ubrajaju *in situ* hibridizacija, kojom se virusna ribonukleinska kiselina dokazuje u tkivu, i blot hibridizacija, kojom se virusna RNK ekstrahuje na membrane i na njima vizuelizuje. Hibridizacija je tehnički prilično zahtevna metoda, dugotrajna je i ne omogućava brzo dobijanje rezultata, a senzitivnost je često niža nego kod imunofluorescencije, naročito ako se radi o autolitičnim tkivima (Jackson i Rintoul, 1992; Trimarchi i Smith, 2002). I pored toga, *in situ* hibridizacija ima primenu u proučavanju patogeneze bolesti, i kao potvrdna metoda u laboratorijskoj dijagnostici, dok se blot hibridizacija može koristiti za povećanje specifičnosti i senzitivnosti PCR-a (Whitby i sar., 1997; Sabouraud i sar., 1999).

Molekularna metoda koja se zasniva na amplifikaciji nukleinske kiseline je lančana reakcija polimeraze. Pošto se radi o RNK virusu, lančanoj reakciji polimeraze prethodi reverzna transkripcija, pa se stoga ova metoda naziva reverzna-transkriptaza PCR (RT-PCR). Zasniva se na umnožavanju određenih ciljnih sekvenci virusne ribonukleinske kiseline, koje se potom upoređuju sa kontrolnim sekvencama. Izuzetno je brza i ima jako visoku osetljivost, a može se primeniti i na tkivima koja su previše autolizovana da bi se mogla pregledati metodom direktne imunofluorescencije. Sem toga, njome se virus može dokazati i u uzorcima koji nisu pogodni za imunofluorescenciju, kao što su pljuvačka ili cerebrospinalna tečnost (Heaton i sar., 1997; Crepin i sar., 1998; Noah i sar., 1998). Međutim, njena senzitivnost u mnogome zavisi od izabranog prajmera, koji treba da efikasno umnoži sekvence virusne ribonukleinske kiseline, i da pritom obuhvati sve genotipove virusa.

Važno je napomenuti da direktna imunofluorescencija kao metoda izbora za dijagnostiku besnila ima dovoljnu specifičnost, senzitivnost i brzinu, a tehnički je znatno manje zahtevna od molekularnih tehnika. U gotovo svim uzorcima koji su uzeti

od životinja u terminalnoj fazi infekcije, virus besnila se nalazi u velikoj količini i može se brzo i lako dokazati ovom metodom. Lažno negativni rezultati su potencijalno veći problem kod molekularnih tehnika, jer je kod lisavirusa homologija veća kod aminokiselinskih nego kod nukleotidnih sekvenci, a novi izolati virusa će pre imati ista antigenska mesta kao poznati izolati nego iste nukleotidne sekvence (Bourhy i sar., 1993; Trimarchi i Smith, 2002).

Za *ante mortem* dijagnostiku besnila, koja je ipak znatno češća u humanoj nego u veterinarskoj medicini, koriste se uzorci salive, krvni serum, cerebrospinalna tečnost, otisak rožnjače, biopsije kože vrata i mozga. U uzorcima salive virus besnila se može dokazati metodom RT-PCR. Važno je napomenuti da trahealni aspirati i sputum nisu pogodni uzorci za dijagnostiku besnila. U uzorku kože vrata virus se može dokazati direktnom imunofluorescencijom u zamrznutim isečcima ili RT-PCR-om.

Za određivanje prisustva specifičnih antitela protiv virusa besnila u krvnom serumu ispitivane životinje ili čoveka može se koristiti nekoliko seroloških metoda: reakcija vezivanja komplementa, indirektna imunofluorescencija, inhibicija hemaglutinacije, pasivna hemaglutinacija, serum neutralizacioni test, redukcija plakova, gel difuzija, radioimunološki test, test redukcije fluorescentnih žarišta i imunoenzimski (ELISA) test (Cvetnić, 1989; Trimarchi i Smith, 2002). Ipak, najčešće korišćeni testovi su indirektna imunofluorescencija i virus neutralizacioni test. Ukoliko nije aplikovana vakcina ili imuni serum, prisustvo antitela u krvnom serumu predstavlja i dijagnozu besnila.

Cerebrospinalna tečnost se može pregledati virus neutralizacionim testom i RT-PCR-om. Prisustvo specifičnih antitela protiv virusa besnila u cerebrospinalnoj tečnosti, bez obzira na eventualnu prethodnu imunizaciju, predstavlja dijagnozu bolesti.

Otisci rožnjače, koji se dobijaju trljanjem mikroskopske pločice o nju, mogu se pregledati metodom direktne imunofluorescencije ili RT-PCR-om. Istim metodama se testiraju i uzorci dobijeni biopsijom mozga (Trimarchi i Smith, 2002).

## 2.7.1. Diferencijalna dijagnostika

Većina kliničkih simptoma besnila je pre opšta nego specifična. Kod pasa se relativno često pojavljuju bolesti čiji su simptomi manje ili više slični simptomima besnila, pa ih je moguće zameniti, naročito pri pojavi razdražljivosti. Kod akutnih meningitisa i encefalitisa može se pojaviti jaka uzbuđenost, ponekad uz agresivno ponašanje i nagon za ujedanjem. U takvim slučajevima treba pratiti dalji tok bolesti, jer se paraliza kod drugih bolesti nervnog sistema ne pojavljuje u takvom toku i obliku kao kod besnila. Puerperalna tetanija i epilepsija se manifestuju opštim kloničnim grčevima, a nervna forma štenećaka, koja se obično javlja kod mlađih pasa, kataralnim promenama na gotovo svim sluznicama i specifičnim egzantemom. Kod Aujeskijeve bolesti, koja se često naziva i lažnim besnilom, nema agresivnog ponašanja, ali je jako izražen svrab na pojedinim delovima tela, izuzev ukoliko je infekcija nastala preko sluznice usta, kada izostaje. Bolest po pravilu ima brži tok od besnila a mortalitet je stoprocentni (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989).

Hronični ili učestali bol na nekom delu tela može toliko da razdraži životinju, da se pojave napadi nemira, koji mogu podsećati na besnilo. Do ovoga može doći kod trovanja arsenom, olovom ili živom, velikog broja crevnih parazita, akutnih enteritisa, perforacije ili neprohodnosti creva, reumatizma pasa, kolika ili žuravosti konja, prisustva ektoparazita u spoljašnjem ušnom kanalu goveda i slično. Važno je napomenuti da se tokom ovih bolesti ne javljaju paralize.

Prisustvo stranih predmeta u jednjaku ili među zubima pasa i mačaka može pobuditi sumnju na besnilo, jer su životinje nemirne, cedi se mnogo pljuvačke, glas im je često promukao zbog perilaringealnog edema, i drže usta otvorena kao da imaju paralizu žvakaće muskulature. Međutim, na drugim delovima tela nema znakova paralize.

Sem toga, treba isključiti toksoplazmozu pasa i mačaka, povrede glave i oštećenja centralnog nervnog sistema, kao i neoplazme. Kod mačaka treba isključiti i trovanja organofosfatima i benzoičnom kiselinom, kao i deficit tiamina (Cvetnić, 1989).

Kod goveda se simptomi slični besnilu mogu javiti kod listerioze, bovine spongiformne encefalopatije, prisustva stranog tela u ždreleu i jednjaku, sunčanice, ketoze, trovanja olovom, hipovitaminoze A i hipomagnezijemije teladi i slično. Kod ovaca treba imati u vidu skrepi, cenurozu, listeriozu, cerebrokortikalnu nekrozu, kod svinja klasičnu kugu, rahitis, eklampsiju, trovanje kuhinskom soli i slično. Kod divljači takođe treba uzeti u obzir encefalitise, trovanja i jake invazije parazita. Kod srna je relativno česta Aujeskijska bolest, a kod lisica se sreće nervna forma štenećaka.

Kod ljudi diferencijalno dijagnostički u obzir dolaze tetanus, kod koga je tok bolesti znatno duži a prisebnost očuvana, akutni encefalitis, poliomijelitis, postvakcinalni mijelitis, histerija ili lisofobija. Neurotične osobe koje su bile u kontaktu sa životinjom sumnjivom na besnilo mogu simulirati konvulzivne napade, naročito spazam ždrelna muskulature. U takvim slučajevima "inkubacija" je veoma kratka. Neuroparalitički incidenti prilikom vakcinacije mogu biti teški, a u fatalnim slučajevima se ponekad ne mogu razlikovati od besnila. Međutim, oni su veoma retki nakon uvođenja u upotrebu vakcina dobijenih na kulturi ćelija (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989).

## **2.8. Imunologija**

Virus besnila ima izraženi tropizam prema nervnom tkivu. Odgovor imunskog sistema tokom infekcije virusom besnila je veoma specifičan, zbog "imunoprivilegovanog" statusa nervnog sistema. Ovaj status se zasniva na restrikciji migracije imunskih T-ćelija, kao i nedostatku specifičnih antigen-prezentujućih ćelija. Pored toga, infekcija virusom besnila dovodi do supresije imunskog sistema na periferiji tj. u slezini, što još više smanjuje njegovu efikasnost. Kao rezultat, postoji opšta subverzija imunskog sistema domaćina od strane virusa besnila, što predstavlja njegovu



veoma uspešnu adaptaciju. Samim tim, prirodni kapacitet organizma domaćina za borbu protiv ovako adaptiranog virusa je značajno ograničen (Lafon, 2002).

Dugo se smatralo da je centralni nervni sistem izolovan od uobičajenog imunskog odgovora isključivo zahvaljujući postojanju pasivnih barijera (npr. tesnoj vezi između endotela u krvno-moždanoj barijeri ili odsustvu limfnih sudova). Činjenica je da krvno-moždana barijera gotovo u potpunosti onemogućava prolazak antitela i komplekta u centralni nervni sistem (Miller, 1999), međutim nakon oštećenja moždanog parenhima, koje se može dogoditi tokom infekcije, proinflammatory citokini i hemokini privlače aktivirane limfocite koji mogu da prođu kroz krvno-moždanu barijeru (Hickey i sar., 1991). Prisustvo B ćelija u mozgu je dokazano tokom infekcije i nakon intracerebralne inokulacije antigena (Hatalski i sar., 1998). Nakon prolaska kroz krvno-moždanu barijeru aktivnost T limfocita, odnosno njihovu sposobnost da se izbore sa infekcijom u centralnom nervnom sistemu, ograničavaju tri faktora: 1. neefikasno prezentovanje antigena (aktivna inhibicija MHC molekula klase I i II od strane neurona i nepostojanje profesionalnih antigen-prezentujućih ćelija); 2. apoptoza aktiviranih limfocita; 3. Imunosupresija T ćelija, naročito Th 1 ćelija od strane imunosupresivnih faktora kao što su norepinefrin i vazoaktivni intestinalni peptid (Lafon, 2002).

Ekspresija MHC molekula klase I na neuronima i kostimulatornih molekula na moždanim ćelijama i endotelu kapilara je minimalna, što znači da se T ćelije koje mogu da prođu kroz krvno-moždanu barijeru gotovo uopšte ne aktiviraju. Smatra se da živi neuroni suzbijaju ekspresiju MHC molekula klase I, tako da u zdravom centralnom nervnom sistemu nema prezentacije antigena (Neuman i sar 1995). Pored toga, živi neuroni suprimiraju ekspresiju MHC molekula klase I i II na glija ćelijama i na sopstvenoj površini, dok je oštećeni neuroni dozvoljavaju. Ova aktivna kontrola ekspresije MHC molekula čini da inficirani neuroni ne mogu da prezentuju strane antigene, što je i dokazano korišćenjem jonskog transporta ili sekrecijom solubilnih neuropeptida (Lafon, 2002).

Nakon povrede ili stresa neke parenhimske ćelije koje imaju mogućnost ekspresije MHC molekula klase II, na primer glija ćelije, mogu postati antigen prezentujuće ćelije. One takođe proizvode IL-12, koji je bitan za stvaranje Th1 ćelijskog odgovora. Međutim, aktivirani astrociti, koji su slabe antigen-prezentujuće ćelije,

inhibiraju ovaj a favorizuju Th2 ćelijski odgovor. Prema tome, postoji aktivna disregulacija prezentacije stranog antigena preko Th1 ćelijskog mehanizma (Aloisi, 2000; Lafon, 2002).

Veoma bitna činjenica u razvijanju primarnog odgovora imunskog sistema domaćina na patogen jeste migracija antigen prezentujućih ćelija sa mesta infekcije do sekundarnih limfoidnih organa. Glija ćelije su rezidentne ćelije centralnog nervnog sistema i ne napuštaju ga, tako da u slučaju da je prisustvo antigena ograničeno samo na centralni nervni sistem, kao kod besnila, one mogu prezentovati antigene virusa besnila, ali ne mogu pokrenuti primarni imunski odgovor protiv njega jer ne dolaze do sekundarnih limfoidnih organa. Ipak, aktivacija specifičnih limfocita je moguća ako peptidi patogena dođu do dendritičnih ćelija, profesionalnih antigen prezentujućih ćelija koje su prisutne u meningama, cerebrosposinalnoj tečnosti i horoidnom pleksusu. To su migratorne ćelije koje mogu da napuste centralni nervni sistem i preko krvnih sudova dospevaju do sekundarnih limfoidnih organa, na primer cervikalnih limfnih čvorova, gde učestvuju u razvijanju primarnog imunskog odgovora protiv virusnih antigena. Nakon toga, patogen-specifični limfociti mogu da migriraju kroz krvno-moždanu barijeru i uđu u centralni nervni sistem (Lafon, 2002).

Ipak, još uvek nije potpuno jasno da li aktivirani citotoksični limfociti koji dospeju u centralni nervni sistem mogu eliminisati inficirane nervne ćelije. Smatra se da aktivirani limfociti koji na svojoj površini nose Fas molekule bivaju uništeni prilikom susreta sa Fas ligand molekulima (FasL) koji se nalaze na rezidencijalnim ćelijama centralnog nervnog sistema, poput neurona ili astrocita (Bechmann i sar., 1999; Flugel i sar., 2000; Lafon, 2002). Fas je molekul koji pripada familiji tumor nekrotičnog faktora alfa (TNF- $\alpha$ ), a prilikom njegove interakcije sa FasL molekulom dolazi do aktivacije kaspaze, što dovodi do smrti ćelije koja ga nosi. Smatra se da upravo ovaj mehanizam Fas/FasL apoptoze može biti veoma značajan u ograničavanju funkcije infiltriranih limfocita u centralnom nervnom sistemu (Lafon, 2002).

Na supresiju imunskog odgovora kod besnila utiču i endogeni imunosupresivni faktori koje stvaraju glija ćelije centralnog nervnog sistema: TGF- $\beta$  (transformišući faktor rasta),  $\alpha$ -MSH (melanocitni stimulišući hormon), VIP (vazoaktivni intestinalni peptid) i CGRP (kalcitonin-gen peptid). Pored toga, neodgovarajuća prezentacija

antigena od strane neprofesionalnih antigen-prezentujućih ćelija može izazvati inhibiciju, pre nego aktivaciju T ćelija. Efikasnost ovih mehanizama i prijemčivost različitih loza limfocita (B ćelija, CD4+ T ćelija, CD8+ T ćelija) na njih nije u potpunosti poznata i zahteva nova istraživanja. Ipak, na osnovu dostupnih podataka može se zaključiti da centralni nervni sistem nije pravo mesto za efikasan imunski odgovor. Ova činjenica može predstavljati adaptivni mehanizam koji ima za cilj da zaštiti nervno tkivo i specijalizovane ćelije, kao što su neuroni, koje imaju ograničen regenerativni potencijal i čija je funkcija neophodna za život (Gold i sar., 1996; Lafon, 2002).

Normalni imunski odgovor na periferiji organizma je moguć u slučaju filtracije virusnog antigena od strane profesionalnih migrirajućih dendritičnih ćelija iz centralnog nervnog sistema, odnosno vakcinacije. Međutim, efikasnost na ovaj način aktiviranih limfocita može biti potpuno uništena Fas/FasL mehanizmom ili imunosupresivnim faktorima u centralnom nervnom sistemu (Lafon, 2002).

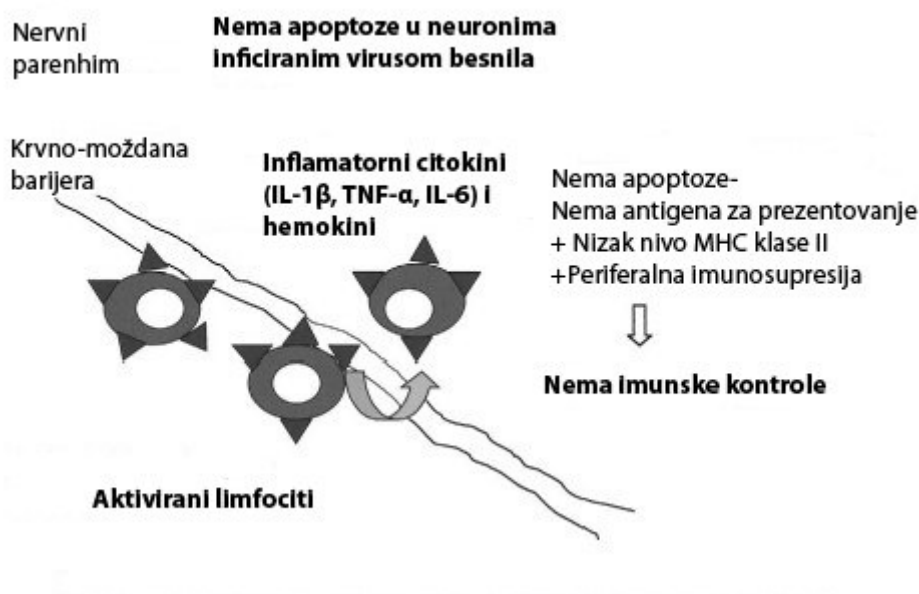
Imunoreaktivnost centralnog nervnog sistema u toku infekcije virusom besnila je proučavana na miševima koji su eksperimentalno inficirani CVS (*challenge virus standard*) sojem fiksiranog virusa koji izaziva fatalnu infekciju. Nakon aplikovanja virusa u miškulaturu zadnjih nogu, dolazi do progresivne infekcije kičmene moždine i mozga, koja je praćena produkcijom inflamatornih citokina interleukina 1 (IL1), TNF- $\alpha$ , interleukina 6 (IL6) i hemokina (npr. MCP1). Oni privlače limfocite koji prolaze kroz krvno-moždanu barijeru (Marquette i sar., 1996; Camelo i sar., 2000; Lafon, 2002). Ipak, uloga ovih limfocita u saniranju infekcije je vrlo diskutabilna. Eksperimentalno je utvrđeno da je tok infekcije istovetan kod imunokompetentnih miševa i miševa koji nemaju T ćelije. To ukazuje na činjenicu da T limfociti koji su infiltrirani u centralni nervni sistem ne mogu da kontrolišu akutnu infekciju, odnosno da virus besnila praktično podriva imunski sistem domaćina. Neefikasnost migratornih T limfocita kod infekcije virusom besnila može da ukazuje na to da: 1. T ćelije nisu specifične za virus besnila, 2. da su anergične ili 3. da ubrzo nakon ulaska u centralni nervni sistem bivaju uništene apoptozom (Lafon, 2002). Prva mogućnost je još uvek na nivou pretpostavke i nije eksperimentalno dokazana, dok druga može biti rezultat slabe ekspresije MHC molekula klase II na glija ćelijama inficiranog centralnog nervnog sistema (Irwing i sar.,

1999). Poslednja mogućnost ide u prilog činjenici da centralni nervni sistem ima imunoprivilegovani status. U kičmenoj moždini eksperimentalno inficiranih miševa devetog dana nakon infekcije utvrđeno je prisustvo velikog broja apoptotičnih ćelija, a specijalnim bojenjima je dokazano da se radi o CD3+ T ćelijama (Camelo i sar., 2000). Zanimljivo je da je destrukcija aktiviranih T limfocita u centralnom nervnom sistemu zabeležena i kod infekcije Sindbis virusom (humani arbovirus). Iz svega toga može se izvesti zaključak da je prirodni imunski odgovor organizma prilikom infekcije centralnog nervnog sistema virusom besnila redukovan, odnosno da je u najvećoj meri očuvan privilegovani status centralnog nervnog sistema.

Pored sposobnosti da izbegne imunski odgovor u centralnom nervnom sistemu, virus besnila ima sposobnost da uruši imunski sistem domaćina van centralnog nervnog sistema, tačnije u slezini. Za razliku od HIV infekcije, kod koje imunosupresija nastaje usled uništavanja efektorskih ćelija imunskog sistema, kod besnila je imunosupresija rezultat infekcije nervnog sistema koja indukuje neuroimunsku disregulaciju (Lafon, 2002).

Fatalni encefalitis izazvan patogenim sojevima virusa besnila je praćen imunodepresijom koju karakterišu jako loš limfocitni odgovor i gubitak celularnog imuniteta. Eksperimentalno je dokazano da u slezini istovremeno dolazi do pada limfoproliferativnog odgovora, koji je povezan sa smanjenjem broja splenocita koji proizvode IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  (komponente Th1 mehanizma), dok je broj ćelija koji proizvode IL-4 nepromenjen (Th2 mehanizam). Pri tome, nisu zabeležene kvantitativne promene u različitim populacijama limfocita koji se stvaraju u slezini (CD4+ i CD8+ T ćelije, B ćelije, NK ćelije). Ublažavanje odgovora imunskog sistema domaćina zavisi od patogenosti virusa besnila. Na primer, zabeleženo je da Pasterov soj virusa ne izaziva imunodepresiju, što upućuje na zaključak da je za to potrebna određena disfunkcija ili inflamacija centralnog nervnog sistema (Perrin i sar., 1996; Camelo i sar., 2001). Nasuprot tome, eksperimentalno je dokazano da deplecija limfoidnih ćelija, koja karakteriše infekciju virusom besnila, nije pod kontrolom nervnog sistema, odnosno hipotalamus-hipofiza-nadbubreg osovine (HPA), čije presecanje nije uticalo na specifični citotoksični odgovor (Wiktor i sar., 1985). Novija istraživanja govore da centralni nervni sistem, pored hormonalne kontrole imunskog odgovora, može da utiče

na aktivnost perifernih organa imunskog sistema preko kateholamina. Iako sam mehanizam nije potpuno razjašnjen, smatra se da eferentna nervna vlakna luče kateholamine koji se vezuju za specifične receptore na imunskim ćelijama i stimulišu lučenje citokina (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10), što remeti imunski odgovor (Straub i sar., 1998).



**Šema 3.** CNS je imunski privilegovan tokom infekcije virusom besnila (Lafon, 2002)

Redosled događaja koji se dešavaju tokom encefalitisa izazvanog virusom besnila je prikazan na šemi 3. Nakon ulaska virusa u nervni sistem, odnosno terminalne nervne završetke, on putuje kroz mrežu nerava ka centralnom nervnom sistemu. Infekcija izaziva produkciju hemokina i inflamatornih citokina koji privlače aktivirane limfocite da migriraju kroz krvno-moždanu barijeru. Međutim, ovi limfociti nisu specifični za virus besnila, jer nisu aktivirani na periferiji, što je posledica nepostojanja inficiranih ćelija van centralnog nervnog sistema, odnosno odsustva virusnog antigena koga bi "videle" profesionalne antigen prezentujuće ćelije. Virus besnila u centralnom nervnom sistemu izaziva necitopatogenu infekciju tokom koje je očuvan fizički integritet nervnih ćelija, te stoga ne postoji slobodni antigen koga bi antigen

prezentujuće ćelije mogle da pokupe i isporuče imunskom sistemu. Nedostatak specifičnog odgovora je dodatno pojačan sposobnošću patogenih sojeva virusa besnila da izazovu perifernu imunosupresiju. Kao posledica toga, virus besnila izbegava imunski odgovor organizma domaćina i invadira celokupni nervni sistem (Lafon, 2002).

## 2.9. Terapija i profilaksa

Besnilo divljih i domaćih životinja, kao i ljudi, predstavlja fatalnu bolest. Ne postoji uspešna terapija za kliničko besnilo, a spontano izlečenje, uz par izuzetaka, nije moguće (Ercegovac, 1987; Hemachudha 1994; Dutta i Dutta, 1994). Smatra se da je svega dvoje ljudi prebolelo bolest nakon što su se pojavili klinički simptomi: devetogodišnji dečak iz Ohaja, SAD, koji je izlečen 1970. godine, i četrdesetpetogodišnja žena iz Argentine, 1972. godine. Terapija koja se primenjuje kod ljudi se svodi na sedaciju i održavanje vitalnih funkcija, i njome se može produžiti život pacijenta. Simptomatska terapija se sastoji u ublažavanju komplikacija, kao što su hipoksija, srčana aritmija, hipotenzija, edem mozga, jatrogene komplikacije i slično. Stručnjaci Svetske zdravstvene organizacije preporučuju da se intenzivno lečenje usmeri na podržavanje funkcije respiratornog i kardiovaskularnog sistema, održavanje ravnoteže elektrolita i rehidraciju, i daju neuroleptici i antikonvulzivni lekovi. Smatra se da primena antirabičnog hiperimunog globulina ili vakcine kod pacijenata sa kliničkim simptomima bolesti nije delotvorna (Cvetnić, 1989; de Mattos i sar., 2001). Upravo zbog toga, tretman besnila je uglavnom usmeren na ujed potencijalno besne životinje i prevenciju bolesti primenom postekspozicione profilakse.

Pod ekspozicijom se smatra situacija pri kojoj virus besnila može da uđe u organizam čoveka ili životinje kroz otvorenu ranu ili mukoznu membranu. Pošto virus besnila ne može da uđe u telo kroz intaktnu kožu, boravak u neposrednoj blizini ili dodirivanje besne životinje ne smatra se ekspozicijom. Ona se najčešće dešava prilikom ujeda, ali i kontaminacije postojećih lezija na koži ili otvorenih rana salivom ili nervnim tkivom besne ili životinje sumnjive na besnilo (Briggs, 2002).

U slučaju da se desio ujed životinje koja je klinički zdrava, ona se stavlja na posmatranje. Ako u narednih deset (po nekim izvorima i za neke sojeve virusa dvanaest, pa i petnaest dana) životinja ne pokaže kliničke simptome besnila, smatra se da u momentu ujeda u njenoj pljuvački nije bilo virusa (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989; Briggs, 2002).

Postekspozicioni tretman počinje čišćenjem rane, što predstavlja prvu liniju odbrane od besnila, i treba ga sprovesti što pre nakon ekspozicije. Sve rane treba detaljno očistiti vodom i sapunom, isprati, a potom tretirati nekim virucidnim sredstvom, na primer preparatima na bazi kvaternarnih amonijumovih baza (Asepsol) i povidon jodidom (Hatchett, 1991). Na taj način vrši se odstranjivanje virusa fizičkim i hemijskim putem, i samim tim smanjuje mogućnost infekcije. Protokol nalaže da se kod ujednih rana primeni i antitetanusna profilaksa, a kod većih oštećenja tkiva i antibiotska terapija. Primarno zatvaranje rana zašivanjem treba izbegavati kad god je to moguće, u najmanju ruku treba ga odložiti do aplikacije hiperimunog seruma (Wilde, 1997).

U cilju obezbeđivanja trenutnog pasivnog imuniteta, postekspozicioni tretman uvek treba da uključuje i aplikaciju antirabičnog hiperimunog seruma. Proizveden je na ljudima, mada se nekada koristio i onaj proizveden na konjima, i aplikuje se u ranu i oko rane u dozi od 20 internacionalnih jedinica po kilogramu telesne mase. Ostatak humanog antirabičnog imunoglobulina koji nije aplikovan u ili oko rane se aplikuje intramuskularno u deo tela koji je udaljen od tretirane rane. U slučajevima kada je količina hiperimunog seruma nedovoljna da bi se obradile sve postojeće rane, treba ga razrediti u fosfatnom puferu, a nikako povećati dozu, jer klinička ispitivanja govore da to može smanjiti stvaranje antirabičnih neutralizirajućih antitela i efekat vakcinacije (Khawplod i sar., 1996; Lang i sar., 1998).

Istovremeno sa hiperimunim serumom, pacijentu se daje i jedna doza antirabične vakcine. Vakcina se aplikuje intramuskularno u deltoidnoj regiji, nikako u glutealnoj, jer to može dovesti do stvaranja manjeg nivoa antitela (Fishbein i sar., 1988). Još četiri doze antirabične vakcine se daju trećeg, sedmog, četrnaestog i dvadesetosmog dana (Briggs, 2002). Utvrđeno je da su virus neutralizaciona antitela u krvi prisutna sedam do deset dana nakon imunizacije. Upravo zbog toga ima smisla aplikovati hiperimuni serum do sedam dana nakon vakcinacije ozleđene osobe, jer je nakon tog perioda

prisutan aktivni imunitet. Kod osoba koje su preekspoziciono imunizovane protiv besnila (veterinari, lovci, laboratorijsko osoblje), postekspoziciono se aplikuju dve doze vakcine, nultog i trećeg dana, bez antirabičnog seruma (Briggs, 2002).

Kod domaćih životinja postekspozicioni tretman se u većini slučajeva ne primenjuje. Preporuka je da se nevakcinisani psi i mačke koji su bili u kontaktu sa besnom ili na besnilo sumnjivom životinjom bez odlaganja eutanaziraju. U protivnom, životinju treba smestiti u karantin šest meseci, i vakcinisati mesec dana pre puštanja. Vakcinisane pse i mačke nakon ekspozicije treba odmah revakcinisati i držati pod striktnom kontrolom i posmatranjem narednih 45 dana. Životinje koje se koriste za ishranu u roku od sedam dana nakon ekspozicije treba poslati na klanje, s tim da se tkivo oko rane obavezno odstranjuje. U protivnom, ove slučajeve treba staviti na posmatranje narednih šest meseci (Briggs, 2002).

### **2.9.1. Vakcine**

Vakcinacija protiv besnila ima prilično dug istorijat. Prvu vakcinu razvio je Paster sa saradnicima 1885. godine. Ova, kao i vakcine koje su razvijene narednih godina, kao izvor antigena koristile su inficirano moždano tkivo, a virulencija je smanjena isušivanjem, odnosno izlaganjem infektivnog materijala visokim temperaturama u različitim vremenskim intervalima. Početkom dvadesetog veka Fermi i Semple su u proizvodnji vakcina protiv besnila počeli da koriste fenol za inaktivaciju virusa, i istu inaktivisanu suspenziju virusa za sve injekcije, nakon čega je vakcina postala znatno stabilnija i mogla se distribuirati u bočicama za individualnu upotrebu. Svetska zdravstvena organizacija je 1973. godine preporučila izbacivanje Fermi tipa vakcine iz upotrebe, pošto je često u sebi imala rezidualni živi virus, dok se Semple tip vakcine protiv besnila i danas koristi u nekim zemljama u razvoju. Prisustvo mijelinske komponente nervnog tkiva u Semple vakcini je kod nekih pacijenata izazivalo neuroparalitičke reakcije, a da bi se to prevazišlo razvijena je vakcina dobijena inficiranjem novorođenih miševa virusom besnila. Ona se trenutno još uvek koristi u zemljama Latinske Amerike, Azije i Afrike. Sve ove vakcine koje su dobijene iz



nervnog tkiva, iako su kroz istoriju sačuvale mnoge živote, imaju mnogobrojne nuspojave i danas se smatraju prevaziđenim (Briggs i sar., 2002).

Mnoge mane vakcina proizvedenih na nervnom tkivu su prevaziđene kada je u upotrebu ušla vakcina proizvedena na pilećim embrionima. Za njenu proizvodnju je korišćen humani Flury izolat virusa besnila, nakon 40 do 50 pasaža na pilećim embrionima. Ova LEP (*low-egg-passage*) vakcina je bila prilično efikasna kod pasa, ali je povremeno izazivala besnilo kod mladih štenadi, mačaka i goveda. Zbog toga je broj pasaža povećan na 205, a HEP (*high-egg-passage*) vakcina bila je potpuno bezbedna za upotrebu i na ovim životinjskim vrstama (Bunn, 1991; Briggs i sar., 2002).

Prva humana vakcina protiv besnila koja nije proizvedena na nervnom tkivu, već na pačijim embrionima, postala je komercijalno dostupna 1957. godine. Prva moderna vakcina protiv besnila koja je dobijena na kulturi ćelija, tačnije na humanim diploidnim ćelijama, počela je da se koristi 1978. godine. U odnosu na prethodno korišćene vakcine, ona proizvodi znatno jači imunski odgovor i znatno blaže alergijske reakcije (Plotkin, 1980).

Za vakcinaciju životinja danas se u svetu koriste dve grupe vakcina: atenuirane (modifikovane žive) i inaktivisane vakcine. Za proizvodnju atenuiranih vakcina najčešće se koriste Flury i Kaley virusi na pilećim embrionima, odnosno ulični Alabama Dufferin virus, na kulturi ćelija bubrega hrčka i Evelyn-Rokitnicki-Abelseth (ERA) izolat, na kulturi ćelija bubrega praseta. Ove vakcine se danas koriste uglavnom ekstenzivno u Aziji i Africi i delovima Evrope, gde su adaptirane za oralnu imunizaciju divljih mesojeda (Blancou i Meslin, 1996). Iako je efikasnost atenuiranih vakcina dokazana njihovom dugogodišnjom upotrebom u mnogim krajevima sveta, sve više se koriste inaktivisane vakcine, a brojne su i države u kojima atenuirana vakcina uopšte nije licencirana za upotrebu (Briggs i sar., 2002).

Za proizvodnju inaktivisanih vakcina koriste se visoke koncentracije različitih sojeva virusa besnila, koji se mogu umnožavati *in vivo* ili *in vitro*. Za umnožavanje *in vivo*, koje je prilično jednostavno, ali se sve više izbacuje iz upotrebe zbog etičkih razloga, koriste se obično mladunci miševa, pacova ili kunića. Najbolje rezultate daju vakcine proizvedene od virusa umnoženog na mladuncima miševa, jer ne sadrže

antigenski mijelin, koji povremeno može izazvati alergijske reakcije (Briggs i sar., 2002). Za umnožavanje *in vitro* uglavnom se koriste sojevi dobijeni od Pasterovog soja, ređe Flury soja virusa, i kulture ćelija bubrega hrčka, mozga zamorčeta, humanih diploidnih ćelija, ređe Vero ćelije, pilećih fibroblasta ili bubrega psa (Cvetnić, 1989; Precausta i Soulebot, 1991; Recular, 1996). Virus se inaktivira korišćenjem ultravioletnog svetla, acetililenamina, ili u poslednje vreme najčešće betapropiolaktona. Fenol i formaldehid, koji su ranije korišćeni u tu svrhu, su izbačeni iz upotrebe (Recular, 1996). Nakon inaktiviranja virusa, vakcinama se dodaju adjuvansi, koji pojačavaju imunski odgovor na virusni antigen. Obično se kao adjuvansi koristi aluminijum-hidroksid ili aluminijum-fosfat, za vakcine za goveda saponin, retko uljani adjuvansi (Precausta i Soulebot, 1991). Inaktivisane vakcine dobijene na kulturi ćelija su prilično stabilne, što ih čini pogodnim za kombinovanje sa drugim vakcinama. Sem toga, pokazale su se vrlo efikasnim i bezbednim za upotrebu, i danas predstavljaju najšire upotrebljavanu vakcinu protiv besnila u svetu (Briggs i sar., 2002).

Nakon vakcinacije protiv besnila moguće su nuspojave, odnosno neželjeni efekti. Najteži neželjeni efekat je svakako pojava vakcinalnog besnila, što predstavlja posledicu korišćenja nedovoljno oslabljenog vakcinalnog virusa. Postoje podaci da je vakcinalno besnilo registrovano tokom šezdesetih i sedamdesetih godina dvadesetog veka kod više životinjskih vrsta koje su vakcinisane atenuiranom vakcinom dobijenom iz Flury, SAD i Kissling sojeva virusa (Ercegovac, 1987; Cvetnić, 1989). Povećanjem broja pasaža vakcinalnog virusa, a kasnije i prelaskom na inaktivisane vakcine, ovaj problem je u potpunosti prevaziđen. Savremene inaktivisane vakcine, zbog korišćenja veće količine antigena i adjuvanasa, ipak mogu dovesti do lokalnih i sistemskih postvakcinalnih reakcija. Najčešće reakcije su bolnost na mestu aplikacije, šepavost i regionalna limfadenopatija. Mogu se pojaviti i anafilaksa, groznica, fokalni vaskulitis, granulomi, a kod mačaka su relativno česti sarkomi, koji su obično invazivni, a razviju se nekoliko meseci nakon vakcinacije (Green i Dreesen, 1998; Dubielzig i sar., 1993).

Prethodnih dvadesetak godina radi se na razvijanju novih generacija vakcina, koje bi bile dovoljno stimulativne za imunski sistem, a sa druge strane bez neželjenih sporednih efekata koji se ponekad vezuju za dosadašnje atenuirane i inaktivisane vakcine protiv besnila. Neke od inaktivisanih vakcina proizvedenih na kulturama ćelija

koje su danas u upotrebi su stoprocentno efikasne ukoliko se propisno upotrebljavaju. Međutim, njihova velika mana je visoka cena, što naročito pogađa zemlje u razvoju, kod kojih je besnilo još uvek veliki problem, i u kojima se još uvek upotrebljavaju vakcine dobijene na nervnom tkivu. Upravo zbog toga u svetu postoji potreba za efikasnim, modernim i jeftinim vakcinama protiv besnila. Rešenje bi moglo biti u takozvanim vektorskim vakcinama, u kojima se za ekspresiju glikoproteina virusa besnila, koji predstavlja glavnu imunogenu komponentu, koriste drugi virusi. Jedan od najčešće korišćenih vektora je virus boginja kanarinaca, koji nema mogućnost umnožavanja u ćelijama sisara, a indukuje jak odgovor imunskog sistema (Cadoz i sar., 1992). Ovaj tip vakcine je već registrovan u SAD kao kombinovana vakcina za upotrebu kod mačaka. Pored toga, ispituje se mogućnost korišćenja humanog adenovirusa kao vektora za ekspresiju glikoproteina virusa besnila (Xiang i sar., 1996). Jedna od bitnih karakteristika nove generacije vektorskih vakcina je da ne izazivaju gotovo nikakve sporedne efekte i alergijske reakcije (Green i Dreesen, 1998).

U poslednje vreme virusi biljaka, pre svega paradajza i duvana, takođe se koriste u razvijanju nove generacije vektorskih vakcina protiv besnila. Ove vakcine su prilično jeftine, pouzdane i bezbedne za upotrebu i distribuciju, tako da će u budućnosti sigurno dobiti na značaju, naročito u oralnoj vakcinaciji divljih životinja, gde su u eksperimentalnim studijama već pokazale zavidne rezultate (McGarvey i sar., 1995; Yusibov i sar., 1997; Yusibov i Koprowski, 1998).

Korišćenjem tehnologije za proizvodnju vakcina za DNK viruse, može se proizvesti jeftina vakcina protiv besnila koja će sadržati više antigenskih komponenti i pružati zaštitu protiv besnila i besnilu srodnih virusa. Trenutno se ova tehnologija ispituje na primatima, a cilj je da se razvije humana vakcina protiv besnila koja bi se upotrebljavala u oblastima u kojima su aktuelni i virusi srodni besnilu (Lodmell i sar., 1998).

## 2.10. Kontrola bolesti

I pored velikih napora koji su uloženi u njeno suzbijanje, besnilo je i dalje bolest koja predstavlja veliki problem u mnogim oblastima u svetu, naročito u zemljama u razvoju. Iz globalne perspektive javnog zdravstva psi se smatraju glavnom metom u suzbijanju bolesti, pošto još uvek predstavljaju glavne rezervoare besnila, odgovorne za veliku većinu prijavljenih slučajeva kod ljudi i domaćih životinja (OIE, 2014).

Ograničavanje kretanja pasa, eutanazija besnih pasa i pasa koji su bili u kontaktu sa besnim životinjama, odvajanje i opservacija sumnjivih pasa, kao i eutanazija pasa lotalica su klasične mere kojima je besnilo u većini evropskih zemalja u devetnaestom i prvoj polovini dvadesetog veka držano pod kontrolom. U periodu od 1950. do 1975. godine, masovna vakcinacija pasa, u kombinaciji sa uništavanjem pasa lotalica, dovela je do eliminacije psećeg virusa besnila u gotovo čitavoj Evropi. U pojedinim zemljama, na primer Nemačkoj i Austriji, eradikacija je bila toliko uspešna da je 1970. godine ukinuta obaveza vakcinisanja pasa, što se doduše pokazalo kao loša odluka. Kombinacija vakcinacije i klasičnih mera kontrole još uvek je metod izbora u situacijama kada je pseći virus unet u oblast zemlje koja je slobodna od besnila (Bogel, 2002).

U cilju borbe protiv jako velikog broja pasa lotalica, koji mogu predstavljati problem u kontroli besnila, politika njihovog masovnog uništavanja bila je široko prihvaćena širom sveta. Međutim, tokom godina se ovaj pristup pokazao krajnje neefikasnim, čemu u prilog govori podatak o jedva nešto preko 4% smanjene populacije pasa lotalica na godišnjem nivou (Bogel, 2002). Sem toga, ovaj procenat uklonjenih pasa je gotovo odmah kompenzovan novim, mahom nevakcinisanim jedinkama. Zbog toga je Svetska zdravstvena organizacija (WHO) dala preporuku da se ovakav pristup problemu promeni i da se primene mere koje imaju za cilj povećanje broja vakcinisanih pasa. Smatra se da bi u uslovima koji vladaju u zemljama u razvoju stepen vakcinacije pasa, uz nekoliko izuzetaka, mogao da dostigne 70-80%, što predstavlja dovoljnu zaštitu na nivou populacije. U poslednje vreme radi se na razvoju metodologije i vakcine za peroralnu vakcinaciju pasa, koja bi zamenila parenteralnu u zemljama u razvoju. To bi

svakako olakšalo kontrolu psećeg besnila u zemljama gde je tehnički teško i skupo vršiti injekcionu vakcinaciju, a globalna eradikacija besnila iz populacije pasa, kao jednog od glavnih rezervoara bolesti, postala bi dostižan cilj. Analize pokazuju da je eliminacija ili čak eradikacija besnila kod pasa izvodljiva i svakako ekonomičnija od održavanja skupih servisa za postekspozicioni tretman ljudi, nadzor bolesti i neadekvatnih mera za kontrolu besnila kod pasa (Bogel, 2002).

Mere kontrole besnila kod divljih životinja su prvi put primenjene 1915. godine na kojotima u Kaliforniji i Nevadi, a potom i šezdesetih godina dvadesetog veka u suzbijanju besnila lisica u Nemačkoj, Danskoj, Francuskoj i Mađarskoj. Reč je o klasičnim merama kontrole, koje su se zasnivale na smanjivanju broja, odnosno gustine populacije lisica i njenom održavanju na nivou koji ne pogoduje širenju bolesti – jedna lisica na 1,5 km<sup>2</sup>. Ove mere su se sastojale iz: gasiranja lisičjih jazbina, jamarenja, nalivanja vode u jazbine, hajke i lova iz zasede, trovanja lisica, postavljanja klopki i zamki i slično. Pošto pomenutim merama redukcije populacije lisica nisu postignuti očekivani rezultati, odnosno nije sprečeno zanaavljanje epizootija besnila kod lisica, a pokrenute su i brojne etičke rasprave, još šezdesetih godina započeto je ispitivanje mogućnosti njihove vakcinacije (Ercegovac, 1987; Finnegan, 2002).

Stručni komitet Svetske zdravstvene organizacije je 1966. godine uputio poziv za istraživanje moguće vakcinacije divljih životinja. Iako su svetske farmaceutske kuće duži niz godina razvijale vakcine za domaće životinje, činilo se da je njihova primena na divljači nemoguća. Jedan od prvih istraživača u toj oblasti, Džordž Ber, pokušao je da peroralno vakciniše lisice koristeći parenteralne vakcine LEP i HEP, i pokazao da je koncept peroralne vakcinacije divljači moguć (Baer, 1988; Johnston i Tinline, 2002). Vinkler je pokušao da izvrši vakcinaciju lisica zarobljenih u zamke pomoću automatskog injektora koji bi životinja sama aktivirala, ali se taj koncept ubrzo pokazao nepraktičnim, a rezultati vakcinacije nisu bili na zadovoljavajućem nivou. U tom periodu za redukciju broja lisica korišćeni su mamci koji su bili ispunjeni otrovom, pa je ova ideja poslužila i za prvu peroralnu vakcinaciju lisica, u Švajcarskoj 1977. godine. U kokošije glave, koje su služile kao mamac, bila je ubačena atenuirana vakcina, a ova kampanja je postigla zapažen rezultat i dala zamah razvoju celokupnog sistema vakcinacije divljih životinja protiv besnila (Johnston i Tinline, 2002). Nakon četiri

godine, antitela protiv virusa besnila su dokazana kod 50 % lisica sa tretiranog područja, a virus nije izolovan ni iz druge divljači niti sitnih glodara (Cvetnić, 1989).

Zahvaljujući ovom pozitivnom iskustvu, u Nemačkoj je 1983. godine započeo trogodišnji program peroralne vakcinacije lisica, nakon koga je imunitet steklo oko 75% lisica, a besnilo eliminisano. Tokom 1986. godine preduzeta je koordinisana akcija vakcinacije lisica u Luksemburgu, Belgiji i Francuskoj, takođe sa veikim uspehom (Cvetnić, 1989).

Krajem osamdesetih godina program vakcinacije lisica su sprovele i Italija, Austrija, Slovenija kao deo SFRJ, kao i mnoge druge evropske zemlje. Devedesetih je vakcinacija sa velikim uspehom započeta i u SAD i Kanadi, a potom i u zemljama u našem okruženju – Mađarskoj, Hrvatskoj, Bugarskoj i Rumuniji. U jesen 2010. godine započeta je peroralna vakcinacija lisica i u Srbiji.

Pored vakcinacije, u programu kontrole je bitan i monitoring njene uspešnosti. U okviru ovog monitoringa vrši se ispitivanje prisustva antitela protiv virusa besnila u krvnom serumu ispitivanih životinja (lisica), prisustva biomarkera (najčešće tetraciklina) u kostima i zubima životinje, i prisustvo samog virusa besnila u centralnom nervnom sistemu. Podaci koji se dobiju u okviru monitoringa od velike su važnosti u proceni uspešnosti vakcinacije, kao i u menadžmentu kontrole besnila.

Poslednjih decenija, sa saznanjem da su bitni rezervoari besnila, aktuelizovana je kontrola bolesti i kod slepih miševa. Sedamdesetih godina prošlog veka utvrđeno je da je slepi miš *Desmodus rotundus* osetljiv na antikoagulans difenadion. Nakon injekcije jedne doze od 1mg/kg telesne mase kravi, njena krv je u naredna tri dana letalna za slepe miševе, bez ikakvog štetnog dejstva po kravu. Slično dejstvo je pokazao i varfarin, a oba antikolagulansa se mogu kombinovati sa vakcinom protiv besnila. Difenadion se može primeniti i tako što se njime premažu leđa nekoliko slepih miševa iz kolonije, koji se potom vrata u pećinu i u kontaktu sa ostalim jedinkama mehanički im ga prenesu. Uspešnost ovih metoda je proverena u mnogim istraživanjima u Latinskoj Americi, a na ovaj način je broj ujeda slepih miševa u ugroženim stadima smanjen i do 85% (Arellano-Sota, 1988; Cvetnić, 1989).

Pitanje kontrole besnila kod slepih miševa insektivora, naročito *Eptesicus fuscus* i *Lasionycteris noctivagans* koji predstavljaju glavne izvore besnila za ljude, još uvek je otvoreno, i narednih godina njihova vakcinacija predstavljaće veliki izazov za istraživače u ovoj oblasti (Johnston i Tinline, 2002).

### 3. Cilj i zadaci

Cilj istraživanja je utvrđivanje korelacije patomorfoloških promena u mozgu lisica inficiranih divljim sojem virusa besnila i distribucije virusnog antigena po pojedinim regijama mozga. Istovremeno, utvrdiće se i njihova korelacija sa prisustvom pojedinih citokina (interleukin 1  $\beta$ , tumor nekrotični faktor  $\alpha$ ), i uloga navedenih citokina u patogenezi bolesti.

Postavljeni cilj realizovan je kroz sledeće zadatke:

1. Pregled mozгова lisica metodom direktne imunofluorescencije i RT-PCR
2. Uzorkovanje moždanog tkiva lisica kod kojih je ustanovljeno prisustvo virusnog antigena za patohistološko ispitivanje (fiksiranje, obrada, kalupljenje, sečenje)
3. Mikroskopska ispitivanja histoloških isečaka obojenih hematoksilin-eozin metodom (HE)
4. Imunohistohemijsko ispitivanje prisustva virusnog antigena po pojedinim delovima mozga upotrebom LSAB+ metode
5. Imunohistohemijsko ispitivanje ekspresije citokina po pojedinim delovima mozga upotrebom LSAB2 metode
6. Morfometrijska analiza i statistička obrada podataka



## 4. Materijal i metode

### 4.1. Materijal

Ispitivanje je izvršeno na uzorcima mozgova deset lisica (*Vulpes vulpes*) oba pola, koje su uginule ili su odstreljene pod sumnjom na besnilo. Kao negativna kontrola korišćeni su mozgovi šest odstreljenih lisica, oba pola, kod kojih metodama direktne imunofluorescencije i RT-PCR nije ustanovljeno prisustvo virusa besnila.

### 4.2. Direktna imunofluorescencija (tehnika fluorescentnih antitela) DFA

Nakon uzorkovanja mozga, pojedine regije – hipokampus, kora velikog mozga, mali mozak i produžena moždina, bile su ispitane na prisustvo antigena virusa besnila metodom direktne imunofluorescencije. Otisak preparati su fiksirani u hladnom acetonu, a nakon nanošenja specifičnih antitela inkubirani su 30 minuta u vlažnoj komori na 37°C. Korišćena su komercijalna poliklonska antitela proizvođača Biorad, France (kat. br. 357-2112) i miks monoklonskih antitela proizvođača Sifin, Deutschland (kat. br. FLI-B 555). Oba antitela su konjugovana fluorescein-izotiocijanatom (FITC). Nakon inkubacije, preparati su ispirani 3 puta po 5 minuta u PBS-u, demineralizovanoj vodi, osušeni na vazduhu i posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom Zeiss Axio Observer A1.

### **4.3. Lančana reakcija polimeraze RT-PCR**

#### **4.3.1. Ekstrakcija RNK**

Ekstrakcija RNK je vršena na sledeći način: uzorci (hipokampus, veliki mozak, mali mozak i produžena moždina u količini od 1 g) su homogenizovani u tarioniku uz dodatak PBS u odnosu 1:5. Homogenizat je prenošen u 1,5 ml ependorf tubice u količini od 0,5 ml, a potom centrifugovan na 1000 obrtaja u vremenu od jednog minuta. Za ekstrakciju RNK korišćen je supernatant po uputstvu proizvođača kita za ekstrakciju MagVet DNA/RNA extraction kit (LSI, Francuska). Princip rada kita je zasnovan na korišćenju magnetnih čestica. Supernatant u količini od 0,2 ml je prenošen u tubicu sa 20 µl proteinaze K (koncentracije mg/ml) i 180 µl NM1 pufera za liziranje (LSI, Francuska) i inkubiran u vodenom kupatilu na 70 °C 30 minuta. Tubice su zatim kratko centrifugovane i njihov sadržaj je prenošen u prvi bazenčić plastičnog kertridža u kome se nalazi rastvor magnetnih čestica i pufera za vezivanje. Stalak sa kertridžima je zatim postavljan u uređaj za ekstrakciju nukleinskih kiselina Kingfisher mL, a sam proces rada uređaja prethodno je zadat od strane proizvođača uređaja za ekstrakciju. Ekstrahovana RNK konačne zapremine 80 µl je čuvana na temperaturi od -70 °C do početka ispitivanja.

#### **4.3.2. Izvođenje metode RT-PCR u jednom koraku (One Step)**

Lančana reakcija polimeraze izvođena je primenom komercijalnog kita SuperScript III Platinum Quantitative One-Step RT-PCR System (Invitrogen). Mešavina za izvođenje RT-PCR pripremana je u mikrotubama za svaki uzorak pojedinačno i bila je sledećeg sastava: 12,5 µl 2X Reaction Mix-a, 0,5 µl SuperScript™ III RT/Platinum® *Taq* Mix-a, 0,4 µl forward prajmera JW12, 0,4 µl reverse prajmera JW10, 6,2 µl vode, 5 µl ekstrahovane RNK. Ukupna zapremina mešavine iznosila je 25 µl. Prajmeri koji su korišćeni u ispitivanju su specifični za deo genoma (N gen) koji kodira nukleoprotein i opisani su u radu Heatona i saradnika (1997).

**Tabela 1.** Sekvence korišćenih prajmera

Prajmer	Sekvenca
JW12	ATGTAACACC(C/T)CTACAATTG
JW10	GTCATTAGAGTATGGTGTTC

Mikrotube sa uzorcima su zatim prenete u PCR uređaj Applied Biosystems 2720 u kojem je izvođena reakcija na temperaturnom režimu prikazanom u tabeli 2.

**Tabela 2.** Parametri PCR reakcije

	Reverzna transkripcija (RT)	Aktivacija AmpliTaq gold polimeraze	PCR		
			40 ciklusa		
			Denaturacija	Annealing	Extension
Temperatura (°C)	50	95	94	49	72
Vreme	30 min.	2 min.	30 sek.	30 sek.	1 min

Posle izvođenja lančane reakcije polimeraze vršena je horizontalna gel-elektroforeza ispitivanih uzoraka radi vizuelizacije dobijenih PCR produkata. Elektroforeza je vršena u komercijalnim, prethodno izlivenim kasetama sa 2% agaroznim gelom i već dodatim etidijum-bromidom, u trajanju od 26 minuta. Posle završetka izvođenja elektroforeze, kasetna sa gelom je prenetna u Gel Doc XR system (Bio-Rad) radi vizuelizacije pod UV svetlom. Dužina dobijenog proizvoda je poređena sa molekularnim markerom Fermentas O Gene Ruler 100-1000 baznih parova. Pojava trake veličine 581 baznih parova na agaroznom gelu je smatrano pozitivnim nalazom.

#### 4.4. Histološko i imunohistohemijsko ispitivanje

Za histološko i imunohistohemijsko ispitivanje uzorkovani su sledeći delovi mozga svake lisice: hipokampus, kora velikog mozga, mali mozak i produžena moždina.

Uzorci tkiva fiksirani su 48 sati u 10% puferizovanom neutralnom formalinu, nakon čega je vršena njihova obrada u automatskom tkivnom procesoru Leica TP 1020 (dehidracija kroz seriju alkohola, prosvetljavanje u ksilolu, impregnacija parafinom) i kalupljenje u parafinske blokove.

Tkivni isečci debljine 4-5  $\mu\text{m}$  bojeni su klasičnom hematoksilin-eozin metodom.

Od imunohistohemijskih metoda korišćena je trostepena streptavidin-biotin metoda (LSAB). U tkivnim isečcima je najpre izvršeno demaskiranje antigena, korišćenjem citratnog pufera (pH 6,0), koji je zagrevan u mikrotalasnoj pećnici na 560 W u trajanju od 21 minut. Endogena peroksidaza je blokirana u 0,3% rastvoru vodonik-peroksida u metanolu, na sobnoj temperaturi ( $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) u trajanju od 15 minuta. Sva ispiranja i razblaženja tokom reakcije rađena su u PBS-u (pH=7,2-7,4). Preinkubacija je vršena u 10% kozjem serumu u PBS-u u trajanju od 20 minuta na sobnoj temperaturi. Isečci su inkubirani sa primarnim antitelima odgovarajućeg razređenja i pod određenim uslovima inkubacije (tabela 3). Nakon inkubacije i ispiranja primarnog antitela isečci su tretirani odgovarajućim kitom za detekciju. Za detekciju su korišćeni kitovi *Dako LSAB+ System-HRP* (Dako, K0679) i *Dako Cytomation LSAB2 System-HRP* (Dako, K0675).

**Tabela 3.** Primarna antitela, preinkubacija, razređenje primarnog antitela, uslovi inkubacije primarnog antitela i kitovi za detekciju korišćeni u imunohistohemijskom ispitivanju

Antitelo	Proizvođač (serijski br.)	Preinkubacija	Razređenje	Inkubacija	Kit za detekciju
Rab-Ag	Chemikon/Millipore (5199I)	nije rađena	1:2000	60 minuta, sobna temp.	Dako, K0679
TNF- $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology (sc-52746)	kozji serum 1:10 (10%)	1:50	+4°C, preko noći	Dako, K0675
IL1- $\beta$	Santa Cruz Biotechnology (sc-7884)	kozji serum 1:1 (50%)	1:100	+4°C, preko noći	Dako, K0675

Antigen-antitelo kompleks koji je nastao u tkivu postao je vidljiv primenom diaminobenzidina (DAB+, Dako, K3468) u trajanju od 5 do 15 minuta. Na mestu pozitivne reakcije javlja se precipitat smeđe boje. Kontrastiranje isečaka izvršeno je u koncentrovanom hematoksilinu (*Mayer-ov* hematoksilin) u trajanju od 2 sekunde. Nakon bojenja isečci su montirani pomoću vodenog medijuma za montiranje *Glycergel* (Dako, C563).

Negativne kontrole tokom imunohistohemijskog ispitivanja predstavljali su isečci mozga koji nisu tretirani primarnim antitelom i isečci mozga kod kojeg metodama TFA i RT-PCR nije utvrđeno prisustvo virusa besnila.

#### **4.5. Semikvantitativna analiza**

Semikvantitativnom analizom obuhvaćena je distribucija virusnog antigena u četiri ispitivane regije mozga svake lisice - hipokampusu, kori velikog mozga u nivou *lobus parietalis*, malom mozgu i produženoj moždini. Intenzitet imunohistohemijske reakcije je bodovan na sledeći način: negativna (-); slabo pozitivna (+), kada je uočena jedna pozitivna ćelija po vidnom polju na velikom uvećanju; umereno pozitivna (++), kada je uočeno dve do pet pozitivnih ćelija po vidnom polju; i jako pozitivna (+++), kada je uočeno više od pet pozitivnih ćelija po vidnom polju na velikom uvećanju (400x). Ova analiza je zasnovana na sistemu korišćenom od strane istraživača (Stein i sar., 2010) uz manje modifikacije.

#### **4.6. Morfometrijska analiza**

Morfometrijska analiza izvršena je korišćenjem svetlosnog mikroskopa Olympus BX51, kamere Olympus Color View III i morfometrijskog softvera Olympus Cell B. Utvrđen je broj neurona sa pozitivnim imunohistohemijskim signalom na antigen virusa besnila od ukupno pedeset nasumično izbrojanih neurona. Brojanje je vršeno na uvećanju od 400x, na nasumično izabranim vidnim poljima, za svaku od

pomenutih regija mozga. Dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički korišćenjem programa Microsoft Excel 2007.

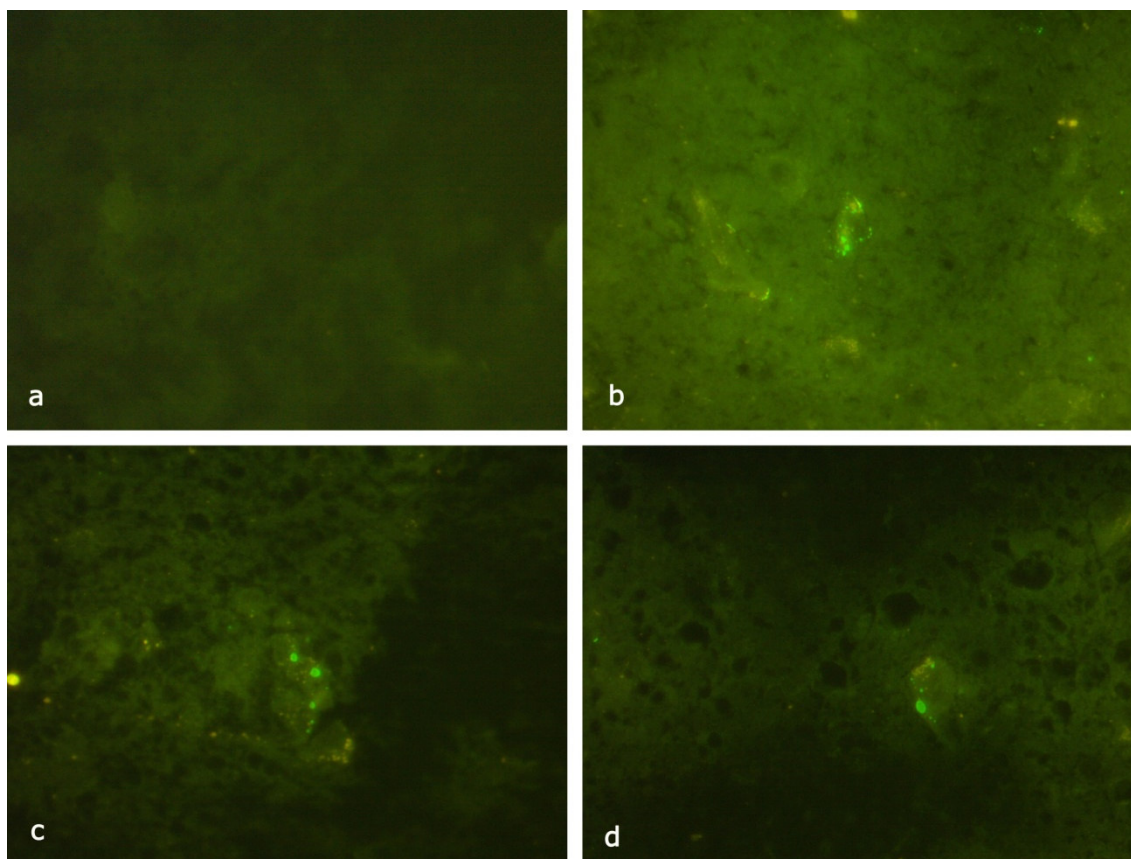
#### **4.7. Statistička analiza podataka**

Pri opisivanju dobijenih rezultata upotrebljeni su deskriptivni statistički pokazatelji (aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška aritmetičke sredine, interval varijacija i interkvartilna razlika). Statistička analiza dobijenih podataka podrazumevala je proveru normalnosti analiziranih distribucija jer se radilo o numeričkim podacima koji su dobijeni prebrojavanjem u određenom, zatom intervalu (0-50). Testiranje na normalnost izvedeno je pomoću Kolmogorov-Smirnov (*Kolmogorov-Smirnov*) testa i nije ustanovljena signifikantna razlika odstupanja od normalnog rasporeda ( $p > 0,05$ ). Na osnovu takvog rezultata za dalja testiranja značajnosti razlika između ispitivanih grupa primenjeni su parametrijski testovi ANOVA, kao grupni test, i Tukey test kao pojedinačni. Signifikantnost razlika ustanovljena je na nivou sigurnosti od 0,99. Pri statističkoj analizi korišćen je statistički paket PASW Statistics 18.

## 5. Rezultati

### 5.1. Direktna imunofluorescencija

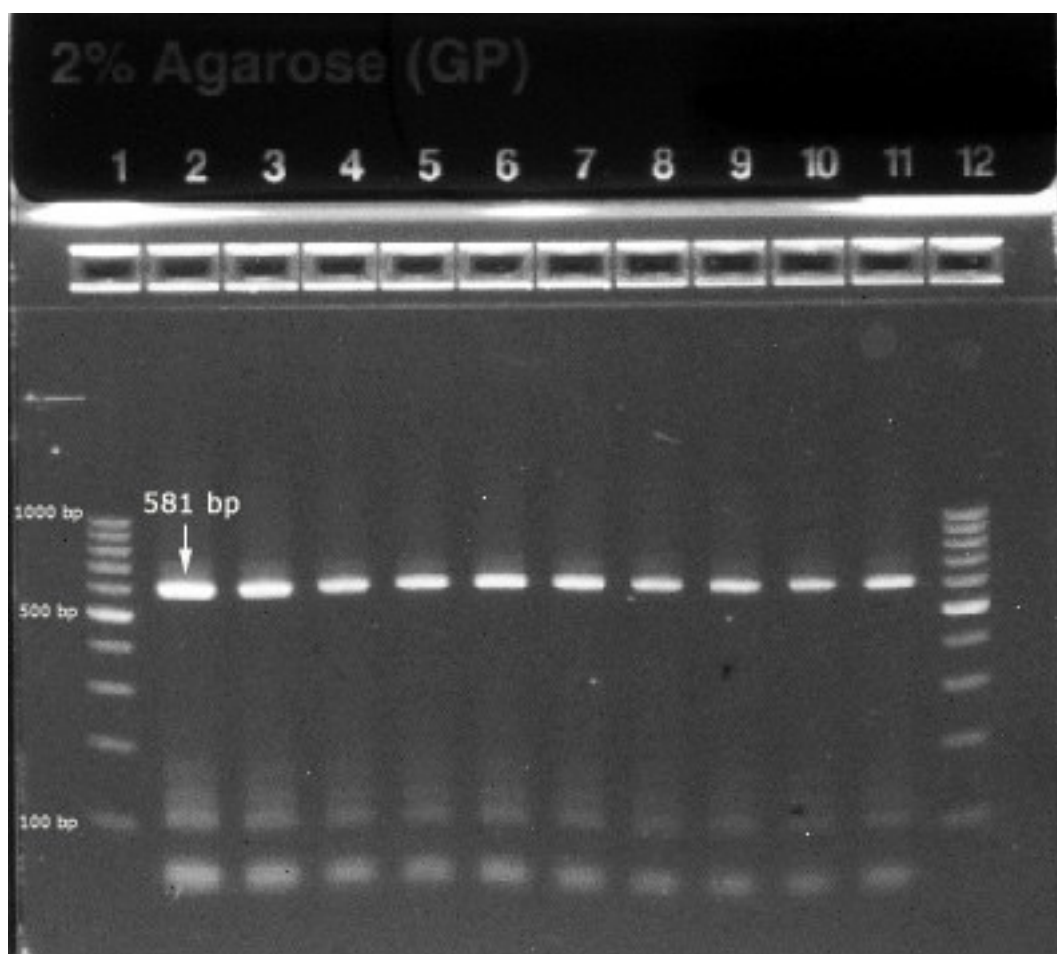
Metodom direktne imunofluorescencije, kod svih deset ispitivanih uzoraka utvrđeno je prisustvo antigena virusa besnila. U otisak preparatima uočene su okrugle inkluzije različitih veličina, koje fluoresciraju sjajno zeleno (slika 1). Oko pojedinih inkluzija bili su prisutni fluorescentni prstenovi koji podsećaju na oreole. Okolno tkivo bilo je mutno tamnozeleno boje.



**Slika 1.** Direktna imunofluorescencija 100x. Negativni kontrolni uzorak (a). Pozitivni signal u neuronima (b, c i d).

## 5.2. Lančana reakcija polimeraze RT-PCR

Kod svih deset ispitivanih uzoraka metodom RT-PCR utvrđeno je prisustvo genoma virusa besnila. U agaroznom gelu je kod svih uzoraka uočena traka veličine 581 baznih parova, što je prikazano na slici 2.



**Slika 2.** Vizuelizacija RT-PCR proizvoda elektroforezom.

U kolonama 1 i 12 nalazi se molekularni marker Gene Ruler 100-1000 baznih parova. U kolonama 2 do 11 nalaze se RT-PCR proizvodi ispitivanih uzoraka.



### 5.3. Patohistološki nalaz

Patohistološkim pregledom kod svih lisica utvrđene su promene u tipu akutnog negnojnog encefalitisa. Njihov intenzitet je bio od veoma blagog do jasno izraženog, u zavisnosti od životinje i u manjoj meri od regije mozga.

U svim ispitivanim regijama mozga utvrđena je proliferacija mikroglija ćelija, koje su bile raspoređene difuzno (difuzna gliozna) (slika 3a) ili fokalno (slike 3b i 4b), u vidu nakupina glija ćelija koje formiraju čvoriće (takozvani Babesovi čvorići). Uočeno je i umnožavanje perineuronske oligodendroglije – satelitoza (slike 3c, 4a i 4d), i neuronofagija – fagocitoza oštećenih neurona od strane aktiviranih mikroglija ćelija (slika 3c).

U piramidalnim neuronima kore velikog mozga i hipokampusu, a naročito u velikim neuronima jedara produžene moždine zapažene su distrofične promene u vidu bubrenja, kariolize, kariopiknoze i liziranja Nislove supstance (slika 4e). Zapažen je i edem sive i bele supstance (slika 4a). Kod dve životinje u neuronima malog mozga i produžene moždine uočeno je nakupljanje lipofuscina.

Oko krvnih sudova zapažene su nakupine limfocita i makrofaga (perivaskularni infiltrati), debljine jednog do nekoliko slojeva (slike 3d i 4c). Kod par životinja zapažena je i proliferacija endotelnih ćelija krvnih sudova – endotelioza (slika 3e).

Negrijeva telašca, ovalne, jasno ograničene, intracitoplazmatske eozinofilne inkluzije sa nešto svetlijim unutrašnjim telašcima, nađena su kod tri lisice, i to u piramidalnim neuronima kore velikog mozga i hipokampusu (slika 3f).

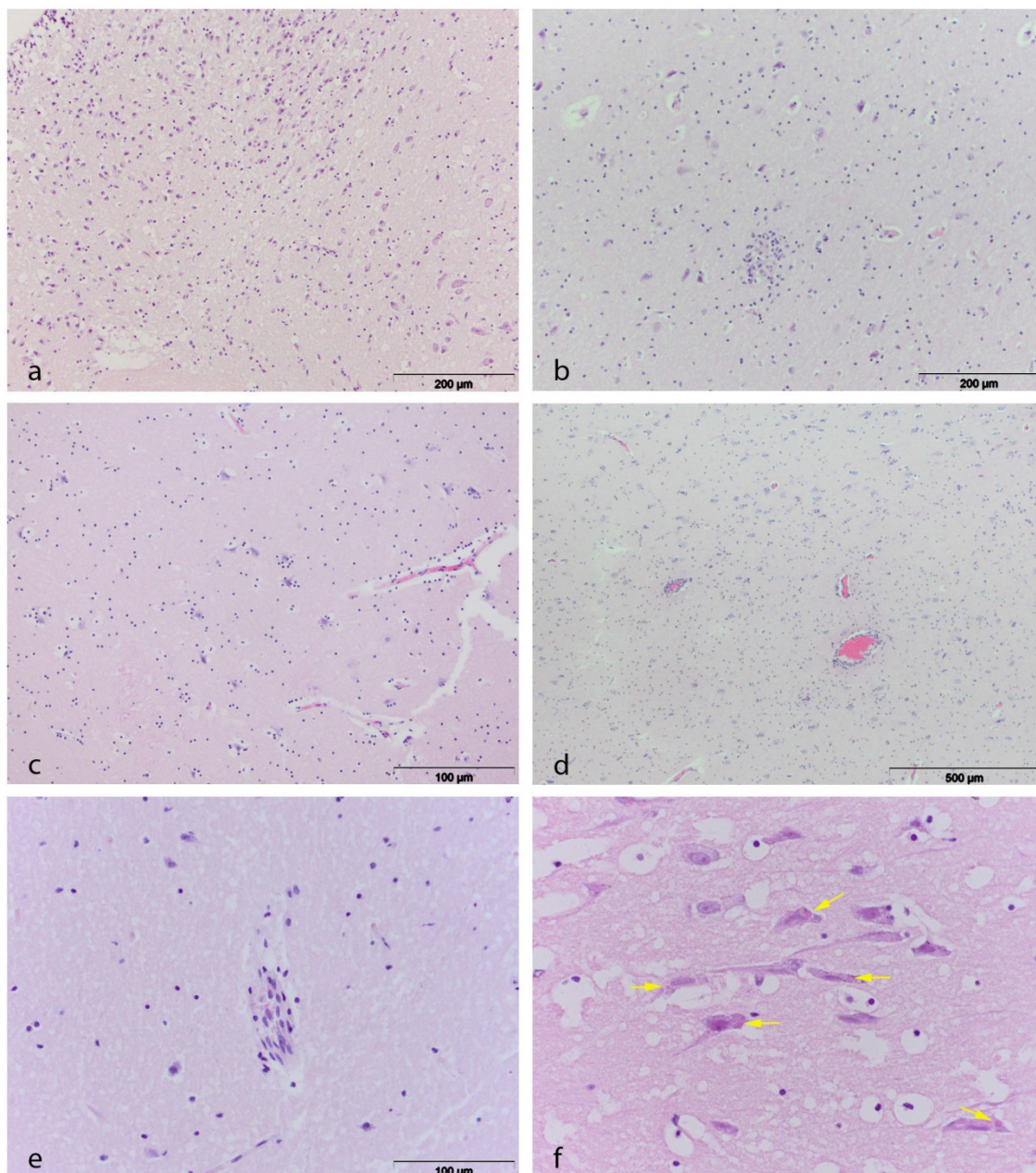
Kod dve lisice je zapažen sero-limfocitni leptomeningitis (slika 4f). U infiltratima su, kao i u perivaskularnim infiltratima parenhima, preovladavali limfociti i makrofagi, uz manji broj plazma ćelija.

Kao sporadičan nalaz zapažena su krvavljenja u kori velikog mozga, hipokampusu i malom mozgu.

Učestalost najznačajnijih patomorfoloških promena po pojedinim regijama mozga prikazana je u tabeli 4.

**Tabela 4.** Najznačajnije patomorfološke promene po regijama mozga

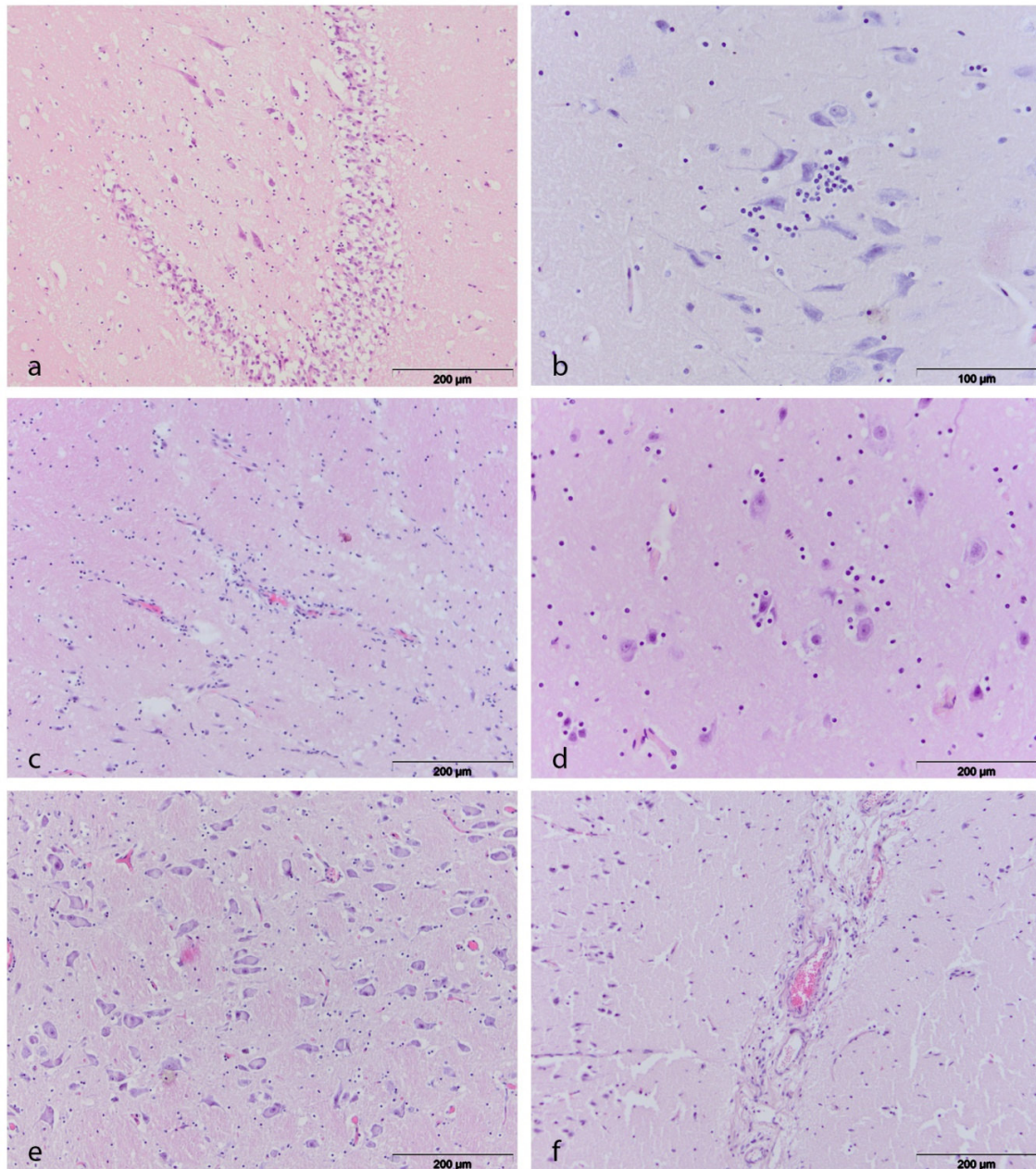
regija promena	kora vel. mozga	hipokampus	mali mozak	prod. moždina
<b>difuzna gliozna</b>	9	9	8	9
<b>fokalna gliozna</b>	6	1	3	6
<b>satelitoza</b>	5	6	3	2
<b>neuronofagija</b>	5	2	2	1
<b>endotelioza</b>	2	-	-	2
<b>perivask. infiltrati</b>	5	-	3	2
<b>edem</b>	2	1	2	4
<b>distrofične prom.</b>	2	2	1	2
<b>Negrijeva telašca</b>	2	2	-	-



**Slika 3.** Patohistološki nalaz u velikom mozgu lisica inficiranih virusom besnila, HE

Difuzna gliozna (a). Fokalna gliozna (b). Satelitoza i neuronofagija (c). Perivaskularni infiltrat (d). Umnožavanje endotela krvnog suda (e). Negrijeva tela u citoplazmi neurona (f).





**Slika 4.** Patohistološki nalaz u mozgu lisica inficiranih virusom besnila, HE

Hipokampus, edem i satelitoza (a). Hipokampus, fokalna glijoza (b). Produžena moždina, perivaskularni infiltrat (c). Produžena moždina, satelitoza (d). Produžena moždina, distrofija neurona (e). Sero-limfocitni leptomeningitis (f).

## 5.4. Imunohistohemijski nalaz

### 5.4.1. Antigen virusa besnila

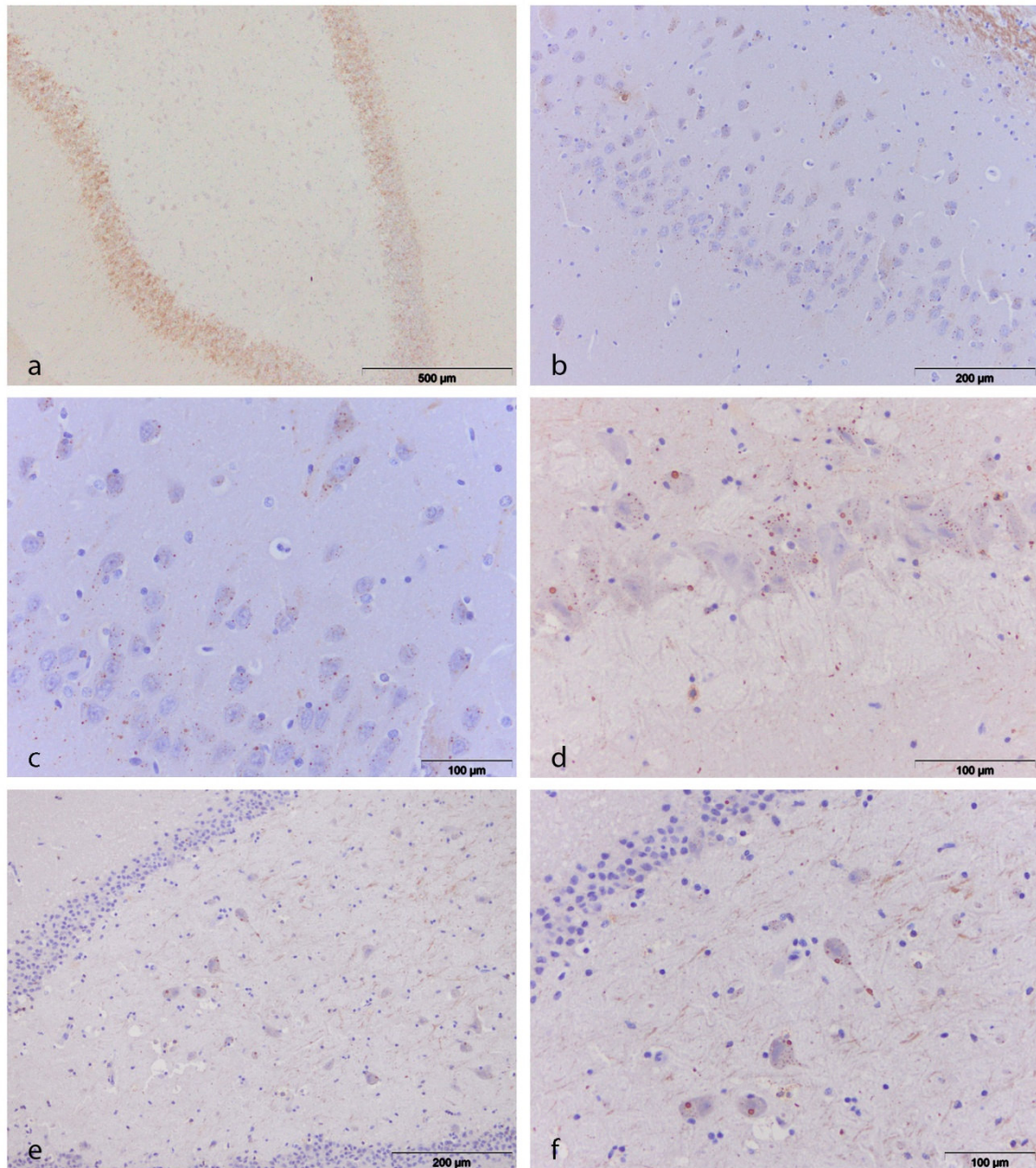
Antigen virusa besnila je imunohistohemijski dokazan u svim ispitivanim uzorcima. Pozitivan signal u vidu pojedinačnih i difuznih zrnastih ili ovalnih homogenih struktura smeđe boje zapažen je u perikarionu neurona, kao i u njihovim aksonskim i dendritskim produžecima (slike 5, 6, 7 i 8).

Utvrđena je veoma široka distribucija virusnog antigena, koji je, u manjoj ili većoj meri, dokazan u svim delovima mozga ispitivanih lisica.

Intenzitet imunohistohemijske reakcije na antigen virusa besnila po pojedinim regijama mozga ispitivanih lisica prikazan je u tabeli 5.

**Tabela 5.** Intenzitet imunoreaktivnosti na virusni antigen po regijama mozga

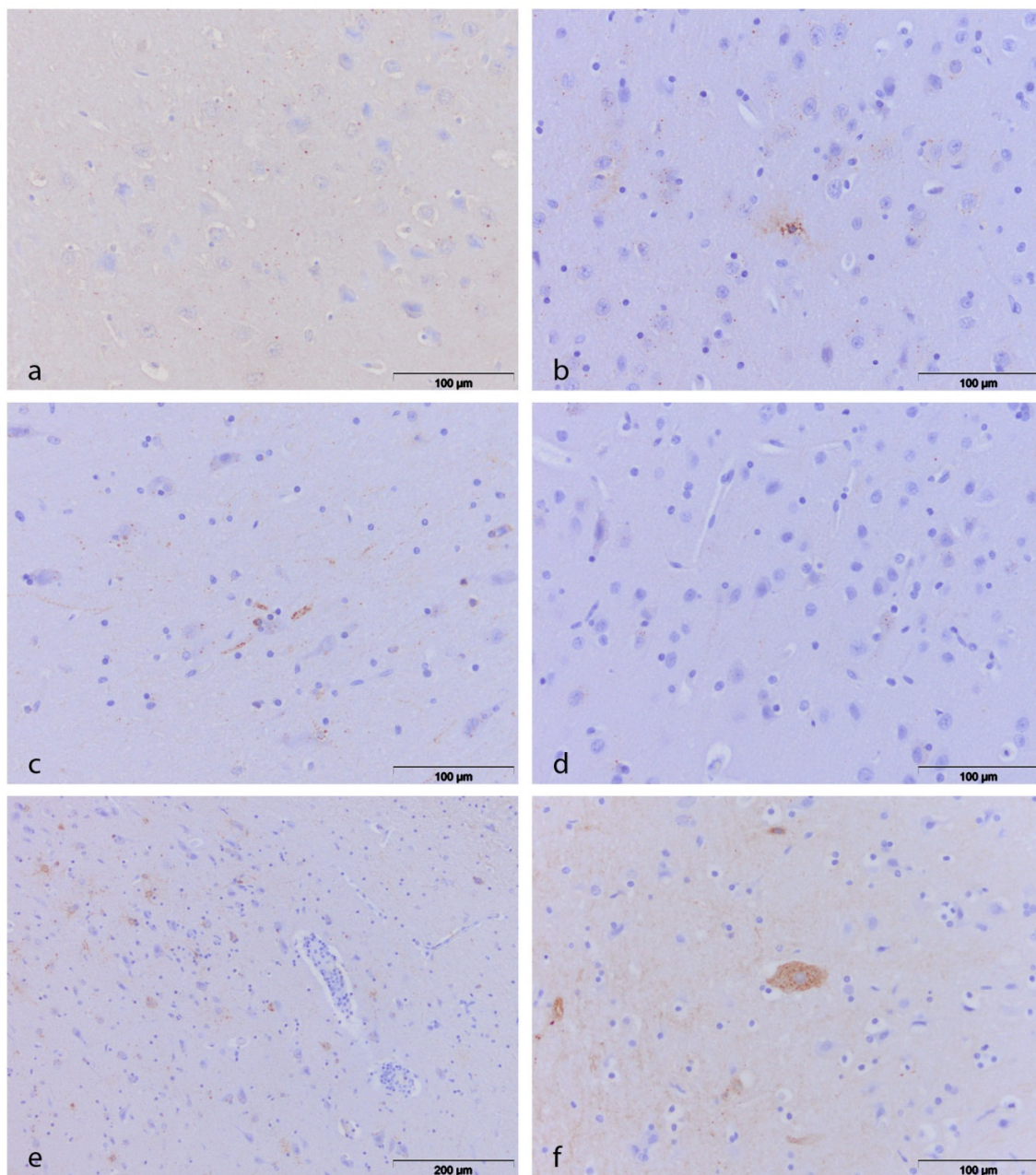
r. br.	hipokampus	kora vel. mozga	mali mozak	produžena moždina
1	+++	++	++	++
2	++	++	+	+++
3	+++	++	+++	++
4	+++	++	+++	+++
5	++	++	+	++
6	+++	++	+	+++
7	+	+	+	+
8	++	++	+	+
9	+++	++	++	++
10	++	+	+	++



**Slika 5.** Imunohistohemijski nalaz u hipokampusu lisica inficiranih virusom besnila

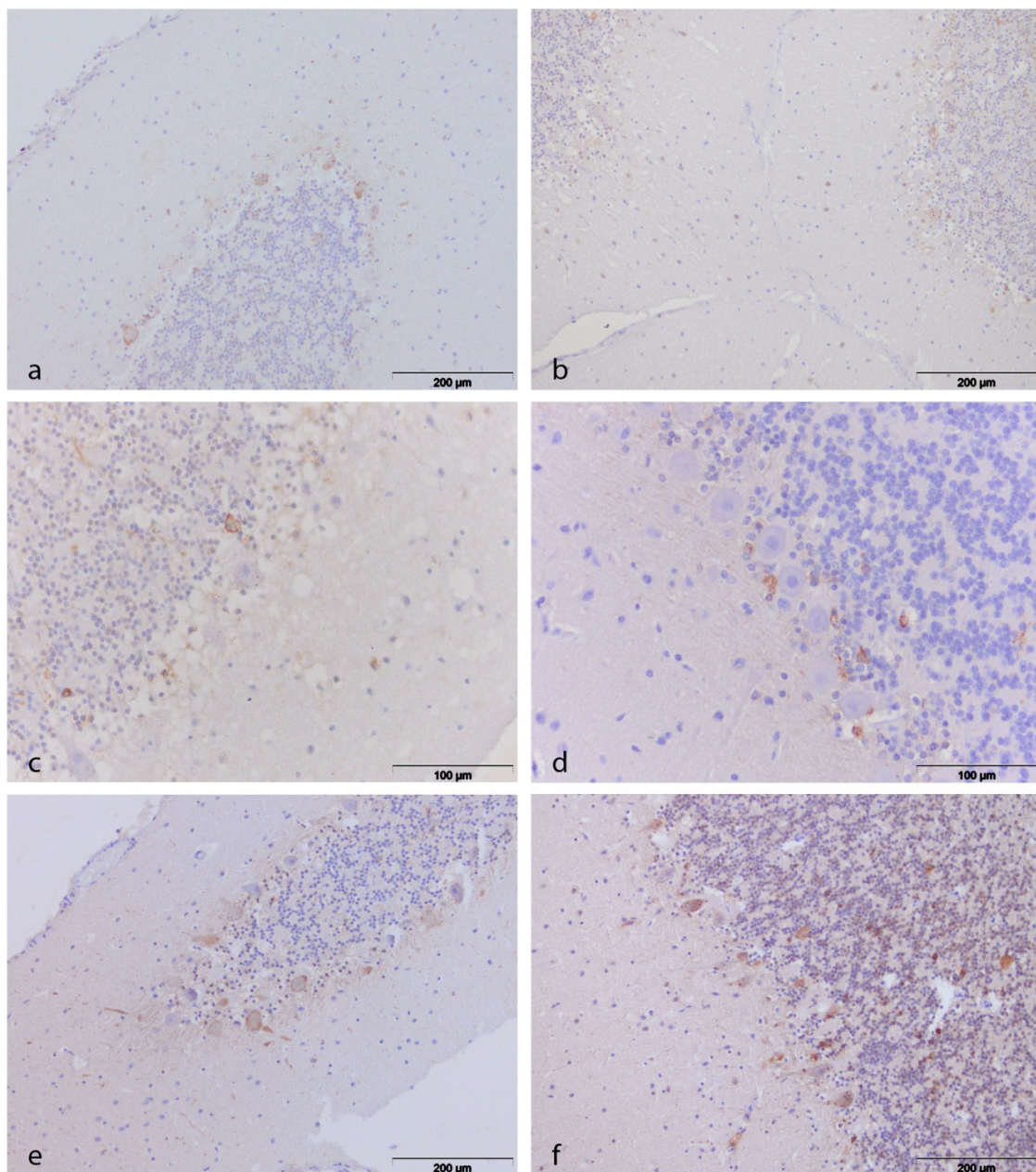
Vizuelizacija virusnog antigena, LSAB+ (a-f). Intenzitet reakcije: ++ (e, f); +++ (a, b, c, d).





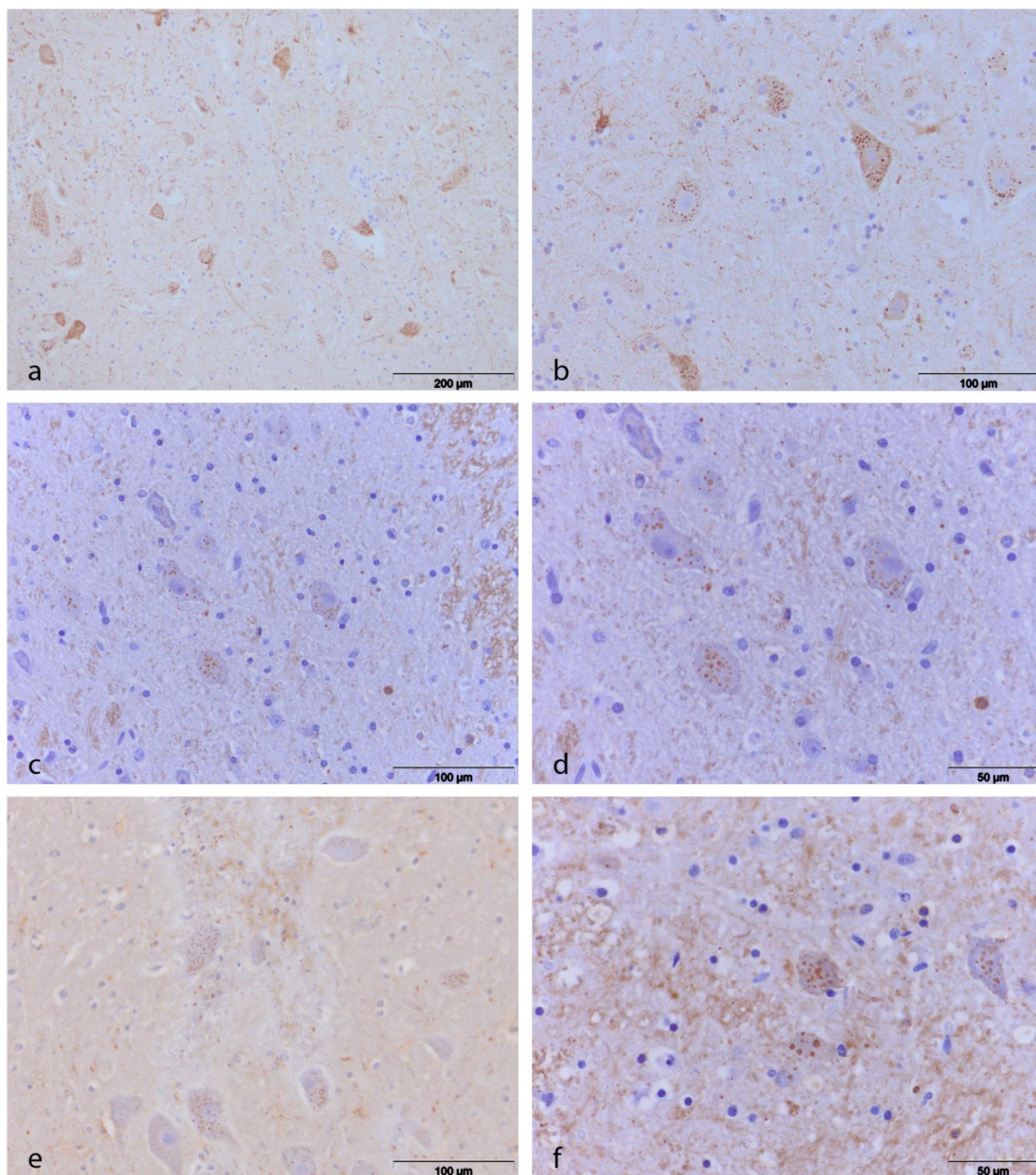
**Slika 6.** Imunohistohemijski nalaz u kori velikog mozga lisica inficiranih virusom besnila

Vizuelizacija virusnog antigena, LSAB+ (a-f). Intenzitet reakcije: + (e, f); ++ (a, b, c, d).



**Slika 7.** Imunohistohemijski nalaz u malom mozgu lisica inficiranih virusom besnila  
Vizuelizacija virusnog antigena, LSAB+ (a-f). Intenzitet reakcije: + (b, c); ++ (a, d, e);  
+++ (f).





**Slika 8.** Imunohistohemijski nalaz u produženoj moždini lisica inficiranih virusom besnila

Vizuelizacija virusnog antigena, LSAB+ (a-f). Intenzitet reakcije: ++ (c, e, f); +++ (a, b, d).

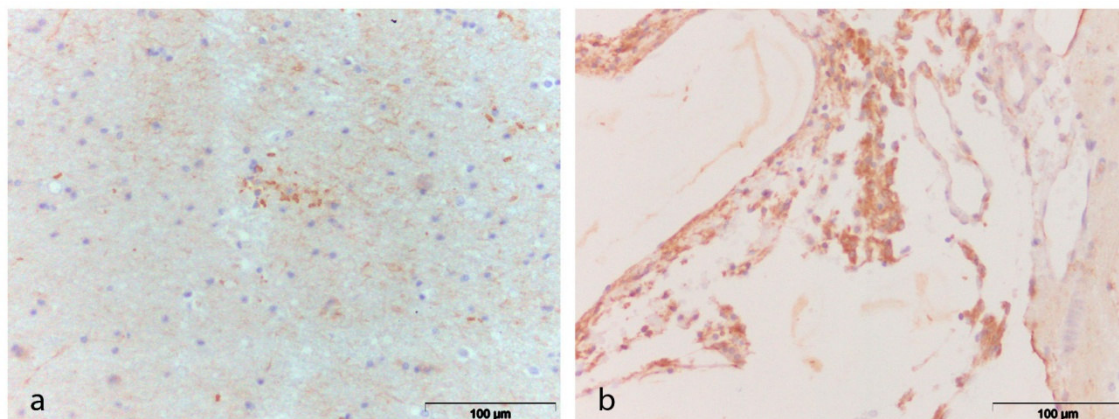
### 5.4.2. Citokini (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ )

Uzorci kod kojih su patohistološkim ispitivanjem ustanovljene izražene zapaljenske promene ispitani su na prisustvo proinflamatornih citokina.

IL1- $\beta$  i TNF- $\alpha$  su imunohistohemijski dokazani u zonama zapaljenskih promena. Pozitivni signal je uočen u mikroglija ćelijama, makrofagima i limfocitima perivaskularnih nakupina i meke moždanice (slike 9 i 10).

Intenzitet ekspresije je varirao, u zavisnosti od stepena izraženosti zapaljenskih promena. U zonama sa izraženim zapaljenskim promenama ekspresija proinflamatornih citokina je bila znatno intenzivnija nego u zonama sa blagim zapaljenskim promenama. Uočena je direktna pozitivna korelacija između intenziteta ekspresije citokina i stepena zapaljenskih promena.

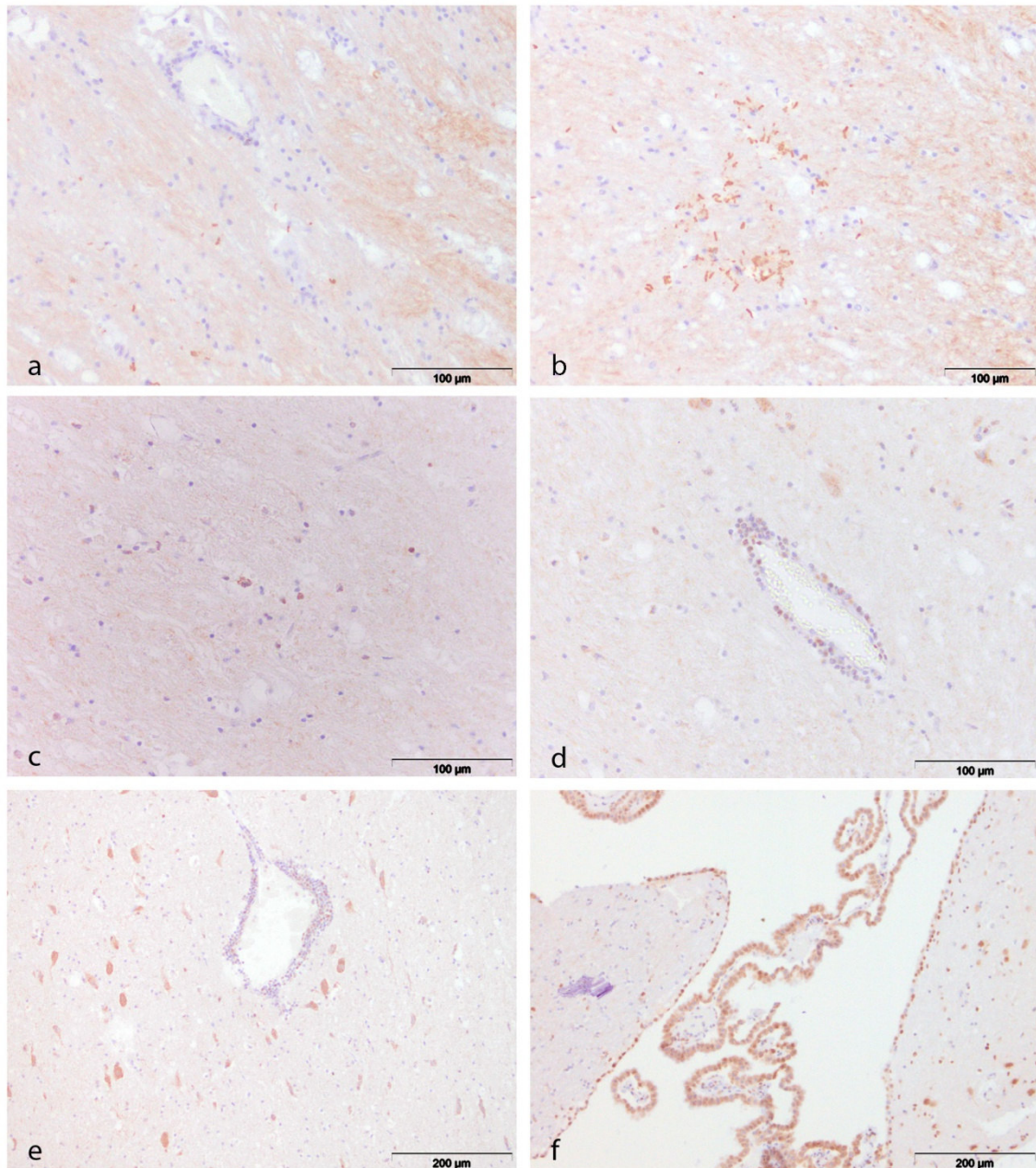
U ispitivanim uzorcima nije uočena korelacija između distribucije antigena virusa besnila i proinflamatornih citokina.



**Slika 9.** Imunohistohemijski nalaz u mozgu lisica inficiranih virusom besnila

Ekspresija IL1- $\beta$ , LSAB2. Kora velikog mozga, glija ćelije (a). Moždane ovojnice, makrofage (b).





**Slika 10.** Imunohistohemijski nalaz u mozgu lisica inficiranih virusom besnila

Ekspresija IL1- $\beta$ , LSAB2. Glija ćelije i perivaskularni infiltrat (a). Glija ćelije (b).  
 Ekspresija TNF- $\alpha$ , LSAB2. Makrofage i glija ćelije (c). Perivaskularni infiltrat (d,e).  
 Glija ćelije i epitelne ćelije *plexus chorioideusa* i ependima (f).

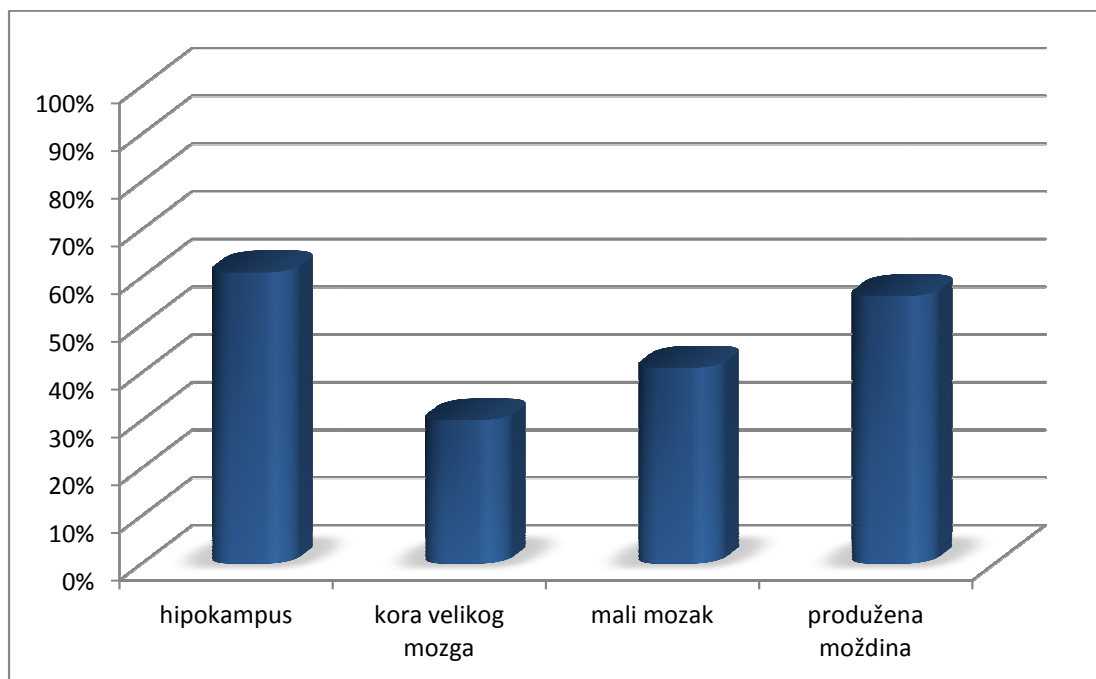
## 5.5. Morfometrijska analiza

Procenat pozitivnih neurona po pojedinim regijama mozga kod svake ispitane životinje prikazan je u tabeli 6.

**Tabela 6.** Procenat pozitivnih neurona po regijama mozga ispitivanih životinja

<b>%</b>	<b>hipokampus</b>	<b>kora velikog mozga</b>	<b>mali mozak</b>	<b>produžena moždina</b>
<b>1</b>	70	38	56	66
<b>2</b>	54	22	34	62
<b>3</b>	76	40	52	68
<b>4</b>	84	40	70	82
<b>5</b>	68	36	42	54
<b>6</b>	74	38	42	76
<b>7</b>	22	12	14	16
<b>8</b>	44	16	18	22
<b>9</b>	70	34	54	56
<b>10</b>	48	20	32	54

Prosečan broj neurona pozitivnih na prisustvo antigena virusa besnila po pojedinim regijama mozga ispitivanih životinja prikazan je u grafikonu 1.



**Grafikon 1.** Prosečan broj pozitivnih neurona po regijama mozga

Testiranjem na normalnost pomoću Kolmogorov-Smirnov (*Kolmogorov-Smirnov*) testa nije ustanovljena signifikantna razlika odstupanja od normalnog rasporeda ( $p > 0,05$ ) (tabela 7).

Testiranje značajnosti razlika između ispitivanih grupa pomoću ANOVA i Tukey testa prikazano je u tabeli 8.

**Tabela 7.** Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Statistic	df	Sig.
hipokampus	,246	10	,089
kora velikog mozga	,257	10	,059
mali mozak	,128	10	,200
produžena moždina	,238	10	,116

**Tabela 8.** Rezultati ANOVA i Tukey testa

Table Analyzed Data 1

One-way analysis of variance

**P value** 0,0012  
P value summary \*\*  
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes  
Number of groups 4  
F 6,581

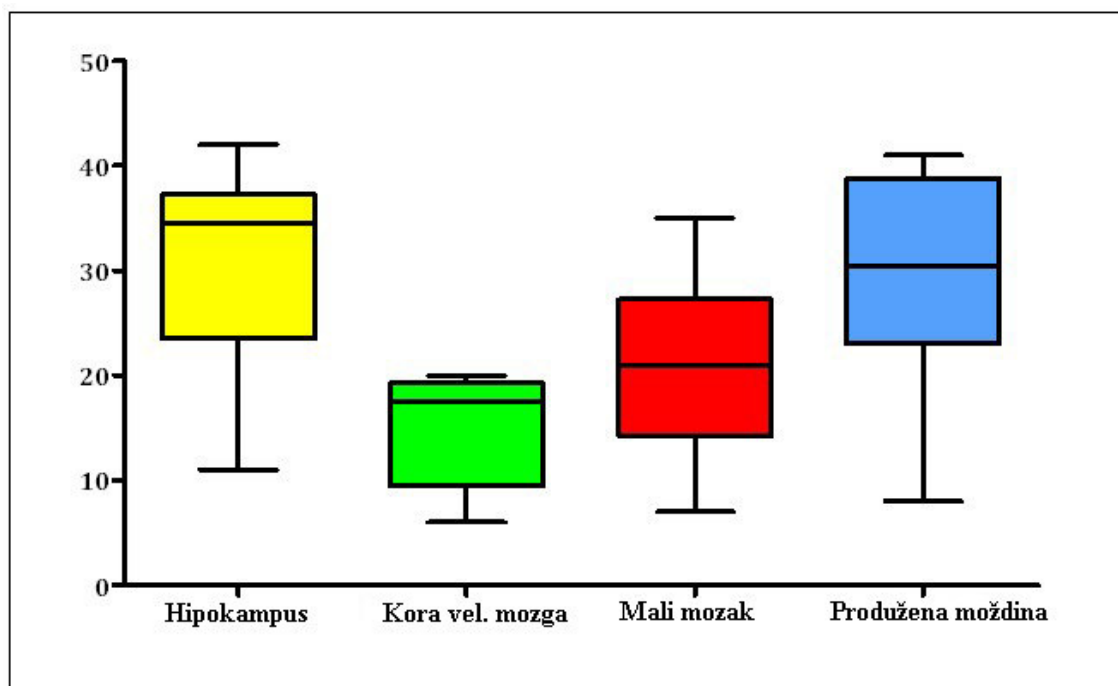
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	1605	3	534,9
Residual (within columns)	2926	36	81,27
Total	4530	39	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
<b>Hipokampus vs Kora vel. mozga</b>	<b>15,70</b>	<b>5,507</b>	<b>Yes</b>	<b>**</b>
Hipokampus vs Mali mozak	9,800	3,438	No	ns
Hipokampus vs Produž. moždina	1,700	0,5963	No	ns
Kora vel. mozga vs Mali mozak	-5,900	2,070	No	ns
<b>Kora vel. mozga vs Produž. moždina</b>	<b>-14,00</b>	<b>4,911</b>	<b>Yes</b>	<b>**</b>
Mali mozak vs Produž. moždina	-8,100	2,841	No	ns

**Tabela 9.** Deskriptivni statistički parametri

	n	$\bar{X}$	SD	Se	CV %	Min.	Max.
<b>Hipokampus</b>	10	30,50 <sup>a</sup>	9,37	2,9640	30,73	11,00	42,00
<b>Kora velikog mozga</b>	10	14,80 <sup>ab</sup>	5,43	1,7180	36,71	6,00	20,00
<b>Mali mozak</b>	10	20,70	8,73	2,7610	42,18	7,00	35,00
<b>Produžena moždina</b>	10	28,80 <sup>b</sup>	11,47	3,6260	39,82	8,00	41,00

*\*Istim slovima je opisana signifikantna razlika:  $p < 0,05$  a, b*



**Grafikon 2.** Grafički prikaz deskriptivnih statističkih parametara

Analizirajući deskriptivne statističke parametre broja neurona u kojima je utvrđeno prisustvo virusnog antigena (tabela 9, grafikon 2), ustanovljeno je da je statistički signifikantno ( $p < 0,01$ ) najmanji broj pozitivnih ćelija bio u kori velikog mozga ( $14,80 \pm 5,43$ ) u odnosu na broj pozitivnih ćelija u hipokampusu ( $30,50 \pm 9,37$ ) i produženoj moždini ( $28,80 \pm 11,47$ ). Dobijeni statistički pokazatelji ukazuju na povećan varijabilitet ispitivanih delova mozga, koji se kretao od 30,73% kod hipokampusa do 42,18% kod malog mozga.



## 6. Diskusija

Iako je čovečanstvu poznato hiljadama godina, besnilo i dalje predstavlja realnu pretnju po zdravlje ljudi i životinja. I pored velikih napora i ogromnih sredstava potrošenih za njeno suzbijanje, ova bolest je još uvek prisutna na svim naseljenim kontinentima, a godišnje u svetu, mahom u Aziji i Africi, odnese između 55000 i 75000 ljudskih života (Jackson, 2009; Jackson, 2011).

Crvena ili riđa lisica (*Vulpes vulpes*) je idealan rezervoar virusa besnila, prvenstveno zbog veoma visoke prijemčivosti vrste, visokog stepena ekskrecije virusa i odsustva postinfektivnog imunskog odgovora (Blancou, 1988). Pored toga, i njena ubikvitarnost, sposobnost prilagođavanja, plodnost, način ishrane i etologija doprinose održavanju i prenošenju virusa besnila u prirodi. Od tridesetih godina prošloga veka lisice predstavljaju glavni rezervoar besnila u Evropi. Osamdesetih godina započete su prve planske kampanje peroralne vakcinacije lisica protiv besnila, koje su imale velikog efekta u kontroli bolesti. Kontinuiranim sprovođenjem peroralne vakcinacije u većini evropskih zemalja, a od 2010. godine i u Srbiji, broj slučajeva besnila kod lisica je značajno opao. Samim tim, značaj lisice kao rezervoara bolesti je smanjen, a pažnja je u većoj meri usmerena na rakunopsa i na različite vrste slepih miševa (Niezgoda i sar., 2002; Holmala i Kauhala, 2006)

Pregledom moždanog tkiva lisica koje su ispitivane u ovom radu, metodama direktne imunofluorescencije i RT-PCR, utvrđen je pozitivan rezultat kod svih deset uzoraka. Metoda direktne imunofluorescencije predstavlja standardnu metodu za dijagnostiku besnila koja se već više od pola veka upotrebljava širom sveta. Ukoliko su uzorci sveži, metoda ima veoma visoku osetljivost i specifičnost (OIE, 2012). Uz to,

ona je relativno brza, jeftina i nije previše tehnički zahtevna, te se stoga najčešće upotrebljava u svakodnevnoj dijagnostici (Malovrh i Hostnik, 2005). Sa druge strane, direktna imunofluorescencija je prilično subjektivna metoda i zahteva iskusnog dijagnostičara, precizno uzorkovanje i brz transport uzorka do laboratorije, jer joj senzitivnost značajno opada kod uzoraka sa različitim stepenom autolize (Whitfield i sar., 2001).

RT-PCR metoda još uvek nije zvanično preporučena za rutinsku *post-mortem* dijagnostiku besnila (OIE, 2012). Međutim, ona je brza, veoma senzitivna i često se upotrebljava kao potvrdna metoda. Za razliku od direktne imunofluorescencije, može se primeniti na autoliziranom moždanom tkivu, kao i na uzorcima koji sadrže veoma malu količinu virusa (Malovrh i Hostnik, 2005; Fooks i sar., 2011). Primenjiva je i u *antemortem* dijagnostici, mahom u humanoj medicini, gde se kao uzorci mogu koristiti koža, saliva i cerebrospinalna tečnost.

U našem ispitivanju prisustvo genoma virusa besnila je nakon direktne imunofluorescencije dokazano i RT-PCR metodom kod svih deset ispitivanih uzoraka. Ova metoda se pokazala vrlo upotrebljivom i pouzdanom, ali treba imati u vidu da se radi o slučajevima prirodno inficiranih životinja u čijem se moždanom tkivu nalazi relativno velika količina virusa. Sem toga, uzorci su bili relativno sveži, tako da se prave prednosti ove metode (dijagnostika besnila u uslovima lošeg kvaliteta uzorka i male količine virusa) nisu mogle potpuno sagledati.

Razvojem molekularnih tehnika ustanovljeni su protokoli koji omogućavaju brzu, efikasnu i veoma preciznu dijagnostiku besnila metodom RT-PCR, što potvrđuju mnogobrojna komparativna istraživanja na različitim uzorcima poreklom od ljudi i životinja (Heaton i sar., 1997; Biswal i sar., 2007; Panning i sar., 2010; Biswal i sar., 2012; Deubelbeiss i sar., 2014). Ipak, lažno negativni rezultati su potencijalno veći problem kod molekularnih tehnika, jer je kod lisavirusa homologija veća na nivou aminokiselinskih nego nukleotidnih sekvenci, a novi izolati virusa će pre imati ista antigenska mesta kao poznati izolati nego iste nukleotidne sekvence (Bourhy i sar., 1993; Trimarchi i Smith, 2002).

Patohistološke promene su kod svih deset ispitivanih lisica bile u tipu akutnog negnojnog encefalitisa, u većini slučajeva blagog do umerenog intenziteta. Kod svih životinja utvrđena je difuzna mikrogljoza. Ova promena je bila prisutna u svim ispitivanim regijama mozga, pa se može reći da je bila dominantna. Literaturni podaci govore da difuzno umnožavanje mikroglije često dominira patohistološkom slikom besnila kod prirodno inficiranih životinja (Zachary, 2007; Jovanović, 2012), što je u skladu sa našim nalazom.

Čest nalaz bio je i prisustvo takozvanih Babesovih čvorića, fokalnih nakupina nabujalih mikroglija ćelija. Kod 60% slučajeva (6 životinja) utvrđeno je njihovo prisustvo u kori velikog mozga i produženoj moždini, dok ih je u hipokampusu i malom mozgu bilo znatno manje. Nekada je njihovo prisustvo u moždanom stablu i kičmenoj moždini smatrano patognomoničnim za besnilo, ali ove promene su česte i kod drugih virusnih encefalitisa, pa i kod toksičnih stanja, kao što su uremija ili hronično trovanje arsenom (Ercegovac, 1987; Iwasaki i Tobita, 2002; Maxie i Youssef, 2007).

Neuronofagija je kod pet slučajeva ustanovljena u kori velikog mozga, dok je u ostalim regijama bila nešto ređa. U fagocitozi oštećenih neurona učestvuju aktivirane ramifikovane mikroglija ćelije, tako da je i ova promena očekivana u regijama gde je izražena proliferacija mikroglije.

Mikroglija ćelije centralnog nervnog sistema vode poreklo od cirkulišućih monocita koji su naselili CNS tokom ranog postnatalnog perioda. Ove ćelije prve reaguju na oštećenje centralnog nervnog sistema, a jačina reakcije je u korelaciji sa stepenom oštećenja (Jovanović, 2012). Nakon oštećenja nervnih ćelija, one se aktiviraju – proliferišu difuzno ili fokalno, učestvuju u neuronofagiji, sintezi hemokina, citokina i drugih medijatora inflamacije, a služe i kao antigen prezentujuće ćelije.

Satelitoza je takođe bila česta promena, prisutna u svim ispitivanim regijama mozga. Ona zapravo predstavlja proliferaciju perineuronske satelitske oligodendroglije, što je takođe reakcija na oštećenje nervnih ćelija. Međutim, uloga oligodendroglije u neuronskom oštećenju, odnosno zapaljenskom procesu nije potpuno poznata.

Perivaskularni infiltrati, nakupine inflamatornih ćelija debljine jednog do nekoliko slojeva, zapaženi su najčešće oko krvnih sudova kore velikog mozga. U

infiltratima su dominirali limfociti i makrofagi, uz manji broj plazma ćelija. Iwasaki i saradnici (1993) su ispitivanjem fenotipskih karakteristika inflamatornih ćelija u perivaskularnim prostorima utvrdili da 50-70% mononuklearnih ćelija u perivaskularnim prostorima čine CD3 T-limfociti, u velikom broju su utvrđeni CD4 T-limfociti, nešto manje ima CD68 makrofaga, dok su CD20 B-limfociti utvrđeni u zanemarljivom procentu.

Sero-limfocitni leptomeningitis je zabeležen kod dve životinje. Ovakve promene su kod životinja inficiranih virusom besnila uglavnom retke i blage, a infiltrat se sastoji od limfocita i makrofaga, u veoma retkim slučajevima i od polimorfonuklearnih ćelija (Ercegovac, 1987).

Negrijeva tela predstavljaju eozinofilne intracitoplazmatske inkluzije čije se prisustvo u nervnim ćelijama smatra patognomoničnim za besnilo. U ovom istraživanju ona su utvrđena kod tri ispitivane životinje (30 %), i to u piramidalnim neuronima kore velikog mozga i hipokampusu. Ćelije u kojima su se nalazila Negrijeva tela su bile naizgled potpuno normalne, bez ikakvih morfoloških promena. Sem toga, u njihovoj neposrednoj okolini nije bilo znakova ćelijskog oštećenja niti zapaljenskog procesa.

Prema literaturnim podacima, Negrijeva tela se ređe nalaze u regionima gde su zapaljenske promene izaženije. Dupont i Erl (1965) su, proučavajući 49 slučajeva besnila kod ljudi, utvrdili da su zapaljenske promene najčešće u produženoj moždini i ponsu. Negrijeva tela su u 59,5 % slučajeva nađena u malom mozgu, 42,9 % u hipokampusu, i svega u 14,3 % slučajeva u produženoj moždini. U regijama sa Negrijevima telima zapaljenske promene su bile neupadljive (Iwasaki i Tobita, 2007).

Kod infekcije uličnim sojevima virusa, Negrijeva tela se mogu naći kod 40 – 70 % besnih životinja, dok ih kod infekcija fiksiranim sojem virusa nema (Iwasaki i Tobita, 2002; Maxie i Youssef, 2007; Zachary, 2007). Prema pisanjima nekih autora, učestalost njihovog pojavljivanja zavisi od načina infekcije, virulencije i količine virusa, kao i od vrste i starosti inficirane životinje (Cvetnić, 1989). U našem ispitivanju procenat životinja kod kojih su Negrijeva tela utvrđena je nešto manji od navedenih (30%), ali treba imati u vidu da je ispitivanje izvršeno na malom broju uzoraka (10), što relativizuje poređenje ovog rezultata sa literaturnim.

Distribucija Negrijevih tela po regijama mozga se razlikuje od slučaja do slučaja. Ranije se smatralo da su najčešća u neuronima hipokampusa, a danas se zna da mogu biti prisutna u neuronima sive mase u svim moždanim regijama. Češće se mogu naći u velikim neuronima tkiva sa slabo izraženim zapaljenskim procesom, pre svega piramidalnim ćelijama Amonovog roga, i Purkinje ćelijama kore malog mozga. Neka ranija istraživanja govore da se kod karnivora sreću uglavnom u Amonovom rogu i velikom mozgu, a kod herbivora u Purkinje ćelijama malog mozga (Iwasaki i Tobita, 2007). Rezultati našeg ispitivanja idu u prilog ovim podacima.

Elektronskom mikroskopijom utvrđeno je da se Negrijeva telašca sastoje od virusnih čestica povezanih zrnastim matriksom, ali njihova uloga u patogenezi besnila još uvek nije potpuno utvrđena. Sem toga, postavlja se pitanje zašto ih nema kod infekcije fiksiranim sojevima virusa. Još 1967. godine Mijamoto i Macumoto su pretpostavili da fiksirani sojevi virusa besnila ne dozvoljavaju stvaranje Negrijevih tela zbog toga što izazivaju značajnu destrukciju neurona, za razliku od uličnih sojeva virusa koji izazivaju znatno manja oštećenja. Ipak, karakteristike inkluzija koje se vide kod imunofluorescencije se razlikuju od karakteristika Negrijevih tela u istim neuronima, što govori da su Negrijeva tela nešto više od jednostavne akumulacije virusnih nukleoproteina (Kristensson, 1996).

U neuronima hipokampusa i kore velikog mozga zapažene su i eozinofilne inkluzije koje ne sadrže male blede tačke, takozvana unutrašnja telašca, koja su karakteristična za Negrijeva tela. Ove inkluzije koje se obično nazivaju *lyssa* telašcima su u mozgu besnih životinja brojnija od Negrijevih telašaca, ali su nespecifična, i relativno često se sreću i kod drugih virusnih bolesti (Iwasaki i Tobita, 2002). Sem toga, homogene eozinofilne citoplazmatske inkluzije mogu se naći u velikim neuronima zdravih mačaka, tvorova, pasa, zatim kod starih ovaca i goveda (Nietfeld, 1989; Iwasaki i Tobita, 2002; Maxie i Youssef, 2007).

Noviji literaturni podaci, uzimajući u obzir sve navedeno, naglašavaju da Negrijeva tela predstavljaju najbitniji patohistološki nalaz kod besnila i imaju nesporni značaj u dijagnostici, ali da njihovu patognomoničnost svakako treba tumačiti sa dozom rezerve (Iwasaki i Tobita, 2002). Interesantan podatak je da su u studiji koja je bazirana na RT *in situ* PCR dijagnostici, na materijalu koji vodi poreklo od ljudi, Negrijeva tela

dokazana u manje od 1% neurona koji su inficirani virusom besnila (Nuovo i sar., 2005).

U svim ispitivanim regijama mozga ustanovljene su distrofične promene na neuronima, najčešće bubrenje, karioliza i kariopiknoza. Najizraženije su bile u produženoj moždini, što je u skladu sa literaturnim podacima, koji govore da se one mogu sresti u svim delovima mozga, ali su najbrojnije u moždanom stablu (Iwasaki i Tobita, 2002). Ove promene često kod karnivora mogu biti veoma izražene i u disproorciji sa inflamatornim promenama (Maxie i Youssef, 2007).

Interesantno je da su pojedini autori u mozgovima besnih životinja opisali spongiformne promene koje su veoma slične promenama kod TSE (Charlton, 1984; Foley i Zachari, 1995; Zachary, 2007). U našem ispitivanju ove promene nisu ustanovljene. Ispitivanjem kod eksperimentalno inficiranih lisica i tvorova, utvrđeno je da se vakuole primarno pojavljuju u neuropilu sive supstance, i to najčešće u regionu talamusa i kori velikog mozga. Ove vakuole se najčešće nalaze u dendritima, uvećavaju se, vrše pritisak na okolno tkivo i na kraju prskaju, pri čemu se formiraju karakteristične šupljine. Pomenutim ispitivanjem je utvrđeno da učestalost spongiformnih lezija ne zavisi od imunskog odgovora, načina inokulacije i pripremanja virusa, niti inkubacionog perioda (Charlton, 1987). One se ipak mogu razlikovati od spongiformnih lezija kod TSE, i to na osnovu perivaskularne infiltracije koja je prisutna kod besnila, distribuciji vakuola uglavnom u talamusu i kori velikog mozga, tendenciji formiranja nešto većih vakuola i kraćem inkubacionom periodu (Foley i Zachari, 1995).

Virusni antigen je imunohistohemijski dokazan kod svih deset ispitanih lisica, i to u svim ispitivanim delovima mozga. Protokol i poliklonsko antitelo koje je korišćeno dali su veoma dobre rezultate, čime su potvrđena pozitivna iskustva Stejna i saradnika (2010). Slična iskustva u dokazivanju antigena virusa besnila ovom metodom kod ljudi i životinja, korišćenjem različitih, uglavnom nekomercijalnih antitela, imali su i drugi autori (Jogai i sar., 2000; Arslan i sar., 2004; Suja i sar., 2009; Hicks i sar., 2009).

U odnosu na druge dijagnostičke metode, imunohistohemija u uzorcima fiksiranim formalinom ima nekoliko prednosti. Pre svega, virus besnila se veoma brzo inaktiviše u rastvoru formaldehida, što sam dijagnostički postupak čini bezbednim.

Transport i manipulacija uzorcima su takođe olakšani, naročito ako se radi o udaljenim laboratorijama. Ipak, treba imati u vidu da postoje određena ograničenja ove metode, u smislu da se tkivo ne može jako dugo čuvati u formalinu, jer to može otežati demaskiranje antigena. Nakon stavljanja u parafinske blokove uzorak praktično postaje trajan i može se koristiti dugi niz godina. Sa druge strane, ova metoda je tehnički zahtevnija od direktne imunofluorescencije, njeno izvođenje duže traje, a oprema i reagensi su znatno skuplji. Sem toga, izolacija virusa nije moguća iz uzorka tretiranog formalinom. Ipak, glavna prednost imunohistohemije je to što se pored virusnog antigena na preparatu može videti i struktura tkiva, odnosno patomorfološke promene, što ima veoma veliki značaj u diferencijalnoj dijagnostici i proučavanju patogeneze bolesti.

U našem ispitivanju najintenzivniji imunohistohemijski signal je zapažen u hipokampusu i produženoj moždini. Procenat nervnih ćelija sa pozitivnim signalom bio je najmanji u kori velikog mozga (parijetalni lobus) ali treba imati u vidu značajne razlike u ovom procentu kod pojedinačnih životinja.

Decenijama unazad, smatralo se da su hipokampus karnivora i mali mozak herbivora idealni uzorci za dokazivanje prisustva virusa besnila. Razlog za to je verovatno i taj što se u ovim regijama najčešće sreću Negrijeva tela, čiji je nalaz u jednom periodu predstavljao najbrži način utvrđivanja bolesti. Ispitivanjem koje je izvršeno na preko 800 uzoraka mozgova petnaestak vrsta životinja metodom direktne imunofluorescencije, utvrđeno je da su idealne regije za testiranje na besnilo moždano stablo, hipokampus i cerebelum, a ukoliko je dostupan ceo mozak, treba testirati sagitalne preseke moždanih hemisfera (Whitfield i sar., 2001).

Bingam i van der Merve (2002) su ispitivali distribuciju antigena virusa besnila metodom direktne imunofluorescencije na 225 pozitivnih uzoraka poreklom od različitih životinjskih vrsta. Regije kod kojih je u svakom uzorku dokazano prisustvo virusa bili su talamus, pons i produžena moždina, što praktično čini moždano stablo najpouzdanijom regijom za dokazivanje prisustva virusa besnila kod svih životinja. Pored toga, antigen je u moždanom stablu bio prisutan u najvećoj količini, što svakako olakšava postavljanje dijagnoze. Mali mozak, hipokampus i veliki mozak bili su negativni u 4,1 do 11,1 % uzoraka. U okviru velikog mozga, najbolji za ispitivanje je

temporalni režanj, dok je najviše negativnih uzoraka utvrđeno u potiljačnom reznju. Autori su naglasili da uprkos mnogim preporukama hipokampus, veliki mozak i mali mozak ne mogu biti regije izbora za ispitivanje besnila metodom direktne imunofluorescencije. Ovo neslaganje sa postojećim preporukama oni su objasnili time što se u hipokampusu i kori velikog mozga nekih vrsta životinja nalazi znatno veći broj srednjih i velikih čestica antigena, koje su mogle biti otkrivene tradicionalnim histološkim bojenjima (Bingham i van der Merwe, 2002).

Navedenim ispitivanjem je u uzorcima poreklom od divljih kanida u svim delovima mozga dokazana velika količina virusnog antigena. Izuzetak je jedan šakal, kod koga je antigen bio lokalizovan samo u moždanom stablu. Najveći broj velikih čestica antigena je ustanovljen u hipokampusu (Bingham i van der Merwe, 2002).

Stejn i saradnici (2010) su izvršili imunohistohemijsko ispitivanje mozгова 39 besnih životinja, 13 životinjskih vrsta, korišćenjem komercijalnog poliklonskog antitela koje je korišćeno i u našem ispitivanju. Kod domaćih karnivora najintenzivniji imunohistohemijski signal je bio u hipokampusu, potom u velikom mozgu, moždanom stablu i malom mozgu. Kod goveda je najintenzivniji signal bio u moždanom stablu, pa potom u malom mozgu, kod konja u cervikalnom delu kičmene moždine i moždanom stablu. Kod rakuna je signal bio jak u svim delovima mozga, ali je po intenzitetu prednjačio hipokampus. U mozgu dve sive lisice (*Urocyon cinereoargenteus*) i jedne riđe lisice (*Vulpes vulpes*) koje su bile podvrgnute ispitivanju, najjača imunoreaktivnost zabeležena je u moždanom stablu i kori velikog mozga. Treba naglasiti da u uzorku mozga riđe lisice hipokampus nije bio dostupan za ispitivanje (Stein i sar., 2010).

Široka distribucija virusnog antigena, koja je ustanovljena u našem ispitivanju, može se pre svega objasniti prijemčivošću lisice kao vrste, ali i prirodnom infekcijom divljim sojem virusa besnila. Sem toga, važno je napomenuti da je većina lisica nađena uginula, ili je odstreljena sa kliničkim simptomima bolesti, dakle kada je bolest već uzela maha i kada se može očekivati veća količina i šira distribucija virusa u centralnom nervnom sistemu. Nije ustanovljena direktna korelacija između distribucije virusnog antigena i ustanovljenih patomorfoloških promena.



Citokini su heterogena grupa polipeptida male molekulske mase za koje se zna da imaju ulogu u aktivaciji imunskog sistema, kao i u inicijaciji, širenju i supresiji inflamatornog odgovora u perifernim tkivima (Hopkins i Rothwell, 1995; Acarin i sar., 2000). Poslednjih decenija, pažnja je usmerena na njihov uticaj na centralni nervni sistem, gde su uključeni u razvoj i normalnu moždanu funkciju, ali i patofiziološke procese, poput mehaničkih trauma, ishemije, demijelinizacije i neurodegenerativnih bolesti. Iako precizna uloga citokina u ovim patološkim stanjima još uvek nije potpuno razjašnjena, smatra se da neki od njih, uključujući IL1- $\beta$  i TNF- $\alpha$ , imaju ključnu ulogu u oblikovanju odgovora glija ćelija i povećanju propustljivosti krvno-moždane barijere. Oni predstavljaju važne međućelijske glasnike koji su uključeni u odnos između neurona i glija ćelija, kao i u komunikaciju između aktiviranih astrocita i mikroglija ćelija (Acarin i sar., 2000). Pored toga, IL1- $\beta$  indukuje stvaranje drugih citokina i faktora rasta, utiče na krvotok i neuroendokrine odgovore (naročito osovinu hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda), kao i na procese remijelinizacije. Zajedno sa TNF- $\alpha$  direktno utiče i na degeneraciju nervnih ćelija, a njihova inhibicija štiti neurone od lezija koje nastaju tokom cerebralne ishemije (Choi i Friedman, 2009)

IL1- $\beta$  i TNF- $\alpha$  se u veoma malim količinama mogu dokazati i u mozgu zdravih životinja. Tokom oštećenja mozga, oni se sintetišu pre svega u mikroglija ćelijama, makrofagima i limfocitima. Pored ovih ćelija, sintetišu ih i astrociti, oligodendroglija, neke populacije neurona, cerebrovaskularne ćelije i ćelije imunskog sistema koje se nalaze u cirkulaciji i koje mogu da invadiraju mozak tokom zapaljenskog procesa (Hopkins i Rothwell, 1995; Merrill i Benvenieste, 1996; Rothwell i Luheshi, 2000; Nuovo i sar., 2005; Figiel, 2008).

Smatra se da izvor citokina u centralnom nervnom sistemu zavisi od tipa lezije, akutne ili hronične, i nije ograničen na jedan tip ćelija koje ih stvaraju. U akutnoj fazi glavnu ulogu u produkciji citokina u centralnom nervnom sistemu imaju mikroglija ćelije, dok u hroničnoj fazi tu ulogu preuzimaju astrociti (Marquette i sar., 1996; Acarin i sar., 2000; Rothwell i Luheshi, 2000).

Istraživanjem na pacovima koji su eksperimentalno inficirani virusom besnila (Marquette i sar., 1996), autori su korišćenjem peroksidaza-antiperoksidaza metode utvrdili IL1- $\beta$  i TNF- $\alpha$  imunoreaktivnost u ramifikovanim i ameboidnim mikroglija

ćelijama, kao i u infiltriranim makrofagima. U periodu trećeg do četvrtog dana nakon infekcije ekspresija citokina je utvrđena u infiltriranim makrofagima, do čije infiltracije dolazi zbog narušavanja krvno-moždane barijere, dok je ekspresija u mikrogliji utvrđena nešto kasnije, šestog dana nakon infekcije. Ovi citokini potom indukuju proliferaciju nove mikroglije i astrocita, koji sintetišu velike količine različitih citokina i uključeni su u regulaciju inflamatornog odgovora u mozgu.

Imunopozitivne ćelije su uglavnom bile lokalizovane u delovima mozga koji su inficirani virusom besnila i gde je zapažena izražena aktivacija mikroglije i astrocita. Ovi delovi mozga pripadaju ili su u vezi sa limbičkim sistemom (hipokampus, hipotalamus, amigdala, septum), koji je veoma bitan u patogenezi besnila (Marquette i sar., 1996).

Mehanizam aktivacije mikroglija ćelija nije potpuno objašnjen, ali se pretpostavlja da ih aktiviraju neuroni depolarizacijom ili modifikovanjem jonske ravnoteže. One potom sintetišu citokine, ali i druge potencijalno citotoksične faktore, poput vodonik-peroksida, azot-monoksida, ekscitatornih aminokiselina, koji mogu biti odgovorni za primarna oštećenja u mozgu kod infekcije virusom besnila (Marquette i sar., 1996).

Ispitivanjem na miševima eksperimentalno inficiranim virusom besnila, autori su utvrdili veoma bitnu ulogu TNF- $\alpha$  u zapaljenskom procesu u mozgu. Ustanovljeno je da miševi koji nemaju specifični p55KD receptor za TNF- $\alpha$  žive nekoliko dana duže i imaju manju infiltraciju zapaljenskih ćelija, u poređenju sa normalnim (Camelo i sar., 2000; Camelo i sar., 2001).

U istraživanju koje je izvršeno na mozgovima ljudi inficiranih virusom besnila (Solanki i sar., 2009), ekspresija IL1- $\beta$  i TNF- $\alpha$  je metodom imunohistohemije ustanovljena u mikroglija ćelijama, makrofagima i limfocitima. Daljom fenotipizacijom je utvrđeno da su u pitanju CD3 limfociti. Utvrđena je snažna pozitivna korelacija između zapaljenskih procesa i ekspresije citokina, dok korelacija između distribucije virusnog antigena i ekspresije citokina nije postojala, što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja. Autori su utvrdili i izraženu pozitivnu korelaciju između ova dva

citokina, što ide u prilog pretpostavci da IL1- $\beta$  i TNF- $\alpha$  verovatno zajedno igraju bitnu ulogu u koordinaciji inflamatornog odgovora kod besnila (Solanki i sar., 2009).

IL1- $\beta$  i TNF- $\alpha$  nesumnjivo imaju važnu ulogu u oblikovanju inflamatornog odgovora u centralnom nervnom sistemu prilikom infekcije virusom besnila. Međutim, i danas postoje brojne nedoumice oko mehanizma njihovog delovanja u mozgu, uticaja na patogenezu besnila i koristi, odnosno štete koju stvaraju. Neka naredna istraživanja će dati odgovore i na eventualno lečenje encefalitisa izazvanog virusom besnila, ali i neurodegenerativnih bolesti, u čijem nastanku ovi citokini takođe imaju bitnu ulogu.

## 7. Zaključci

Na osnovu rezultata istraživanja u okviru ove disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

1. Prisustvo virusa besnila je uspešno dokazano u svim ispitivanim uzorcima metodama direktne imunofluorescencije, RT-PCR i imunohistohemijski.
2. Promene u tipu negojnog encefalitisa su ustanovljene kod svih ispitivanih životinja.
3. Ustanovljena je široka distribucija virusnog antigena, čije je imunohistohemijska vizuelizacija bila najintenzivnija u hipokampusu i produženoj moždini.
4. Nije ustanovljena zavisnost između patomorfoloških promena i distribucije virusnog antigena.
5. Ekspresija proinflamatornih citokina (interleukin  $1\beta$ , tumor nekrotični faktor  $\alpha$ ) ustanovljena je u zonama zapaljenja, i to u glija ćelijama, makrofagama i limfocitima.
6. Ustanovljena je pozitivna zavisnost između zapaljenskih promena i distribucije proinflamatornih citokina.

## 8. Spisak literature

1. Acarin L., Gonzales B., Castellano B., 2000, Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain, *European Journal of Neuroscience*, 12: 3505-3520.
2. Aloisi F., 2000, Regulation of T-cell responses by CNS-antigen presenting cells: Different roles for microglia and astrocytes, *Immunology Today*, 21: 141-147.
3. Arellano-Sota C., 1988, Biology, ecology and control of the vampire bat, *Reviews of Infectious Diseases*, 10 : S615-S619.
4. Arslan A., Saglam Y.S., Temur A., 2004, Detection of rabies viral antigens in non-autolysed and autolysed tissues by using an immunoperoxidase technique, *Veterinary Record*, 155: 550-552.
5. Baer G.M., 1988, Oral rabies vaccination: An overview, *Reviews of Infectious Diseases*, 10 : S644-S648.
6. Baer G.M., Shaddock J.H., Quirion R., Dam T.V., Lentz T.L., 1990, Rabies susceptibility and acetylcholine receptor (Letter), *Lancet*, 335: 664-665.
7. Baer G.M., 1991, Vampire bat and bovine paralytic rabies, In: *The Natural History of Rabies*, Baer G.A. (editor), CRC Press, Florida, 389-403.
8. Balachandran A., Charlton K., 1994, Experimental rabies infection of non-nervous tissues in skunks (*Mephitis mephitis*) and foxes (*Vulpes vulpes*), *Veterinary Pathology*, 31: 93-102.
9. Barik S., Rud E.W., Luk D., Banerjee A.K., Kang C.Y., 1990, Nucleotide sequence analysis of the L gene of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype): Identification of conserved domains in L proteins of nonsegmented negative-strand RNA viruses, *Virology* 175: 332-337.

10. Batista-da-Costa M., Bonito R.F., Nishioka S.A., 1993, An outbreak of vampire bat bite in a Brazilian village, *Tropical Medicine and Parasitology*, 44: 219-220.
11. Bechmann I., Mor G., Nilsen J., Eliza M., Nitsch R., Naftolin F., 1999, FasL is expressed in the normal rat and human brain: Evidence for the existence of an immunological brain barrier, *Glia*, 27: 62-74.
12. Bell J.F., Moore G.J., 1971, Susceptibility of carnivora to rabies virus administered orally, *American Journal of Epidemiology*, 93: 176-182.
13. Benmansour A., Leblois H., Coulon P., Tuffereau C., Gaudin Y., Flamand A., 1991, Antigenicity of rabies virus glycoprotein, *Journal of Virology*, 65: 4198-4203.
14. Beran G.W., 1991, Urban rabies, In: *The Natural History of Rabies*, Baer G.A. (editor), CRC Press, Florida, 427-443.
15. Bingham J., van der Merwe M., 2002, Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test, *Journal of Virological Methods*, 101: 85-94.
16. Biswal M., Ratho R.K., Mishra B., 2007, Usefulness of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of rabies RNA in archival samples, *Japanese Journal of Infected Diseases*, 60: 298-299.
17. Biswal M., Ratho R.K., Mishra B., 2012, Role of reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of human rabies, *Indian Journal of Medical Research*, 135 (6): 837-842.
18. Blancou J., 1988, Ecology and epidemiology of fox rabies, *Reviews of Infectious Diseases*, 10: 606-614.
19. Blancou J., Aubert M.F.A., Artois M., 1991, Fox rabies, In: *The Natural History of Rabies*, Baer G.A. (editor), CRC Press, Florida, 257-290.
20. Blancou J., Meslin F.X., 1996, Modified live-virus rabies vaccination for oral immunizations of carnivores. In: *Laboratory Techniques in Rabies*, Meslin F. X., Kaplan M. M., Koprowski H. (editors), fourth edition, WHO Geneva, 324-337.

21. Blancou J., 2004, Rabies in Europe and the Mediterranean basin: from antiquity to the 19<sup>th</sup> century, In: Historical perspective of rabies in Europe and the Mediterranean basin, King A.A., Fooks A.R., Aubert M., Wandeler A.I. (editors), OIE, Paris, France, 15-24.
22. Bogel K, 2002, Control of dog rabies, In: Rabies, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 429-443.
23. Bourhy H., Kissi B., Lafon M., Sacramento D., Tordo N., 1992, Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe, *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 2419-2426.
24. Bourhy H., Kissi B., Tordo N., 1993, Molecular diversity of the Lyssavirus genus, *Virology* 194: 70-81.
25. Bourhy H., Kissi B., Audry L., Smreczak M., Sadkowska-Todys M., Kulonen K., Tordo N., Zmudzinski J.F., Holmes E.C., 1999, Ecology and evolution of rabies virus in Europe, *Journal of General Virology*, 80: 2545-2557.
26. Briggs D.J., 2002, Public health management of humans at risk, In: Rabies, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 401-428.
27. Briggs D.J., Dreesen D.W., Wunner W.H., 2002, Vaccines, In: Rabies, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 371-400.
28. Bunn T.O., 1991, Canine and feline rabies vaccines, past and present, In: *The Natural History of Rabies*, Baer G.A. (editor), CRC Press, Florida, 415-425.
29. Burrage T.G., Tignor G.H., Smith A.L., 1985, Rabies virus binding at neuromuscular junctions, *Virus Research*, 2: 273-289.
30. Cadoz M., Strady A., Meignier B., Taylor J., Tartaglia J., Paoletti E., Plotkin S., 1992, Immunisation with canarypox virus expressing rabies glycoprotein, *Lancet*, 339: 1429-1432.
31. Camelo S., Lafage M., Lafon M., 2000, Absence of the p55 Kd TNF- $\alpha$  receptor promotes survival in rabies virus acute encephalitis, *Journal of NeuroVirology*, 6: 507-518.
32. Camelo S., Lafage M., Galelli A., Lafon M., 2001, Selective role for the p55 Kd TNF- $\alpha$  receptor in immune unresponsiveness induced by an acute viral encephalitis, *Journal of Neuroimmunology*, 113: 95-108.

33. Canter D.M., Jackson R.L., Perrault J., 1993, Faithful and efficient *in vitro* reconstitution of vesicular stomatitis virus transcription using plasmid-encoded L and P proteins, *Virology*, 194: 518-529.
34. Caraballo A.J., 1996, Outbreak of vampire bat biting in a Venezuelan village, *Revista de Saude Publica*, 30: 483-484.
35. Ceccaldi P.E., Gillet J.P., Tsiang H., ,1989, Inhibition of the transport of rabies virus in the central nervous system, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 48: 620-630.
36. Celis E., Ou D., Dietzschold B., Koprowski H., 1988, Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from human vaccine recipients, *journal of Virology*, 62: 3128-3134.
37. Charlton K.M., Casey G.A., 1979, Experimental rabies in skunks: Oral, nasal, tracheal and intestinal exposure, *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 43: 168-172.
38. Charlton K.M., Casey G.A., Campbell J.B., 1983, Experimental rabies in skunks: Mechanisms of infection of the salivary glands, *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47: 363-369.
39. Charlton K.M., 1984, Rabies: spongiform lesions in the brain, *Acta Neuropathologica*, 63: 198-202.
40. Charlton K.M., Casey G.A., Webster W.A., Bundza A., 1987, Experimental rabies in skunk and foxes: pathogenesis of the spongiform lesions, *Laboratory Investigation*, 57: 634-645.
41. Charlton K.M., Nadin-Davis S., Casey G.A., Wandeler A.I., 1997, The long incubation period in rabies: Delayed progression of infection in muscle at the site of exposure, *Acta Neuropathologica*, 94: 73-77.
42. Chenik M., Chebli K., Gaudin Y., Blondel D., 1994, *In vivo* interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N), existence of two N binding sites on P protein, *Journal of General Virology*, 75: 2889-2896.
43. Chenik M., Chebli K., Blondel D., 1995, Translation initiation at alternate in-frame AUG codons in the rabies virus phosphoprotein mRNA is mediated by a ribosomal leaky scanning mechanism, *Journal of Virology*, 69: 707-712.



44. Childs J.E., Trimarchi C.V., Krebs J.W., 1994, The epidemiology of bat rabies in New York State, 1988-1992, *Epidemiology and Infection*, 113: 501-511.
45. Childs J.E., 2002, Epidemiology, In: Rabies, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 114-162.
46. Choi S., Friedman W.J., 2009, Inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  regulate p75<sup>NTR</sup> expression in CNS neurons and astrocytes by distinct cell-type-specific signalling mechanisms, *ASN Neuro* 1 (2): 113-123.
47. Clark K.A., Neill S.U., Smith J.S., Wilson P.J., Whatford V.W., McKirahan G.W., 1994, Epizootic canine rabies transmitted by coyotes in south Texas, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204: 536-540.
48. Coleman P.G., Dye C., 1996, Immunization coverage required to prevent outbreaks of dog rabies, *Vaccine*, 14: 185-186.
49. Constantine D.G., 1962, Rabies transmission by nonbite route, *Public Health Reports*, 77: 287-289.
50. Constantine D.G., Emmons R.W., Woodie J.D., 1972, Rabies virus in nasal mucosa of naturally infected bats, *Science*, 175: 1255-1256.
51. Conzelmann K.K., Cox J.H., Schneider M., Thiel H.J., 1990, Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19, *Virology*, 175: 485-499.
52. Coulon P., Derbin C., Kucera P., Lafay F., Prehaud C., Flamand A, 1989, Invasion of the peripheral nervous systems of adult mice by CVS strain of rabies virus and its avirulent derivative Av01, *Journal of virology*, 63: 3550-3554.
53. Crandell R.A., 1991, Arctic fox rabies, In: *The Natural History of Rabies*, Baer G.A. (editor), CRC Press, Florida, 291-306.
54. Crepin P., Audry L., Rotivel Y., Gacoin A., Caroff C., Bourhy H., 1998, Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid, *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 1117-1121.
55. Cvetnić S., 1989, Bjesnoća, Jugoslavenska medicinska naklada, Zagreb.

56. Davies M.C., Englert M.E., Sharpless G.R., Cabbaso V.J., 1963, The electron microscopy of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues, *Virology* 21: 642-651.
57. Delpietro H.A., Russo R.G., 1996, Ecological and epidemiological aspects of attack by vampire bats in relation to paralytic rabies in Argentina, and an analysis of proposal for control, *Revue Scientifique et Technique OIE*, 15: 971-984.
58. Deubelbeiss A., Zahno M.L., Zanoni M., Bruegger D., Zanoni R., 2014, Real-time RT-PCR for the detection of lyssavirus species, *Journal of Veterinary Medicine*, ID 476091, 1-12.
59. Diaz A.M., Papo S., Rodriguez A., Smith J.S., 1994, Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin America and the Caribbean, *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 41: 153-160.
60. Dietzschold B., Wunner W.H., Wiktor T.J., Lopes A.D., Lafon M., Smith C.L., Koprowski H., 1983, Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus, *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 80: 70-74.
61. Dietzschold B., Lafon M., Wang H., Otvos L., Celis E., Wunner W.H., Koprowski H., 1987, Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins, *Virus Research*, 8: 103-125.
62. Dubielzig R.R., Hawkins K.L., Miller P.C., 1993, Mycoplastic sarcoma originating at the site of rabies vaccination in a cat, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5: 637-638.
63. Dutta J.K., Dutta T.K., Treatment of clinical rabies in man: Drug therapy and other measures, 1994, *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 32: 594-597.
64. Emmons R.W., Leonard L.L., DeGenaro F., Protas E.S., Bazeley P.L., Giammona S.T., Sturckow K., 1973, A case of human rabies with prolonged survival. *Intervirology*, 1: 60-72.
65. Ercegovac, 1987, Besnilo – patogeneza i profilaksa, RO Institut i zavodi za veterinarstvo, Beograd.

66. Ertl H.C.J., Dietzschold B., Gore M., Otvos L., Larson J.K., Wunner W.H., Koprowski H., 1989, Induction of rabies virus-specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein, *Journal of Virology*, 63: 2885-2892.
67. Ettessami R., Conzelmann K.K., Fadai-Ghotbi B., Natelson B., Tsiang H., Ceccaldi P.E., 2000, Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: An *in vitro* and *in vivo* study, *Journal of General Virology*, 81: 2147-2153.
68. Figiel I., 2008, Pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  as a neuroprotective agent in the brain, *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 68: 526-534.
69. Finnegan C.J., Brookes S.M., Johnson N., Smith J., Mansfield K.L., Keene V.L., McElhinney L.M., Fooks A.R., 2002, Rabies in North America and Europe, *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95: 9-13.
70. Fischman H.R., Schaeffer M., 1971, Pathogenesis of experimental rabies as revealed by immunofluorescence, *Annals of the New York Academy of Science*, 177: 78-97.
71. Fishbein D.B., Sawyer L.A., ReidSanden F.L., Weir E.H., 1988, Administration of human diploid-cell rabies vaccine in the gluteal area. *The New England Journal of Medicine*, 318: 124-125.
72. Flamand A., Raux H., Gaudin Y., Ruigrok R.W.H., 1993, Mechanisms of rabies virus neutralisation, *Virology*, 194: 302-313.
73. Flores-Crespo R., Arellano-Sota C., 1991, Biology and control of the vampire bat, In: *The Natural History of Rabies*, Baer G.A. (editor), CRC Press, Florida, 461-476.
74. Flugel A., Schwaiger F.W., Neumann H., 2000, Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T-lymphocytes, *Brain Pathology*, 10: 353-364.
75. Foley G.L., Zachary J.F., 1995, Rabies-induced spongiform change and encephalitis in a heifer, *Veterinary Pathology*, 32: 309-311.
76. Fooks A.R., Horton D., Johnson N., Banyard A., McElhinney L., Marston D., Wakeley P., Wright E., Hayman D., 2011, New diagnostic tools for rabies in animals, [www.oie.int](http://www.oie.int).

77. Gaudin Y., Ruigrok R.W.H., Tufferau C., Knossow M., Flamand A., 1992, Rabies virus glycoprotein is a trimer, *Virology* 187: 627-632.
78. Gaudin Y., Ruigrok R.W.H., Brunner J., 1995, Low-pH-induced conformational changes in viral fusion proteins: Implications for the fusion mechanisms, *Journal of General Virology*, 76: 1541-1556.
79. Gigant B., Iseni F., Gaudin Y., Knossow M., Blondel D., 2000, Neither phosphorylation nor the amino-terminal part of rabies virus phosphoprotein is required for its oligomerization, *Journal of General Virology*, 81: 1757-1761.
80. Gillet J.P., Derer P., Tsiang H., 1986, Axonal transport of rabies virus in the central nervous system of the rat, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 45: 619-634.
81. Gold R., Schmied M., Tontsch U., Hartung H.P., Wekerle H., Toyka K.V., Lassmann H., 1996, Antigen presentation by astrocytes primes rat T-lymphocytes for apoptotic cell death: A model for T-cell apoptosis *in vivo*. *Brain* 119: 651-659.
82. Goto H., Minamoto N., Ito h., Ito N., Sugiyama M., Kinjo T., Kawai A., 2000, Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus, *Journal of General Virology*, 81: 119-127.
83. Greene C.E., Dreesen D.W., 1998, Rabies, In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Greene C.E., (editor), second edition, W. B. Saunders, Philadelphia, 114-126.
84. Gupta A., Blondel D., Choudhary S., Banerjee A., 2000, Phosphoprotein (P) of rabies virus is phosphorylated by a unique cellular protein kinase and specific isomers of protein kinase C, *Journal of Virology*, 74: 91-98.
85. Hamir A.N., Moser G., Rupprecht C.E., 1992, Morphologic and immunoperoxidase study of neurologic lesions in naturally acquired rabies of racoons, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4: 369-373.
86. Hamir A.N., Moser Z.F., Fu F., Dietzschold B., Rupprecht C.E., 1995, Immunohistochemical test for rabies: Identification of a diagnostically superior monoclonal antibody, *Veterinary Record*, 136: 295-296.

87. Hamir A.N., Moser G., Rupprecht C.E., 1996, Clinicopathologic variation in racoons infected with different street rabies virus isolates, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, 8: 31-37.
88. Hatalski C.G. Hickey W.F., Lipkin W.I., 1998, Humoral immunity in the central nervous system following infection with Borna disease virus, *Journal of Neuroimmunology*, 90: 128-136.
89. Hatchett R.P., 1991, Rabies: The disease and the value of intensive care treatment. *Intensive and Critical Care Nursing*, 7: 53-60.
90. Heaton P.R., Johnstone P., McElhinney L.M., Cowley R., O'Sullivan E., Whitby J.E., 1997, Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses, *Journal of Clinical Microbiology*, 2763-2766.
91. Hemachudha, T., 1994, Human rabies: Clinical aspects, pathogenesis, and potential therapy, In: *Lyssaviruses*, Rupprecht C. E., Dietzschold B., Koprowski H. (editors), Springer- Verlag, Berlin, 121–144.
92. Hickey W.F., Hsu B.L., Kimura H., 1991, T-lymphocyte entry into the central nervous system, *Journal of Neuroscience Research*, 28: 254-260.
93. Hicks D.J., Nunez A., Healy D.M., Brookes S.M., Johnson N., Fooks A.R., 2009, Comparative pathological study of the murine brain after experimental infection with classical rabies virus and european bat lyssaviruses, *Journal of Comparative Pathology*, 140: 113-126.
94. Holland J.J., 1987, Defective interfering rhabdoviruses, In: *The Rhabdoviruses*, Wagner R.R. (editor), Plenum Press, New York, 297-360.
95. Holmala K., Kauhala K., 2006, Ecology of wildlife rabies in Europe, *Mammal Review*, 36: 17-36.
96. Hooper D.C., Ohnishi S.T., Kean R., Numagami Y., Dietzschold B., Koprowski H., 1995, Local nitric oxide production in viral and autoimmune diseases of the central nervous system, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 5312-5316.
97. Hopkins S.J., Rothwell N.J., 1995, Cytokines and the nervous system I: expression and recognition, *Trends in Neurosciences*, 18 (2): 83-88.

98. Hudson L.C., Weinstock D., Jordan T., Bold-Fletcher N.O., 1996a, Clinical features of experimentally induced rabies in cattle and sheep. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 43: 85-95.
99. Hudson L.C., Weinstock D., Jordan T., Bold-Fletcher N.O., 1996b, Clinical presentation of experimentally induced rabies in horses, *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 43: 277-285.
100. Hummeler K., Koprowski H, Wiktor T.J., 1967, Structure and development of rabies virus in tissue culture, *Journal of Virology*, 1: 152-170.
101. Irwin D.J., Wunner W.I., Ertl H., Jackson A.C., 1999, Basis of rabies virus neurovirulence in mice: Expression of major histocompatibility complex class I and class II mRNAs, *Journal of Neurovirology*, 5: 485-494.
102. Iseni F., Barge A., Baudin F., Blondel D., Ruigrok R.W.H., 1998, Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures, *Journal of General Virology*, 79: 2909-2919.
103. Iseni F., Baudin F., Blondel D., Danielle I., Ruigrok R.W.H., 2000, Structure of the RNA inside the vesicular stomatitis virus nucleocapsid, *RNA*, 6: 270-281.
104. Ito Y., Nishizono A., Mannen K., Hiramatsu K., Mifune K., 1996, Rabies virus M protein expressed in *Escherichia coli* and its regulatory role in virion-associated transcriptase activity, *Archives of Virology*, 141: 671-683.
105. Iwasaki Y., Sako K., Tsunoda I., Ohara Y., 1993, Phenotypes of mononuclear cell infiltrates in human central nervous system, *Acta Neuropathologica*, 85: 653-657.
106. Iwasaki Y., Tobita M., 2002, Pathology, In: Rabies, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 283-306.
107. Iwata M., Komori S., Unno T., Minamoto N., Ohashi H., 1999, Modification of membrane currents in mouse neuroblastoma cells following infection with rabies virus, *British Journal of Pharmacology*, 126: 1691-1698.
108. Jacob Y., Badrane H., Ceccaldi P.E., Tordo N., 2000, Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein, *Journal of Virology*, 74: 10217-10222.

109. Jackson A.C., Reimer D.L., 1989, Pathogenesis of experimental rabies in mice: An immunohistochemical study, *Acta Neuropathologica*, 78: 159-165.
110. Jackson A.C., 1991, Biological basis of rabies virus neurovirulence in mice: Comparative pathogenesis study using the immunoperoxidase technique, *Journal of Virology*, 65: 537-540.
111. Jackson A.C., Rintoul N.E., 1992, Effects of postmortem autolysis on the detection of rabies virus genomic RNA and mRNA in mouse brain by using in situ hybridization, *Molecular and Cellular Probes*, 6: 231-235.
112. Jackson A.C., Rossiter J.P., 1997, Apoptosis plays an important role in experimental rabies virus infection, *Journal of Virology*, 71: 5603-5607.
113. Jackson A.C., Park H., 1999, Experimental rabies virus infection of p75 neurotrophin receptor-deficient mice, *Acta Neuropathologica*, 98: 641-644.
114. Jackson A.C., Ye H., Phelan C.C., Ridaura-Sanz C., Zheng Q., Li Z., Wan X., Lopez-Corella E., 1999, Extraneural organ involvement in human rabies, *Laboratory Investigation*, 79: 945-951.
115. Jackson A.C., 2002a, Pathogenesis, In: *Rabies*, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 245-282.
116. Jackson A.C., 2002b, Human rabies, In: *Rabies*, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 219-244.
117. Jackson A.C., 2009, Update on rabies diagnosis and treatment, *Current Infectious Disease Reports*, 11: 296-301.
118. Jackson A.C., 2010, Rabies pathogenesis update, *Revista Pan-Americana de Saude*, 1(1): 167-172.
119. Jackson A.C., 2011, Update on rabies, *Research and Reports in Tropical Medicine*, 2: 31-43.
120. Jogai S., Radotra B.D., Banerjee A.K., 2000, Immunohistochemical study of human rabies, *Neuropathology*, 20: 197-203.
121. Johnston D.H., Tinline R.R., 2002, Rabies control in wildlife, In: *Rabies*, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 445-471.
122. Jovanović M., 2012, Nervni sistem, In: *Specijalna veterinarska patologija*, Jovanović M., Aleksić-Kovačević S., Knežević M. (editors), Udruženje veterinarskih patologa Srbije, Beograd, 263-318.

123. Kawai A., Toriumi H., Tochikura T.S., Takahashi T., Honda Y., Morimoto K., 1999, Nucleocapsid formation and/or subsequent conformational change of rabies virus nucleoprotein (N) is a prerequisite step for acquiring the phosphatase-sensitive epitope of monoclonal antibody 5-2-26, *Virology*, 263:395-407.
124. Kelly R.M., Strick P.L., 2000, Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system, *Journal of Neuroscience Methods*, 103: 63-71.
125. King A.A., Meredith C.D., Thomson G.R., 1994, The biology of southern African lyssavirus variants, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 187: 267-295.
126. Kissi B., Tordo N., Bourhy H., 1995, Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene, *Virology*, 209: 526-537.
127. Khawplod P., Wilde H., Chomchey P., Benjavongkulchai M., Yenmuang W., Chaiyabutr N., Sitprijja V., 1996, What is an acceptable delay in rabies immune globulin administration when vaccine alone had been given previously?, *Vaccine* 14: 389-391.
128. Krebs J.W., Smith J.S., Rupprecht C.E., Childs J.E., 1999, Rabies surveillance in the United States during 1998, *Journal of American Veterinary Medical Association*, 215: 1786-1798.
129. Kristensson K., Dastur D.K., Manghani D.K., Tsiang H., Bentivoglio M., 1996, Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 22: 179-187.
130. Kouznetzoff A., Buckle M., Tordo N., 1998, Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA, *Journal of General Virology*, 79: 1005-1013.
131. Lafon M., 2002, Immunology, In: Rabies, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 351-388.
132. Lang, J., Simanjuntak, G. H., Soerjosembodo, S., Koesharyono, C., and the MAS054 Clinical Investigator Group, 1998, Suppressant effect of human or equine rabies immunoglobulins on the immunogenicity of post-exposure



- rabies vaccination under the 2-1-1 regimen: A field trial in Indonesia, *Bulletin WHO*, 76: 491-495.
133. Lentz T.L., Benson R.J.J., Klimowicz D., Wilson P.T., Hawrot E., 1986, Binding of rabies virus to purified *Torpedo* acetylcholine receptor, *Molecular Brain Research*, 387: 211-219.
  134. Lentz T.L., Burrage T.G., Smith A.L., Crick J., Tignor G.H., 1982, Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?, *Science*, 215: 182-184.
  135. Lepine P., Atanasiu P., 1996, Histopathological diagnosis, In: *Laboratory Techniques in Rabies*, Meslin F. X., Kaplan M. M., Koprowski H. (editors), fourth edition, WHO Geneva, 66-79.
  136. Lewis P., Fu Y., Lentz T.L., 2000, Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures, *Muscle and Nerve*, 23: 720-730.
  137. Li X.Q., Sarmiento L., Fu Z.F., 2005, Degeneration of neuronal processes after infection with pathogenic, but not attenuated, rabies viruses, *Journal of Virology*, 28: 41-51.
  138. Lodmell D.L., Ray N.B., Parnell M.J., Ewalt L.C., Hanlon C.A., Shaddock J.H., Sanderlin D.S., Rupprecht C.E., 1998, DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus, *Nature Medicine*, 4: 949-952.
  139. Lodmell D.L., Dimcheff D.E., Ewalt L.C., 2006, Viral RNA in the bloodstream suggests viremia occurs in clinically ill rabies-infected mice, *Virus Research*, 116: 114-118.
  140. Lopez A., Miranda P., Tejada E., Fishbein D.B., 1992, Outbreak of human rabies in the Peruvian jungle, *Lancet*, 339:408-411.
  141. Malovrh T., Hostnik P., 2005, Diagnostics procedures in rabies, *Veterinarski glasnik*, 59 (1-2): 99-105.
  142. Marquette C., Van Dam A., Ceccaldi P., Weber P., Haour F., Tsiang H., 1996, Induction of immunoreactive interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the brains of rabies virus infected rats, *Journal of Neuroimmunology*, 68: 45-51.
  143. Martinez-Burnes J., Lopez A., Medellin J., Haines D., Loza E., Martinez M., 1997, An outbreak of vampire bat-transmitted rabies in cattle in northeastern Mexico, *Canadian Veterinary Journal*, 38: 175-177.

144. de Mattos C.A., de Mattos C.C., Rupprecht C.E., 2001, Rhabdoviruses, In: Virology, Fields B.N. (editor), fourth ed, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1895-1948.
145. Maxie M.G., Youssef S., 2007, Nervous system, In: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Maxie M.G. (editor), fifth edition, Elsevier, 281- 457.
146. McGarvey P.B., Hammond J., Denelt M.M., Hooper D.C., Fu Z.Z., Dietzschold B., Koprowski H., and Michaels, F. H., 1995, Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes, *Biotechnology*, 13: 1484 - 1487.
147. Mebatsion T., Konig M., Conzelmann K.K., 1996, Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein, *Cell*, 84: 941-951.
148. Mebatsion T., Weiland F., Conzelmann K.K., 1999, Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G, *Journal of Virology*, 73: 242-250.
149. Merrill J.E., Benveniste E.N., 1996, Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful, *Trends in Neurosciences*, 19 (8): 331-338.
150. Miller D.W., 1999, Immunobiology of the blood-brain barrier, *Journal of Neurovirology*, 5: 570-578.
151. Morimoto K., Patel M., Corisdeo S., Hooper D.C., Fu Z.F., Rupprecht C.E., Koprowski H., Dietzschold B., 1996, Characterization of a unique variant of bat rabies virus responsible for newly emerging human cases in North America, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 5653-5658
152. Murphy F.A., Harrison A.K., 1979, Electron microscopy of the rhabdoviruses of animals, In: Rhabdoviruses, Bishop D.H.L. (editor), CRC Press, Florida, 65-106.
153. Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D., 1995, Virus taxonomy: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer-Verlag, New York, 275-288.

154. Neumann H., Boucraut J., Hahnel C., Misgeld T., Wekerle H., 1996, Neuronal control of MHC class II inductibility in rat astrocytes and microglia, *European Journal of Neuroscience* 8: 2582-2590.
155. Neville J, 2004, Rabies in the ancient world, In: *Historical perspective of rabies in Europe and the Mediterranean basin*, King A.A., Fooks A.R., Aubert M., Wandeler A.I. (editors), OIE, Paris, France, 1-12.
156. Nietfeld J.C., Rakich P.M., Tyler D.E., Bauer R.W., 1989, Rabies-like inclusions in dogs, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1: 333-338.
157. Niezgodna M., Rupprecht C.E., 1999, Towards the development of another rabies diagnostic test, 10th Annual Rabies in the Americas Meeting, San Diego, California.
158. Niezgodna M., Hanlon C.A., Rupprecht C.E., 2002, Animal rabies, In: *Rabies*, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 163-218.
159. Noah D.L., Drenzek C.L., Smith J.S., Krebs J.W., Orciari L., Shaddock J., Sanderlin D., Whitfield S., Fekadu M., Olson J.G., Rupprecht C.E., Childs J.E., 1998, The epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996, *Annals of Internal Medicine*, 11: 922-930.
160. Nuovo G.J., DeFaria D.L., Chanona-Vilchi J.G., Zhang Y., 2005, Molecular detection of rabies encephalitis and correlation with cytokine expression, *Modern Pathology*, 18: 62-67.
161. Odegaard O.A., Krogsrud J., 1981, Rabies in Svalbard: Infection diagnosed in arctic fox, reindeer and seal, *Veterinary Record*, 190: 141-142.
162. OIE, 2012, *The Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, World Organization for Animal Health, Paris, France.
163. OIE, 2014, *Rabies technical disease card*, World Organization for Animal Health, Paris, France.
164. Panning M., Baumgarte S., Pfefferle S., Maier T., Martens A., Drosten C., 2010, Comparative analysis of rabies virus reverse transcription-PCR and virus isolation using samples from a patient infected with rabies virus, *Journal of Clinical Microbiology*, 2960-2962.

165. Perl D.P., Good P.F., 1991, The pathology of rabies in the central nervous system, In: *The Natural History of Rabies*, Baer G.A. (editor), CRC Press, Florida, 163-190.
166. Perrin P., Tino de Franco M., Jallet C., Fouque F., Morgeaux S., Tordo N., Colle, J.F., 1996, The antigen-specific cell-mediated immune response in mice is suppressed by infection with pathogenic lyssaviruses. *Research in Virology* 147: 289-299.
167. Plotkin S.A., 1980, Rabies vaccine prepared in human cell cultures: Progress and perspectives. *Reviews of Infectious Diseases*, 2: 433-448.
168. Precausta P., Soulebot J.P., 1991, Vaccines for domestic animals, In: *The Natural History of Rabies*, Baer G.A. (editor), CRC Press, Florida, 445-459.
169. Preuss M.A., Faber M.L., Tan G.S., Bette M., Dietzschold B., Weihe E., Schnell M.J., 2009, Intravenous inoculation of a bat-associated rabies virus causes lethal encephalopathy in mice through invasion of the brain via neurosecretory hypothalamic fibers, *PloS Pathogens*, 5: e1000485.
170. Raux H., Flamand A., Blondel D., 2000, Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain, *Journal of Virology*, 74: 10212-10216.
171. Ray N.B., Ewalt L.C., Lodmell D.L., 1995, Rabie virus replication in primary murine bone marrow macrophages and in human and murine macrophage-like cell lines: Implications for viral persistence, *Journal of Virology*, 69: 764-772.
172. Recularard P., 1996, Cell-culture vaccines for veterinary use, In: *Laboratory Techniques in Rabies*, Meslin F. X., Kaplan M. M., Koprowski H. (editors), fourth edition, WHO Geneva, 314-323.
173. Rose J.K., Whitt M.A., 2001, Rhabdoviridae: the viruses and their replication, In: *Virology*, Fields B.N. (editor), fourth ed, Lippincott Williams & Wilkins Punlishers, 1858-1895.
174. Rothwell N.J., Hopkins S.J., 1995, Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action, *Trends in Neurosciences*, 18 (3): 130-136.
175. Rothwell N.J., Luheshi G., 2000, Interleukin I in the brain: biology, pathology and therapeutic target, *Trends in Neurosciences*, 23 (12): 618-625.

176. Rudd R.J., Trimarchi C.V., 1980, Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus, *Journal of Clinical Microbiology*, 12: 590-593.
177. Rupprecht C.E., Hanlon C.A., Hemachuda T., 2002, Rabies re-examined, *The Lancet Infectious Diseases*, 2: 327-343.
178. Sabouraud A., Smith J.S., Orciari L.A., de Mattos C., de Mattos C., Rohde, R., 1999, Typing of rabies virus isolates by DNA enzyme immunoassay, *Journal of Clinical Virology*, 12: 9-19.
179. Sacramento D., Bourhy H., Tordo N., 1991, PCR techniques as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus, *Molecular and Cellular Probes*, 6: 229-240.
180. Seganti L., Superti F., Bianchi S., Orsi N., Divizia M., Pana A., 1990, Susceptibility of mammalian, avian, fish and mosquito cell lines to rabies virus infection, *Acta Virologica (Praha)*, 34: 155-163.
181. Seif I, Coulon P., Rollin P.E., Flamand A., 1985, Rabies Virus virulence: Effect on pathogenicity and sequence characterization of mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein, *Journal of Virology*, 53: 926-935.
182. Shankar V., Dietzschold B., Koprowski H., 1991, Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication, *Journal of Virology*, 65: 2736-2738.
183. Shannon L.M., Poulton J.L., Emmos R.W., Woodie J.D., Fowler M.E., 1988, Serological survey for rabies antibodies in raptors from California, *Journal of Wildlife Diseases*, 24: 264-267.
184. Smith J.S, 1988, Monoclonal antibody studies of rabies in insectivorous bats of the United States, *Reviews of Infectious Diseases*, 10: 637-343.
185. Smith J.S., 1989, Rabies virus epitopic variation: Use in ecological studies, *Advances in Virus Research*, 36: 215-253.
186. Smith J.S., Seidel H.D., 1993, Rabies: A new look at an old disease, *Progress in Medical Virology*, 40: 82-106.
187. Sokol F., 1975, Chemical composition and structure of rabies virus, In: *The Natural History of Rabies*, Baer G.A. (editor), Academic Press, New York, vol I: 79-102.

188. Solanki A., Radotra B.D., Vasishta R.K., 2009, Correlation of cytokine expression with rabies virus distribution in rabies encephalitis, *Journal of Neuroimmunology*, 217: 85-89.
189. Steele J.H., Fernandez P.J., 1991, History of rabies and global aspects, In: *The Natural History of Rabies*, Baer G.A. (editor), CRC Press, Florida, 1-24.
190. Stein L.T., Rech R.R., Harrison L., Brown C.C., 2010, Immunohistochemical study of rabies virus within the central nervous system of domestic and wildlife species, *Veterinary Pathology*, 47 (4): 630-636.
191. Straub R.H., Westermann J., Scholmerich J., Falk W., 1998, Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs, *Immunology Today*, 19: 409–413.
192. Sudol M., 1996, Structure and function of the WW domain, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 65: 113-132.
193. Suja M.S., Mahadevan A., Madhusudhana S.N., Vijayasarithi S.K., Shankar S.K., 2009, Neuroanatomical mapping of rabies nucleocapsid viral antigen distribution and apoptosis in pathogenesis in street dog rabies – an immunohistochemical study, *Clinical Neuropathology*, 28 (2): 113-124.
194. Sureau P., 1990, Recent data on the epidemiology and prophylaxis of human rabies in France, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 13: 107-110.
195. Surreau P., Ravisse P., Rollin P.E., 1991, Rabies diagnosis by animal inoculation, identification of Negri bodies, or ELISA, In: *The Natural History of Rabies*, Baer G.A. (editor), CRC Press, Florida, 203-217.
196. Thoulouze M.I., Lafage M., Schachner M., Hartmann U., Cremer H., Lafon M., 1998, The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus, *Journal of Virology*, 72: 7181-7190.
197. Tierkel E.S., Atanasiu P., 1996, Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological tests, In: *Laboratory Techniques in Rabies*, Meslin F. X., Kaplan M. M., Koprowski H. (editors), fourth edition, WHO Geneva, 55-65.
198. Tirawatnpong S., Hemachudha T., Manutsathit S., Shuangshoti S., Phanthumchinda K., Phanuphak P., 1989, Regional distribution of rabies

- viral antigen in central nervous system of human encephalitic and paralytic rabies, *Journal of Neurological Sciences*, 92: 91-99.
199. Tollis M., Dietzschold B., Volia C.B., Koprowski H., 1991, Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies, *Vaccine*, 9: 134-136.
  200. Tordo N., Poch O., Ermine A., Keith G., Rougeon F., 1986, Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene?, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 83: 3914-3918.
  201. Tordo N., Poch O., 1988, Structure of rabies virus, In: *Rabies*, Campbell J.B., Charlton K.M. (editors), Kluwer Academic Publishers, Boston, 25-45.
  202. Trimarchi C.V., Smith J.S., 2002, Diagnostic evaluation, In: *Rabies*, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 307-349.
  203. Tsiang H., Ceccaldi P.E., Lycke E., 1991, Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons, *Journal of General Virology*, 72: 1191-1194.
  204. Tsiang H., 1993, Pathophysiology of rabies virus infection of the nervous system, *Advances in Virus Research*, 42: 375-412.
  205. Warrell D.A., Warrell M.J., 1991, Rabies, In: *Infections of the Central Nervous System*, Lambert H.P.(editor), B.C. Decker, Philadelphia, 317-328.
  206. Webster W. A., Casey G.A.. 1996, Virus isolation in neuroblastoma cell culture, In: *Laboratory Techniques in Rabies*, Meslin F. X., Kaplan M. M., Koprowski H. (editors), fourth edition, WHO Geneva, 96-104.
  207. Whitby J.E., Heaton P.R., Whitby H.E., Osullivan E., Johnstone P., 1997, Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay, *Journal of Virological Methods*, 69: 63-72.
  208. Whitfield, S.G., Fekadu M., Shaddock J.H., Niezgoda M., Warner C.K., Messenger S.L., 2001, A comparative study of the fluorescence antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens, *Journal of Virological Methods*, 95: 145-151.

209. Whitt M.A., Buonocore L., Prehaud C., Rose J.K., 1991, Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein, *Virology*, 185: 681-688.
210. Wiktor T.J., Macfarlan R.I., Koprowski H., 1985, Rabies virus pathogenicity, In: *Rabies in the Tropics*, Kuwert E., Mérieux C., Koprowski H., Bogel K. (editors.), Springer-Verlag, New York, 21–29.
211. Wilde H., 1997, Rabies, 1996, *International Journal of Infectious Diseases*, 1: 135-142.
212. Wilkinson L., 2002, History, In: *Rabies*, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 1-22.
213. Wunner W.H., Larson J.K., Dietzschold B., Smith C.L., 1988, The molecular biology of rabies viruses, *Reviews of Infectious Diseases*, 10: 771-784.
214. Wunner W.H., 2002, Rabies virus, In: *Rabies*, Jackson A.C., Wunner W.H. (editors), Elsevier Science, USA, 23-77.
215. Xiang Z.Q., Yang Y., Wilson J.M., Ertl H.C.J., 1996, A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier, *Virology*, 219: 220-227.
216. Yang J., Jackson A.C., 1992, Basis of neurovirulence of rabies virus variant AvO1 with stereotaxic brain inoculation in mice, *Journal of General Virology*, 73: 895-900.
217. Yang J., Koprowski H., Dietzschold B., Fu Z.F., 1999, Phosphorylation of rabies virus nucleoprotein regulates viral RNA transcription and replication by modulating leader RNA encapsidation, *Journal of Virology*, 73: 1661-1664.
218. Yusibov V., Modelska A, Steplewski K., Agadjanyan M., Weiner D., Hooper D.C., Koprowski H., 1997, Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 5784 -5788.
219. Yusibov V., Koprowski H., 1998, Plants as vectors for biomedical products, *Journal of Medicinal Food*, 1: 5-12.



220. Zachary J.F., 2007, Nervous system, In: Pathologic basis of veterinary disease, McGavin M.D., Zachary J.F. (editors), fourth edition, Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, 833-971.

## **Biografija**

Nikola Lj. Vasković je rođen 04.04.1979. godine u Kraljevu, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju prirodnomatemičkog smera. Prvu godinu studija na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 1997/1998. godine. Tokom studija bio je stipendista Vlade Republike Srbije. Diplomirao je u martu 2004. godine sa prosečnom ocenom 8,59.

Po završetku studija volontirao je u Veterinarskom specijalističkom institutu Kraljevo, gde je od oktobra 2004. godine zaposlen kao saradnik za patologiju. Postdiplomske studije, odsek magistratura, naučna oblast patologija i terapija životinja upisao je školske 2004/2005. godine na Fakultetu veterinarske medicine, a magistarsku tezu pod naslovom "Patomorfološke promene i distribucija virusnog antigena kod ptica inficiranih patogenim sojem H5N1 virusa avijarne influence" odbranio je aprila 2010. godine na Katedri za patološku morfologiju.

Odlukom Naučnog veća Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije od 12.05.2014. godine reizabran je u istraživačko zvanje istraživač saradnik. Učestvovao je na više domaćih i međunarodnih veterinarskih simpozijuma. Kao prvi autor ili koautor objavio je tri rada u međunarodnim naučnim časopisima.

**Prilog 1.**

## **Izjava o autorstvu**

Potpisani: Nikola Vasković

broj upisa:

### **Izjavljujem**


da je doktorska disertacija pod naslovom:

Karakteristike promena, distribucija antigena i ekspresija proinflammatory citokina u mozgu lisica prirodno inficiranih virusom besnila

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 21.05.2015.





Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Nikola Vasković

Broj upisa:

Studijski program: Doktorske akademske studije

Naslov rada: Karakteristike promena, distribucija antigena i ekspresija proinflamatornih citokina u mozgu lisica prirodno inficiranih virusom besnila

Mentor: Prof. dr Milijan Jovanović

**Potpisani Nikola Vasković**


izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 21.05.2015.





**Prilog 3.**

## **Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Svetozar Marković" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Karakteristike promena, distribucija antigena i ekspresija proinflamatornih citokina u mozgu lisica prirodno inficiranih virusom besnila

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 21.05.2015.

