

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ



Милан Р. Аничич

**АНАЛИЗА МОРФОЛОШКИХ ПРОМЕНА,
ЕКСПРЕСИЈЕ И ДИСТРИБУЦИЈЕ ВИРУСНОГ
АНТИГЕНА У МОЗГУ ЛИСИЦА ПРИРОДНО
ИНФИЦИРАНИХ ВИРУСОМ ШТЕНЕЋАКА**

Докторска дисертација

Београд, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



Milan R. Aničić

**ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL CHANGES,
EXPRESSION AND DISTRIBUTION OF VIRAL
ANTIGEN IN THE BRAIN OF FOXES NATURALLY
INFECTED WITH CANINE DISTEMPER VIRUS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Ментор:

др Дарко Маринковић, ванредни професор

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Београд

Чланови комисије:

др Дарко Маринковић, ванредни професор

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Београд

др Сања Алексић-Ковачевић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Београд

др Соња Радојичић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Београд

др Слађан Нешић, доцент

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Београд

др Никола Васковић, научни сарадник

Ветеринарски специјалистички институт "Краљево", Краљево

Место и датум одбране: Београд, _____

АНАЛИЗА МОРФОЛОШКИХ ПРОМЕНА, ЕКСПРЕСИЈЕ И ДИСТРИБУЦИЈЕ ВИРУСНОГ АНТИГЕНА У МОЗГУ ЛИСИЦА ПРИРОДНО ИНФИЦИРАНИХ ВИРУСОМ ШТЕНЕЊАКА

Резиме

У овој докторској дисертацији испитивани су узорци мозга црвених лисица (*Vulpes vulpes*) природно инфицираних вирусом штенењака. Након искључивања животиња позитивних на беснило методом директне имунофлуоресценције, вршена су испитивања узорака серума црвених лисица имуноензимском методом у циљу утврђивања присуства антитела против вируса штенењака. Рађена су макроскопска и микроскопска испитивања узорака мозга серолошки позитивних јединки. Експресија и дистрибуција вирусног антигена у мозгу инфицираних лисица утврђена је имунохистохемијски, као и испитивање природе инфламаторног ћелијског инфилтрату. Хистохемијским бојењем *LFB* методом одређен је степен демиелинизације беле мождане масе. Молекуларно-генетичка испитивања коришћена су за доказивање вирусне РНК. Извршена је статистичка обрада резултата утврђених патоморфолошких промена.

Није утврђено присуство јединки позитивних на беснило. Присуство антитела утврђено је код 36,8% животиња и није утврђен утицај висине титра антитела на израженост патоморфолошких промена. Иако нису утврђене макроскопске промене, микроскопски су се уочавале бројне промене у типу негнојног паненцефалитиса и демиелинизујућег леукоенцефалитиса. Имунохистохемијски, утврђена је позитивна реакција умереног до јаког интензитета против вирусног нуклеопротеина (*CDV-NP*), као и присуство Т ћелија у периваскуларном инфилтрату. Демиелинизација је била најизраженија у белој маси малог мозга. Употребом молекуларно-генетичке методе (*RT-PCR*) није утврђено присуство вирусне РНК. Поређењем средњих вредности хистопатолошких промена статистичком обрадом података утврђена је сигнификантна разлика између појединих сегмената мозга.

Кључне речи: црвена лисица, *Vulpes vulpes*, штенећак, хистопатологија, имунохистохемија, *CDV-NP*, серологија

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Патологија

УДК број: 619:616.98:569.74

ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL CHANGES, EXPRESSION AND DISTRIBUTION OF VIRAL ANTIGEN IN THE BRAIN OF FOXES NATURALLY INFECTED WITH CANINE DISTEMPER VIRUS

Summary

In this doctoral dissertation brain samples of red foxes (*Vulpes vulpes*) naturally infected with canine distemper virus (CDV) were examined. After exclusion of animals positive for rabies using direct immunofluorescence test, red foxes' blood serum samples were examined using enzyme-linked immunosorbent assay to detect CDV antibodies. Gross and microscopic examinations of samples of serologically positive animals were performed. The viral antigen expression and distribution in the brain of affected animals were revealed immunohistochemically, as well as the nature of perivascular inflammatory infiltrate. The degree of demyelination was visualized using luxol fast blue staining. Molecular studies were performed to detect the presence of viral RNA. Patomorphological changes were statistically evaluated.

Animals positive for rabies were not detected. Presence of CDV antibodies was detected in 36.8% of examined animals with no link between the antibody titer and the amount of pathological changes. Although no gross changes were observed, numerous changes consistent with non-purulent panencephalitis and demyelinating leukoencephalitis were evident microscopically. Immunohistochemical staining revealed moderate to strong positive reaction against viral nucleoprotein (CDV-NP), as well as the presence of T cells in the perivascular inflammatory infiltrate. Demyelination was the most pronounced in the cerebellar white matter. Using the molecular method (RT-PCR) viral RNA was not detected. Statistical evaluation, comparing the mean values of histopathological changes, showed a significant difference between various brain segments.

Keywords: red fox, *Vulpes vulpes*, distemper, histopathology, immunohistochemistry, CDV-NP, serology

Scientific field: Veterinary medicine

Scientific discipline: Pathology

UDK number: 619:616.98:569.74

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	3
2.1. Историјат.....	3
2.2. Етиологија.....	4
2.3. Епизоотиологија.....	7
2.4. Патогенеза.....	11
2.4.1. Патогенеза нервне форме штенећака	13
2.4.2. Патогенеза демиелинизације код штенећака.....	16
2.5. Имунитет и имуносупресивно деловање вируса.....	20
2.6. Клиничка слика	23
2.6.1. Акутна форма болести	23
2.6.2. Хронична форма болести	24
2.7. Патоморфолошке промене	26
2.7.1. Патолошке промене код нервне форме штенећака	27
2.8. Дијагноза, терапија, вакцинација и превенција.....	29
2.9. Штенећак код лисица.....	34
3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ	44
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	45
4.1. Материјал.....	45
4.1.1. Испитивани материјал	45
4.1.2. Узорковање серума	45
4.1.3. Припрема хистолошких препарата.....	45
4.2. Методе.....	46
4.2.1. Директна имунофлуоресценција.....	46
4.2.2. Индиректна <i>ELISA</i>	47
4.2.3. Хематоксилин еозин (<i>HE</i>)	47
4.2.4. <i>Luxol fast blue</i>	48
4.2.5. Имунохистохемијска метода.....	48

4.2.6. Ланчана реакција полимеразе	50
4.2.7. Статистичка обрада података.....	51
5. РЕЗУЛТАТИ.....	52
5.1. Резултати директне имунофлуоресценције на присуство антигена вируса беснила...	52
5.2. Резултати индиректног <i>ELISA</i> теста на присуство антитела против вируса штенећака	52
5.3. Резултати макроскопског прегледа	53
5.4. Резултати хистохемијских анализа.....	53
5.5. Резултати имунохистохемијских анализа.....	65
5.6. Резултати ланчане реакције полимеразе (<i>RT-PCR</i>).....	69
5.7. Резултати статистичких анализа.....	69
6. ДИСКУСИЈА.....	72
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	86
8. ЛИТЕРАТУРА.....	88

СКРАЋЕНИЦЕ

CDV – canine distemper virus

N – nucleocapsid

P – phosphoprotein

L – large protein

M – matrix protein

H – hemagglutinin

F – fusion protein

SPF – specific pathogen free

MALT – mucosa associated lymphoid tissue

CD – cluster of differentiation

SLAM – signaling lymphocyte activation molecule

Ig – immunoglobulin

IL – interleukin

GFAP – glial fibrillary acidic protein

MHC – major histocompatibility complex

NK – natural killer

PGE2 – prostaglandin E2

IFA – immunofluorescence assay

SNT – serum neutralization test

MLV – modified live virus

HSP – heat shock protein

PCR – polymerase chain reaction

RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction

TNF – tumor necrosis factor

РНК – рибонуклеинска киселина

иРНК – информациона РНК

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

ЦНС – централни нервни систем

ЦСТ – цереброспинална течност

ДЛ – демиелинизујући леукоенцефалитис

1. УВОД

Штенећак представља вирусно, високо контагиозно обољење великог броја врста сисара из шест различитих редова. Описан је први пут у 16. веку код паса али тек Careé почетком 20. века закључује да је вирусне етиологије (Careé-ова болест).

Узрочник штенећака је несегментирани РНК вирус из рода *Morbillivirus*, фамилија *Paramyxoviridae*. Постоји један серотип вируса са 17 различитих генотипова који се разликују по вируленцији и ћелијском тропизму. Пси се сматрају примарним резервоарима вируса док се у природи вирус одржава преносом између великог броја пријемчивих врста дивљих животиња.

Вирус се преноси директним контактом и удисањем инфективних капљица аеросола. Инкубациони период варира од 1 до 4 недеље. Инфекција се манифестује од потпуног изостанка симптома до тешког поремећаја здравственог стања са високим морталитетом. Инфекција централног нервног система се углавном одвија хематогено, након чега долази до развоја полиоенцефалитиса и/или демиелинизујућег леукоенцефалитиса. Као последица имуносупресивног дејства вируса често долази до развоја секундарне бактеријске инфекције.

Према клиничким манифестацијама разликују се катарална и нервна форма или њихова комбинација у оквиру акутне системске форме и хронична нервна форма. Клиничка слика се карактерише респираторним, гастроинтестиналним и нервним симптомима, а ређе променама на кожи, очима, зубима, костима, јастучићима шапа и носној печурци. Патоморфолошки се најчешће срећу интерстицијална пнеумонија, катарални гастроентеритис и генерализована деплеција лимфатичног ткива. На мозгу се могу уочити поља енцефаломалације, а хистолошки – дегенерација неурона, глиоза, периваскуларни моноклеарни инфилтрат и демиелинизација. У ћелијама многих органа некада се уочавају цитоплазматске и једарне инклузије.

Због разноврсне клиничке слике и патоморфолошког налаза дијагностика штенећака представља велики изазов. Иако постоји више дијагностичких процедура скоро све могу дати лажно позитивне или негативне резултате. Специфична терапија не постоји. Главни вид превенције представља редовна и свеобухватна вакцинација паса.

Штенећак и даље представља једно од најважнијих обољења паса. Пријемчивост угрожених врста доводи у питање њихов опстанак и отежава спровођење мера заштите. Мутације вируса и инфекција нових врста доводе до појаве масовних угинућа, посебно у популацијама дивљих животиња које претходно нису биле у контакту са вирусом. Поједини аутори помињу могући зоонотски потенцијал вируса, посебно након наговештаја престанка вакцинације против малих богиња. Инфекција вирусом штенећака се користи као модел за проучавање мултипле склерозе. Актуелна испитивања о овој болести би требало проширити и на црвене лисице, које су могући резервоар вируса у природи.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Историјат

Сматра се да се знало за штенећак још у Аристотелово време. Laosson епизоотију паса у Бохемији (данашња Чешка) 1028. године приписује овом обољењу (Ferry, 1911). Штенећак је први пут описан 1580. године (Whitney и Whitney, 1953). Болест сличних карактеристика се помиње у Француској, Немачкој и Британији средином осамнаестог века. Шездесетих година 18. века описано је неколико епизоотија у Европи укључујући и ону у Мадриду 1763. године када је наводно угинуло 900 паса у једном дану (Fleming, 1871). Blancou претпоставља да су ове епизоотије последица уноса вируса у Европу из Јужне Америке у којој су претходних година забележени бројни случајеви болести паса која одговара штенећаку. Он посебно истиче да су непосредно пре појаве епизоотија 1760. у Шпанију стигли пси из Перуа при чему се у Јужној Америци годину дана раније шири болест која личи на штенећак (Blancou, 2004). Edward Jenner 1809. први препознаје да се ради о инфективном агенсу, да се болест разликује од беснила, и да није преносива на људе (Ferry, 1911; Kirk, 1922). Више од пола века касније, 1875. године Senner је први описао микроорганизам за који сматра да изазива штенећак, тврдећи да је из крви и унутрашњих органа угинулог пса изоловао кокобацил за који је закључио да изазива обољење (Kirk, 1922). Након тога велики број истраживача је успео да изолује различите бактерије за које су тврдили да сами или заједно са другима изазивају штенећак (Tizard, 1999). Тек је Careé 1905. године испитивањем серозног ексудата оболелих паса исправно закључио да штенећак изазива филтрабилни вирус (Ferry, 1911; Tizard, 1999). Исте године он пише да је „специфични вирус или есенцијални елемент болести није видљив под микроскопом, пролази кроз ситне поре бактеријског филтера и не расте на различитим подлогама“ (Careé, 1905). Ипак, из непознатог разлога ово откриће бива игнорисано од стране стручне јавности и до раних двадесетих

година истог века преовладава мишљење да штенећак изазива *Bacillus bronchicanis* (Tizard, 1999) описан од стране Ферија у његовом делу из 1911. године. Tizard истиче да је прву ефективну вакцину против штенећака пронашао Италијан Puntoni 1923. године иако су заслуге за то добили Laidlaw и Dunkin успешно имунизујући псе и феретке 5 година касније (Tizard, 1999). Green је 1926. године доказао да је узрочник штенећака лисица филтрабилни агент (Whitney и Whitney, 1953).

Израз штенећак је описног карактера и говори да је болест углавном везивана за штенад и младе псе. Слично је и са страним изразима који су се користили за ову болест – *distemper*, *hard pad disease*, *dog disease*, *dog influenza*, *dog plague*, *dog typhus*, *canine smallpox*, *catarrhal fever*, *la maladie des chiens*, *la maladie du jeune age*, *hundestaube*, *hundekrankheit*. Ови називи говоре пре свега о значају овог обољења код паса још у стара времена као и о томе да је болест услед шаролике клиничке слике повезивана са до тада познатим болестима људи које су имале исте или сличне симптоме.

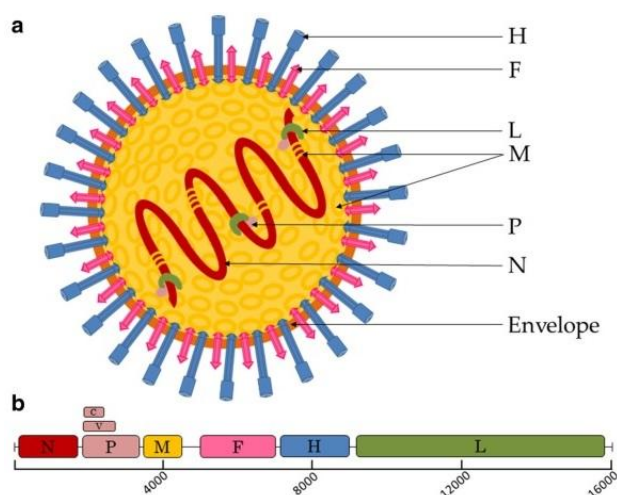
Израз *distemper* јавља се средином шеснаестог века и води порекло од старолатинске речи *distemperare* што означава потопити, помешати у погрешном односу, у погрешној размери, што донекле говори и о тадашњем схватању узрока болести тј. променама у саставу и односу телесних течности.

2.2. Етиологија

Штенећак је инфективно, често фатално обољење паса и великог броја других врста сисара које се јавља у целом свету (Beineke и сар., 2009). Изазива га вирус штенећака паса (*canine distemper virus*, *CDV*), род *Morbillivirus*, фамилија *Paramyxoviridae*, ред *Mononegavirales*. Поред вируса штенећака паса у фамилију *Paramyxoviridae* се убрајају и вирус малих богиња људи (*measles virus*), вирус куге говеда (*rinderpest virus*), вирус куге малих преживара (*peste-des-petits-ruminants virus*), морбиливируси који примарно инфицирају морске сисаре (*dolphin morbillivirus*, *porpoise morbillivirus*, *phocine distemper virus*), као и

најновији члан - вирус штенећака мачака (*feline distemper virus*) (Pringle и сар., 1999; Lamb и Kolakofsky, 2001; Woo и сар., 2012).

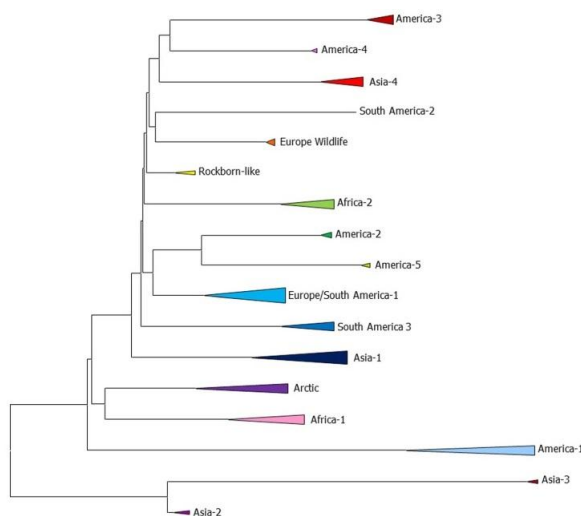
Вирус штенећака садржи несегментирану, једноланчану (негативни поларитет) рибонуклеинску киселину (РНК) која садржи 15 690 нуклеотида и кодира синтезу шест структурних протеина: нуклеокапсида (*nucleocapsid, N*), фосфопротеина (*phosphoprotein, P*), великог протеина (*large, L*), протеина матрикса (*matrix, M*), хемаглутинаина (*hemagglutinin, H*) и фузионог протеина (*fusion, F*) (Orvell, 1980; Diallo, 1990; Lamb и Kolakofsky, 2001). Гени који кодирају синтезу *C* и *V* протеина представљају екстра транскрипционе јединице унутар *P* гена (Lamb и Kolakofsky, 2001). Око вириона се налази липидни омотач, у који су урођени трансмембрански гликопротеини – *F* и *H*, који омогућавају везивање и фузију вируса са ћелијом домаћина и на тај начин утичу на тропизам вируса (von Messling и сар., 2001). Језгро нуклеокапсида које садржи *N*, *P* и *L* протеине иницира интрацелуларну репликацију вируса (Lamb и Kolakofsky, 2001). Вирусни *M* протеин стабилизује омотач вируса повезујући површинске гликопротеине и нуклеокапсидно језгро током матурације вируса (Beineke и сар., 2009, Martella и сар., 2008) (слика 1).



Слика 1. Изглед вируса штенећака и организација генома. а – шематски приказ пресека вириона; б – линеарна мапа генома вирусне РНК (према Rendon-Marin и сар., 2019)

Секвенцирање *H* гена је златни стандард за филогенетску анализу, класификацију и генотипизацију вируса штенећака јер има највећу хетерогеност (аминокиселинску варијацију од око 10%) од свих шест структурних протеина вируса (Pratelli, 2011). Варијација секвенци аминокиселина између генотипова је

већа од 4% док линије унутар генотипа имају мање од 2% варијација у аминокиселинама (Martella и сар., 2008). На основу ових разлика једини серотип вируса штенећака подељен је у 17 генотипова који се разликују у вируленцији и хелијском тропизму (Techangamsuwan and Pratakririya, 2016; Rendon-Marin и сар., 2019). Генотипови вируса штенећака су: *America-1* до 5, *Europe/South America-1*, *South America-2* и 3, *Asia 1* до 4, *Africa-1* и 2, *Europe wildlife*, *Arctic* и *Rockborn-like* (слика 2).



Слика 2. Приказ генотипова вируса штенећака на основу секвенцирања *H* гена (према Rendon-Marin и сар., 2019)

Вирус штенећака је изузетно осетљив на ултраљубичасто зрачење, топлоту, исушивање, оксидирајуће агенсе, детерценте и раствараче масти (Kingsbury и сар., 1978). На собној температури вирус остаје инфективан између 20 минута и 3 сата у ткивима и ексудатима. Инактивација вируса бензалконијум хлоридом (0,05%) јавља се после 10 минута на собној температури (Armstrong и Froelich, 1964). Такође, 70% етанол је ефикасан против вируса штенећака (Watanabe и сар., 1989). Иако је вирус способан да преживи током неколико дана на температурама испод нуле ако је заштићен органским материјалом (Greene и Appel, 1984) пренос вируса штенећака углавном зависи од блиског контакта заражене и пријемчиве животиње.

Да би се вирус одржао на неком простору исти мора бити густо насељен популацијом пријемчивих јединки са континуираним присуством биолошких резервоара болести (Williams, 2001; Alexander и сар., 2010). Захваљујући великој

распрострањености домаћи пси представљају кључне изворе за велики број болести а сматрају се примарним резервоарима и вируса штенећака (Laurenson и сар., 1997; Cleaveland и сар., 2000; Alexander и сар., 2010; Berentsen и сар., 2013; Flaske и сар., 2013). Одржавање вируса у природи је олакшано преносом између великог броја различитих врста (Alexander и сар., 2010).

2.3. Епизоотиологија

Штенећак је пријављен у већини земаља света (Fisher и сар., 2016). Инфекција вирусом штенећака доказана је код врста из шест различитих редова сисара: *Carnivora*, *Rodentia*, *Artiodactyla*, *Primates*, *Proboscidea* и *Pilosa* (Martinez-Gutierrez и Ruiz-Saenz, 2016; Sheldon и сар., 2017). Природне домаћине вируса штенећака чине све фамилије реда *Carnivora* (Deem и сар., 2000).

Болест настала природним путем или као последица вакцинације је у фамилији паса описана код аустралијског динга (*Canis dingo*) (Armstrong и Anthony, 1942), којота (*Canis latrans*) (Gese и сар., 1997; Cypher и сар., 1998), обичног (*Canis aureus*) и црнолеђег шакала (*Canis mesomelas*) (Shamir и сар., 2001; Gowtage-Sequeira и сар., 2009), канадског вука (*Canis lupus*) (Philippa и сар., 2004), америчког сивог вука (*Canis lupus*) (Almberg и сар., 2009), мексичког вука (*Canis lupus baileyi*) (Hedrick и сар., 2003), иберијског вука (*Canis lupus*) (Muller и сар., 2011), апенинског вука (*Canis lupus*) (Di Sabatino и сар., 2014), етиопијског вука (*Canis simensis*) (Gordon и сар., 2015), гривастог вука (*Chrysocyon brashyurus*) (de Almeida Curi и сар., 2012), као и афричких дивљих паса (*Lycaon pictus*) који се сматрају изузетно пријемчивим (Alexander и Appel, 1994; Berentsen и сар., 2013).

Клиничко-патолошке манифестације штенећака код медведа су ретке (Beineke и сар., 2015) иако је вирус серолошки доказан код више врста фамилије *Ursidae*, и то америчког црног медведа (*Ursus americanus*) (Stephenson и сар., 2015), азијског црног медведа (*Ursus tibethanus*) (Nagaо и сар., 2012), поларног медведа (*Ursus maritimus*) (Kirk и сар., 2010), гризлија (*Ursus arctos horribilis*) (Philippa и сар., 2004), и апенинског (марсиканског) мрког медведа (*Ursus arctos*

marsicanus) (Di Francesco и сар., 2015). Schönbauer и сар. наводе штенећак као узрок смрти новорођених мечића поларног медведа и андског медведа (медвед наочар, *Tremarctos ornatus*) (Schönbauer и сар., 1984). Смртоносна инфекција овим вирусом доказана је и код велике панде (*Ailuropoda melanoleuca*) (Hvistendahl, 2015, Feng и сар., 2016).

Најбројнија суперфамилија реда звери – *Musteloidea* обухвата четири фамилије и у свакој од њих су утврђене врсте пријемчиве на штенећак. Из фамилије *Procyonidae* доказан је код ракуна (*Procyon lotor*) (Hamir и сар., 1998; Rentería-Solís и сар., 2014), патуљастог ракуна (*Procyon pygmaeus*) (McFadden и сар., 2005), и кинкаџа (*Potos flavus*) (Kazacos и сар., 1981). Феретке (*Mustela putorius furo*) су високо пријемчиве на инфекцију вирусом штенећака са морталитетом и до 100% код невакцинисаних популација (Pegriñán и сар., 2008). Поред њих, из фамилије *Mustelidae* болест је описана и код нерца (*Neovison vison*) (Trebbien и сар., 2014), црноногог твора (*Mustela nigripes*) (Williams и сар., 1988), као и других творова, затим различитих врста куна, ласица, јазаваца и видри, што наводи на закључак да су сви чланови фамилије пријемчиви (van Moll и сар., 1995; Baumgärtner и сар., 2003). Штенећак је описан и код црвене панде (*Ailurus fulgens*, фамилија *Ailuridae*) (Bush и сар., 1976) као и код пругастог твора (*Mephitis mephitis*, фамилија *Mephitidae*) (Gehrt и сар., 2010).

Слично другим фамилијама и у фамилији мачака вирус штенећака може изазвати клинички инапарентну инфекцију или довести до угинућа оболеле јединке. Иако је утврђено присуство антитела против штенећака код домаћих мачака (*Felis catus*) нема извештаја о природној инфекцији вирусом штенећака системског карактера упркос честом контакту са псима (Ikeda и сар., 2011). Експериментална инфекција са високо вирулентним сојем вируса резултирала је асимптоматском инфекцијом без излучивања вируса (Appel и сар., 1974) док је инфекција *SPF* (*specific pathogen free*, *SPF*, енг.) мачака инокулацијом хомогената ткива пореклом од леопарда угинулог од штенећака, изазвала само пролазну леукопенију без клиничких знакова болести (Harder и сар., 1996). Дивље (*Felis silvestris silvestris*) и фералне мачке (*Felis silvestris catus*) у Португалији показују знаке ниске изложености вирусом штенећака (Duarte и сар., 2012).

Неутрализујућа антитела против штенећака су утврђена код великог броја различитих дивљих мачака у природним стаништима: амурског тигра (*Panthera tigris altaica*) (Terio и Craft, 2013), леопарда (*Panthera pardus*) (Thalwitzer и сар., 2010) и јагуара (*Panthera onca*) (Furtado и сар., 2013). Током 1994. године и прве епизоотије штенећака код великих мачака у Серенгетију у Источној Африци готово трећина лавова (*Panthera leo*) је угинула. Анализе су показале да је сој вируса био генетски сличан *Onderstepoort* соју изолованом код домаћих паса у Јужној Африци. Клинички су били присутни епилептиформни напади и миоклонус. Смрт је код оболелих животиња наступила услед негнојног енцефалитиса и пнеумоније (Roelke-Parker и сар., 1996). Слична епизоотија се десила 2001. код популације лавова у близини Нгоронгоро кратера (Kissui и Packer, 2004). Како вакцинација паса, као главних резервоара вируса и извора инфекције за лавове у Серенгетију, није довела до престанка преноса вируса на лавове, претпоставља се да вирус обитава у дивљим домаћинима, пре свега хијенама и шакалима (Viana и сар., 2015). Инфекција вирусом штенећака код лавова не мора бити смртоносна што показује ретроспективна серолошка студија која открива да је најмање пет „тихих“ епизоотија штенећака прошло кроз исту популацију лавова између 1976. и 2006. године без видљивих клиничких знакова или повећања смртности (Munson и сар., 2008). Изражена инфекција са *Babesia sp.* заједно са екстремном сушом се сматрају главним факторима који су довели до епизоотија 1994. и 2001. (Munson и сар., 2008). Као и код других угрожених врста, штенећак се сматра посебном претњом за опстанак амурског тигра. Генетска испитивања показују да поједини сојеви вируса могу лако да инфицирају ове животиње и доведу до појаве клиничких симптома, па неки аутори сматрају да штенећак код мачака није случајан налаз или последица „преливања“ болести са других врста већ да мачке представљају уобичајене домаћине вируса штенећака (Terio и Craft, 2013). Велике мачке могу оболети и у зоолошким вртovima (Appel и сар., 1994; Nagaо и сар., 2012). Штенећак је утврђен и код све четири врсте рода *Lynx*, и то иберијског риса (*Lynx pardinus*) (Melі и сар., 2010), обичног (евроазијског) риса (*Lynx lynx*) (Origi и сар., 2012), канадског (*Lynx canadensis*) и риђег риса (*Lynx rufus*) (Daoust и сар., 2009). Неке од ових су високо угрожене врсте. Постоје серолошки подаци о инфекцији вирусом штенећака код гепарда

(*Acinonyx jubatus*), каракала (*Caracal caracal*) (Thalwitzer и сар., 2010), Жоффројевих мачака (*Leopardus geoffroyi*) (Uhart и сар., 2012) и пуме (*Puma concolor*) (Nava и сар., 2008; Foley и сар., 2013).

Ракунолики пси (*Nyctereutes procyonoides*) представљају резервоаре и векторе за велики број паразита и инфективних агенаса укључујући и штенећак (Sutor и сар., 2011). Ове животиње су високо пријемчиве на вирус штенећака (Kameo и сар., 2012) показујући сличне морфолошке промене које се налазе и код инфицираних паса (Nagaо и сар., 2012).

Штенећак је утврђен код великог броја врста лисица. Тачније, представници сва три рода племена лисица (правих лисица) могу оболети од штенећака. Болест је најбоље описана код најбројнијег и географски најраширенијег представника - црвене (риђе) лисице (*Vulpes vulpes*) на простору Европе: у Немачкој (Frölich и сар., 2000; Sekulin и сар., 2011; Denzin и сар., 2013; Lempp и сар., 2017), Италији (Martella и сар., 2002, 2010; Monne и сар., 2011; Nouvellet и сар., 2013), Шпанији (López-Рења и сар., 1994, Sobrino и сар., 2008), Португалији (Santos и сар., 2009), Белгији (Garigliany и сар., 2018), Грчкој (Billinis и сар., 2013), Луксембургу (Damien и сар., 2002) и Скандинавији (Åkerstedt и сар., 2010). Болест је утврђена и код преријске (*Vulpes velox*) и мале (ушате) лисице (*Vulpes macrotis*) (Miller и сар., 2000), индијске лисице (*Vulpes bengalensis*) (Belsare и сар., 2014) и фенек лисице (*Vulpes zerda*) (Woo и сар., 2010). Болест је описана и код врста из рода *Urocyon*. За изражено смањење популације острвске лисице са острва Санта Каталина (*Urocyon littoralis catalinae*) одговорним се сматра инфекција вирусом штенећака а за пренос вируса су окривљени ракуни који су унешени на острво (Timm и сар., 2009). Сива лисица (*Urocyon cinereoargenteus*), друга врста из овог рода је пријемчива на природну инфекцију, али и на вакцинацију атенуираном вакцином (Halbrooks и сар., 1981). Лисица крабојед (*Cerdocyon thous*) показује неуролошке симптоме и подлеже инфекцији вирусом штенећака (Ferreuga и сар., 2009). Андска (*Dusicyon culpaeus*) и јужноамеричка сива лисица (*Dusicyon griseus*) су пријемчиве на вирус штенећака (Martino и сар., 2004). Током епизоотије у Серенгети-Мара екосистему у источној Африци међу угиналим животињама је и дугоуха лисица (*Otocyon megalotis*) (Roelke-Parker и сар., 1996). Серолошки докази о инфекцији или угинућу услед штенећака су

утврђени код врста рода *Pseudalopex* (Acosta-Jammet и сар., 2011), пампаске лисице (*Lycalopex gymnocercus*) (Fiorello и сар., 2007; Giannitti и сар., 2012) и сребрне лисице (*Lycalopex vetulus*) (Megid и сар., 2010).

2.4. Патогенеза

Штенећак представља високо контагиозно обољење које се лако преноси између пријемчивих врста контактом или аеросолом који настаје од оралних, респираторних и окуларних секрета и ексудата који садрже вирус. Током акутне фазе болести и други телесни екскрети и секретари (фецес, урин) могу садржати вирусне партикуле (Greene и Appel, 1998; Williams, 2001). Излучивање вируса може трајати и до 90 дана након инфекције и дешава се и у случајевима супклиничке инфекције (Appel 1987; Greene и Appel, 1998). Директан контакт и удисање инфективних капљица аеросола су главни путеви преноса вируса, мада се вирус може пренети и контаминираним предметима током неколико часова на собној или нижим температурама (Krakowka и сар., 1980; Kapil и Yeary, 2011).

Велике варијације у трајању, интензитету и клиничкој слици штенећака су уочене код експериментално инфицираних паса као и других животиња природно инфицираних овим вирусом. Инкубациони период варира од једне до четири недеље и зависи од генотипа вируса, узраста животиње у време инфекције и њеног имуног статуса. Болест се манифестује различито, од потпуног изостанка клиничких симптома до тешког поремећаја здравственог стања са морталитетом и до 50% (Appel, 1970, 1987; Krakowka и сар., 1980; Moritz и сар., 2000; Schwab и сар., 2007). Након инфицирања, долази до вирусне репликације у лимфатичном ткиву респираторног система. Моноцити и ткивни макрофаги респираторног епитела и тонзила представљају прве ћелије које након инфекције преносе вирус (Appel, 1970). Након репликације вирус се шири путем крви и лимфе у удаљена хематопоезна ткива током прве виремичне фазе (Beineke и сар., 2009).

Први клинички симптоми обухватају летаргију, дехидрацију, анорексију и мршављење на које се настављају израженије клиничке манифестације које зависе

од захваћених органа. Развој двофазне грознице представља једну од карактеристичних појава за ову болест (Wright и сар., 1974). Пролазна грозница и појава лимфопеније се јављају 3 до 6 дана након инфекције (Krakowka и сар., 1980) и подударaju се са првом виремијом током које настаје генерализована инфекција свих лимфатичних ткива укључујући слезину, тимус, лимфне чворове, коштану срж, лимфатично ткиво мукозе црева (*mucosa associated lymphoid tissue, MALT*, енг.) и макрофаге ламине проприје дигестивног система (Appel, 1970; Wright и сар., 1974) као и Купферове ћелије јетре (Appel, 1987). Виремија настаје ширењем слободног вируса као и вируса унутар леукоцита и тромбоцита. Репликација у лимфатичним органима доводи до изражене и дуготрајне имуносупресије (Appel, 1969; Krakowka и сар., 1980; Krakowka, 1982). Инфекција Т ћелија је интензивнија него инфекција Б ћелија. Јавља се изражено смањење броја $CD4+$ (*cluster of differentiation, CD*, енг.) Т лимфоцита које траје неколико недеља док су $CD8+$ Т ћелије мање погођене и њихов број се релативно брзо враћа у физиолошке границе (Griot и сар., 2003).

Око десетог дана после инфекције јавља се секундарна виремија и вирус штенећака се преноси ка различитим епителним ткивима и централном нервном систему (ЦНС), често уз појаву високе температуре, што за резултат има инфекцију многих паренхимских ћелија (Appel, 1969; Appel и Gillespie, 1972; Blixenkronе-Möller, 1989; Blixenkronе-Möller и сар., 1989; Okita и сар., 1997). Последишно, вирус инфицира ћелије респираторног, дигестивног, уринарног и ендокриног система, као и централног нервног система и лимфатичног ткива, па се тако може наћи у ендотелним ћелијама, кератиноцитима, фибробластима, тромбоцитима, различитим имунофено-типovima лимфоцита, бронхијалним, епителним и неуроектодермалним ћелијама (Baumgärtner и сар., 1989; Gröne и сар., 2004a,b; Koutinas и сар., 2004). Као знак епителне инфекције јављају се различите респираторне, дигестивне и кожне манифестације. Најозбиљнија компликација је инфекција ЦНС-а са појавом неуролошких симптома и лошом прогнозом (Tipold и сар., 1999).

Испитивања различитих сојева вируса штенећака пореклом са различитих географских локација и врста животиња указују да ген хемаглутинин протеина подлеже генетском дрефту (McCarthy и сар., 2007). Филогенетска анализа овог

гена и његовог протеина показује да су варијације на аминокиселинским резидуама 530 и 549 *H* протеина, које су битне за везивање за *SLAM* (*signaling lymphocyte activation molecule, SLAM*, енг.; *CD150*) рецепторе ћелије домаћина и започињање процеса фузије, у вези са појавом болести код нових врста животиња (McCarthy и сар., 2007; Zipperle и сар., 2010).

2.4.1. Патогенеза нервне форме штенећака

Појава лезија у ЦНС-у зависи од генотипа вируса, узраста и имуног статуса животиње и може се класификовати у различите суптипове (Pearce-Kelling и сар., 1990; Raw и сар., 1992). Уопштено, разликује се полиоенцефалитис и леукоенцефалитис који се карактеришу различитом дистрибуцијом и патогенезом лезија.

Инфекција нервне система вирусом штенећака превасходно се одвија хематогеним путем (Krakowka и сар., 1987a; Krakowka, 1989), док инфекција епендимских ћелија и субепендимске беле масе указује на ширење вируса путем цереброспиналне течности (ЦСТ) (Vandeveldelde и сар., 1985b). Ширење вируса путем олфакторног нерва је описано код експериментално инфицираних феретки. Није потврђено да ли се ово односи и на природну инфекцију код других животиња (Rudd и сар., 2006). Baumgärtner и сар. (1989) претпостављају директно ширење од менингеалних ћелија меке мозданице. Првих дана по експерименталној инфекцији вирус се, током виремије, шири као слободан или везан за ћелије (Axthelm и Krakowka, 1987; Summers и Appel, 1987). Хематогено вирус се шири путем леукоцита (Summers и сар., 1979). Вирусни антигени прво се могу утврдити у капиларима и ендотелу венула ЦНС-а петог и шестог дана након инфекције и/или у периваскуларним лимфоцитима, наставцима астроцита и перицита осам дана након инфекције (Axthelm и Krakowka, 1987; Summers и Appel, 1987). Инфекција епитела хориоидних плексуса вирусом штенећака са ослобађањем нових вируса у цереброспиналну течност и накнадну инфекцију епендимских ћелија и субепендимске беле масе може се приметити десетог дана након инфекције (Appel и Gillespie, 1972; Vandeveldelde и сар., 1985b).

Некада, ретко, среће се кратка фаза полиоенцефалитиса пре развоја демиелинизујућег леукоенцефалитиса (ДЛ) (Vandeveldelde и Kristensen, 1977; Summers и сар., 1984). Инфекција ЦНС-а вирусом штенећака може проћи кроз фазу оштећења сиве и касније беле масе а крајњи исход је највише одређен генотипом вируса (Summers и сар., 1984). Ово подржава налаз субпијалних лезија у малом мозгу и присуство позитивних ћелија на антигене вируса штенећака унутар меке можданице и околне сиве масе у раној фази инфекције.

Присуство вирусних протеина у ћелијским наставцима указује на могући пренос вируса овим путем у циљу избегавања имуног надзора (Alldinger и сар., 1993a,b) што је и показано у испитивањима инфицираних ћелијских култура (Zubriggen и сар., 1995a,b). Измене антигена условљене специфичним антивирусним антителима могу да доведу до смањене експресије вирусних протеина и перзистенције вируса код демиелинизујућег леукоенцефалитиса (Alldinger и сар., 1993a,b). У сивој маси налази се више вирусне РНК него протеина, што указује на смањење транслације као могућег начина вирусне перзистенције (Müller и сар., 1995). Перзистенција вируса представља важан фактор за индукцију имунски посредованих механизма у хроничној фази демиелинизујућег леукоенцефалитиса (Gaedke и сар., 1997, 1999). Фактори који фаворизују опстанак вируса укључују нецитолитичну инфекцију и слабо ослобађање вируса, чиме се ограничава излагање вирусних антигена локалним имуним ћелијама (Zubriggen и сар., 1995a,b)

Унутар ЦНС-а вирус штенећака може инфицирати неуроне, астроците, микроглију, олигодендроците, епендимске ћелије, ћелије хориоидног плексуса и алдиноглија ћелије (Orlando и сар., 2008). Термин алдиноглија користи се да дефинише фамилију глија ћелија промотера раста и обухвата неколико специјализованих врста макроглија ћелија са карактеристикама сличним Швановим ћелијама. *In vitro* студије указују на склоност различитих генотипова вируса штенећака ка овом типу ћелија (Orlando и сар., 2008).

Улога олигодендроцита код штенећака није у потпуности разјашњена. Инфекција олигодендроцита је утврђена код малог броја ћелија (Raine, 1976; Blakemore и сар., 1989). Неке *in vivo* и *in vitro* студије нису успеле да докажу

инфекцију олигодендроцита (Vandeveldelde и сар., 1983, 1985a; Zurbriggen и Vandeveldelde, 1983; Zurbriggen и сар., 1986, 1987a,b). Zurbriggen и сар. (1993) успевају да докажу ограничену инфекцију ових ћелија, коју карактерише присуство секвенци нуклеинске киселине вируса и одсуство вирусних антигена. Доказано је да се значајан број олигодендроцита и даље налази у хроничним лезијама, па изгледа да демиелинизација претходи губитку ових ћелија код ДЛ-а (Schobesberger и сар., 1999, 2002). За разлику од мултиполарних зрелих олигодендроцита који су ретко инфицирани, субпопулација биполарних прекурсора ових ћелија које експримирају галактоцереброзид испољава високу пријемчивост за неке генотипове вируса штенећака у *in vitro* условима (Pearse-Kelling и сар., 1990, 1991). Биполарна ћелијска популација добијена из ткива мозгова одраслих паса, која експримира неуротрофин рецептор $p75^{NTR}$ испољава повећану пријемчивост за овај вирус у *in vitro* условима (Orlando и сар., 2008). Фенотипски сличан ћелијски тип се може утврдити у лезијама код ДЛ-а. Инфекција олигодендроцита вирусом штенећака и даље представља нејасан процес који бар у једном делу зависи од степена ћелијске диференцијације у време инфекције.

Астроцити су главна ћелијска популација која бива инфицирана вирусом штенећака у раним плаковима. Ова популација ћелија представља 95% од свих инфицираних ћелија (Mutinelli и сар., 1989). *In vitro* студије показују смањену пријемчивост зрелих астроцита на вирус штенећака у поређењу са незрелим. Незреле ћелије сличне астроцитима, позитивне на виментин, су присутне у центру и према периферији узнапредовалих лезија, док се реактивна астроглиоза сачињена од ћелија позитивних на глијални кисели фибрилари протеин (*glial fibrillary acidic protein, GFAP*, енг.) налази на периферији ових лезија. Ћелије позитивне на виментин које морфолошки личе на астроците представљају главни тип ћелија који садржи вирус у узнапредовалим лезијама, што указује на промену у вирусном тропизму и/или пријемчивости глија ћелија током прогресије болести. Овакви резултати *in vitro* и *in vivo* студија могу указивати на повратак зрелих астроцита ка незрелом фенотипу (Seehusen и сар., 2007).

Експресија антигена и РНК вируса штенећака у неуронима, која се јавља у свим типовима нервне форме штенећака током ране фазе и најизраженија је код

полиоенцефалитиса, је у вези са диспропорционално малом количином вирусних протеина у поређењу са информационом РНК (иРНК) (Nesslerer и сар., 1999). Смањена количина вирусног *M* протеина указује на ограничену инфекцију, слично налазу у олигодендроцитима код ДЛ-а и субакутног склерозирајућег паненцефалитиса, ретке компликације малих богиња људи (Nesslerer и сар., 1997).

2.4.2. Патогенеза демиелинизације код штенећака

Демиелинизујући леукоенцефалитис представља двофазни процес (Baumgärtner и Alldinger, 2005). Започињање процеса се приписује директном дејству вируса док његова прогресија представља имунопатолошки процес (Baumgärtner и сар., 1989; Summers и Appel, 1994; Alldinger и сар., 1996). Иницијалне лезије мијелина развијају се током периода изражене имуносупресије и нису инфламаторног карактера (Vandeveldelde и сар., 1982). Демиелинизација се јавља упоредо са репликацијом вируса у глија ћелијама беле масе (Vandeveldelde и сар., 1985b; Zurbriggen и сар., 1993). Иницијалне лезије у белој маси су у вези са активношћу вируса и њихов развој је јасно предвидљив (Summers и сар., 1979; Higgins и сар., 1982; Vandeveldelde и сар., 1985b). Већину инфицираних ћелија чине астроцити (Mutinelli и сар., 1989), док је инфекција олигодендроглије веома ретка (Wisniewski и сар., 1972; Raine, 1976; Higgins и сар., 1982; Summers и Appel, 1987; Blakemore и сар., 1989; Glaus и сар., 1990). Око 8% ових ћелија на периферији лезија садржи иРНК вируса (Zurbriggen и сар., 1998). Оваква ограничена инфекција олигодендроцита је утврђена раније у култури ћелија мозга пса (Zurbriggen и сар., 1993). Протеини вируса су пронађени веома ретко у култури олигодендроцита, за разлику од астроцита и микроглије који са лакоћом подржавају инфекцију вирусом штенећака (Vandeveldelde и сар., 1985a; Zurbriggen и сар., 1986, 1987a).

Између 20. и 30. дана након инфекције култивисани олигодендроцити који расту на површини слоја астроцита у мешовитој култури ћелија псећег мозга почињу да дегенеришу и нестају иако култура остаје континуирана (Zurbriggen и сар., 1987b). Ултраструктурне промене код оваквих олигодендроцита обухватају микровакуолизацију и губитак органела (Glaus и сар., 1990). Морфолошким

променама претходи метаболичка дисфункција ових ћелија, јер се активност церебродид сулфотрансферазе, ензима специфичног за олигодендроците, значајно смањује убрзо након инфекције (Glaus и сар., 1990) као и транскрипција мијелина у инфицираној култури ћелија (Grabert и сар., 1995). У *in vivo* студијама је показано да инфекција вирусом штенећака доводи до смањене транскрипције гена за мијелин, (Zurbriggen и сар., 1998). Морфолошке промене олигодендроцита су описане и *in vivo* у демиелинизујућим лезијама (Summers и Appel, 1987; Blakemore и сар., 1989). Судбина олигодендроцита остаје нејасна, и нема солидних доказа да ове ћелије улазе у некрозу или апоптозу услед инфекције штенећаком, ни у *in vivo* ни у *in vitro* условима (Schobesberger и сар., 1999). Акутна инфекција беле масе код штенећака има за последицу метаболичке промене олигодендроцита које доводе до демиелинизације (Tipold и сар., 1999).

Ефективни антивирусни неутрализујући одговор изостаје у акутној фази штенећака, антивирусна антитета, имуноглобулини М класе (*IgM*) се појављују за око две недеље од инфекције (Varben и сар., 1999). Упркос израженој имуносупресији и недостатку периваскуларних инфилтрата, бројне *CD8+* Т ћелије се могу пронаћи у акутним демиелинизујућим лезијама и дифузно распоређене у можданом паренхиму, углавном у подручју вирусне инфекције. Код таквих животиња у цереброспиналној течности се може утврдити висока концентрација интерлеукина 8 (*IL-8*) (Tipold и сар., 1999). Alldinger и сар. (1996) наводе могућност да иницијална активација макрофага и микроглије која настаје код штенећака може бити окидач инвазије Т ћелија у ЦНС. Антивирусне цитотоксичне реакције имуног система су утврђене само у каснијим фазама болести (Appel и сар., 1982).

Инфлукс ћелија запаљења током раних лезија у ЦНС-у је минималан (акутне и субакутне неинфламаторне лезије) за разлику од наглог пораста инфламаторних ћелија пореклом из крви, упоредо са опоравком и репулацијом периферних лимфатичних ткива током хроничне фазе (McCullough и сар., 1974a,b; Vandeveld и сар., 1981; Summers и Appel, 1994; Wünschmann и сар., 1999). Лимфоцити у раним лезијама експримирају доминантно *CD8+* фенотип указујући да је антители независна цитотоксичност можда укључена у елиминацију вируса и могући развој раних лезија (Wünschmann и сар., 1999). Претпоставља се да је

иницијална миграција Т ћелија посредована хемокинима пореклом од микроглије, као што је *IL-8* (Tipold и сар., 1999). Нагомилавање имуних ћелија у ЦНС-у током раних фаза болести може да олакша каснији развој имуног одговора и с њим везане имунопатолошке компликације (Tipold и сар., 1999). Повећана регулација молекула главног хистокомпатибилног комплекса класе 2 (*major histocompatibility complex class II, MHC II*, енг.) током прогресије лезија код ДЛ-а и истовремено смањење експресије вирусних протеина унутар ЦНС-а указује на умешаност невирусних антигена као окидача имунски посредованих процеса у хроничној фази демјелинизације (Alldinger и сар., 1996). Главни хистокомпатибилни комплекс класе 2 је углавном експримиран на микроглији, ендотелу, менингеалним, епителним ћелијама хориоидног сплета, епендимским и интраваскуларним ћелијама као и већини периваскуларних ћелија пореклом из крви.

Активирани макрофаги и микроглија ћелије изазивају и корисне и штетне ефекте током развоја лезија. Иако је губитак мијелина у раним лезијама приписан директном или индиректном дејству вируса, демјелинизација у хроничним лезијама може се јавити као колатерална штета и развити услед превелике активности ових ћелија. Хронична инфламаторна демјелинизација може бити последица тзв. „*bystander*“ механизма и резултат интеракције између макрофага/микроглије и антивирусних антитела (Vandeveldelde и Zurbriggen, 1995). Термин „*bystander*“ демјелинизација се користи да опише ефекат оштећења мијелина протеолитичким ензимима ослобођеним од стране активираних макрофага/микроглије у одсуству видљиве инфекције олигодендроцита (Sammer и сар., 1978). Активација ових ћелија коју карактерише повећана експресија *MHC II* и адхезивних молекула резултира ослобађањем токсичних фактора, повећањем фагоцитне активности и стварања слободних кисеоникових радикала након индукције оксидативног праска (Bürge и сар., 1989; Griot и сар., 1990). Штенећаком изазвана фагоцитна активност може да допринесе оштећењу олигодендроцита и/или мијелина (Vandeveldelde и Zurbriggen, 2005; Stein и сар., 2006, 2007). И хуморални антивирусни имуни одговор може да доведе до деструкције олигодендроцита као „невиних посматрача“ („*innocent bystanders*“, енг.). Аутореактивне Т ћелије могу бити одговорне за настанак мијелин-

специфичног ћелијског имунитета секундарно услед оштећења мијелина у ЦНС-у (Krakowka и сар., 1973; Wünschmann и сар., 2000). Ипак тачна улога овог самореактивног имуног одговора и аутоантитела у патогенези демиелинизације ЦНС-а остаје неутврђена. Другим речима, у поређењу са аутоимуним демиелинизујућим болестима укључујући експериментални алергијски енцефалитис, антимијелински одговор може представљати епифеномен пре него узрок који доприноси губитку мијелина код ДЛ-а (Krakowka и сар., 1973; Cerruti-Sola и сар., 1983).

Упоредо са опоравком имуног система, приближно око 7 недеља након инфекције, периваскуларни моноклеарни ћелијски инфилтрати се налазе унутар лезија у мозгу. Током опоравка имуног система, инфилтрација $CD4+$ Т ћелија је праћена плазма ћелијама и јаком синтезом антитела (Vandeveld и Zurbriggen, 2005). Плазма ћелије, које стварају углавном имуноглобулине Г класе (IgG), се налазе у периваскуларним инфилтратима и расуте по лезијама (Vandeveld и сар., 1981, 1982). Изражен антивирусни штенећак-специфични хуморални имуни одговор се уочава и у серуму и цереброспиналној течности. Смањење стварања антивирусних антитела и упоредна појава клиничког побољшања указује на штетан утицај хуморалног имунитета на развој болести. Повећана продукција антитела услед појаве интрацеребралних плазма ћелија убрзава деструкцију мијелина код хроничног ДЛ-а (Vandeveld и сар., 1981, 1982, 1986; Alldinger и сар., 1996). Комплемент-зависна антителима посредована хуморална цитотоксичност се помиње као могући механизам за настанак демиелинизације (Vandeveld и сар., 1982, 1986). Истовремена појава великог броја унутарлезиских и периваскуларних $CD8+$ Т лимфоцита и периваскуларних Б и $CD4+$ Т ћелија указује на антителима зависну Т ћелијама посредовану цитотоксичност (Vandeveld и сар., 1982; Alldinger и сар., 1996; Wünschmann и сар., 1999). Имунофенотипске промене у унапредовалим лезијама су индикативне за хиперсензитивну реакцију одложеног типа (Wünschmann и сар., 1999). Антимијелинска специфична антитела су утврђена у цереброспиналној течности (Krakowka и сар., 1973; Vandeveld и сар., 1986; Rima и сар., 1991). Ипак њихов значај остаје нејасан јер се висок титар ових антитела може утврдити и код животиња са лезијама у фази резолуције (Vandeveld и сар., 1986).

2.5. Имунитет и имуносупресивно деловање вируса

Слично осталим морбилivirusима, као што су изазивачи малих богиња и куге говеда, вирус штенећака је лимфотропан и високо имуносупресиван. Инфекција изазива дуготрајан и изражен пад имунитета и доводи до измена у хуморалним и ћелијским имуним функцијама које се карактеришу имуносупресијом и леукопенијом што оболеле чини изузетно пријемчивим на опортунистичке инфекције (Krakowka и сар., 1975а.; Cerruti-Sola и сар., 1983). Разумевању имуног одговора и имуносупресије изазване вирусом штенећака доста су допринеле експерименталне инфекције гнотобиотичких паса (Krakowka и сар., 1980), као и природне и експерименталне инфекције феретки. Штенећак код феретки доводи до развоја акутне, системске и јако имуносупресивне болести, углавном са смртним исходом. Експериментална инфекција код ових животиња доводи до леукопеније и смањене пролиферације лимфоцита, што за последицу има инхибицију ћелијског и хуморалног имуног одговора. Зато, штенећак код феретки представља поуздан анимални модел за испитивање имуносупресије изазване морбилivirusима и развој нових вакцина против малих богиња људи и штенећака животиња (Welter и сар., 2000; von Messling и сар., 2003).

Интактан хуморални и ћелијски имуни одговор је од пресудне важности за елиминацију вируса штенећака (Krakowka и сар., 1980; Krakowka, 1982; Rima и сар., 1991). Имуноглобулини М класе се јављају унутар прве две недеље од инфекције (Vandeveldelde и Zubriggen, 2005). У овом тренутку, од интензитета хуморалног имуног одговора зависи исход болести. Заштитни хуморални имуни одговор против штенећака је резултат стварања антитела против нуклеопротеина и протеина вирусног омотача (Miele и Krakowka, 1983; Rima и сар., 1991). Изостанак ефективног хуморалног имуног одговора води у акутни, често фатални клинички ток, док мерљиви титар антитела 10-14 дана након инфекције води ка елиминацији вируса или његовој перзистенцији. Krakowka и сар. (1975b) истичу да елиминација вируса значајно зависи од специфичности имуноглобулина да препознају протеине вирусног омотача, док Rima и сар. (1991) наглашавају да специфична антитела против вирусног хемаглутинаина спречавају развој лезија

ЦНС-а код инфицираних паса. Недостатак антитела против протеина матрикса и -омотача вируса доводи до трајног неуролошког обољења (Krakowka и сар., 1975b; Miele и Krakowka, 1983). Неутрализујућа антитела и комплементом изазвана хуморална цитотоксичност чине критичне факторе за елиминацију слободних вирусних партикула и за предикцију клиничког исхода болести код јединки инфицираних штенећаком (Ho и Babiuk, 1980; Appel и сар., 1982, 1984). Неутрализујућа антитела спречавају унутарћелијско и ванћелијско ширење вируса. Међутим, изложеност антителима доводи до интернализације површинских антигена вируса и последично до њиховог нестанка са ћелијске мембране инфицираних ћелија. Тако, упркос спречавању ширења вируса, смањење и престанак експресије вирусних антигена може бити фактор који доприноси перзистенцији инфекције (Ho и Babiuk, 1980; Alldinger и сар., 1993b).

Након инфекције вирусом штенећака вирус специфични хуморални имуни одговор може се утврдити током целог живота, док се ћелијски имуни одговор може утврдити само током кратког периода (Appel и сар., 1982). Значај ћелијског имуног одговора код штенећака је потврђен доказивањем заштитног ћелијског имунитета при одсуству антитела (Gerber и Maron, 1976). Вакцинисани и инфицирани пси показују Т ћелијски специфични имуни одговор, независно од титра антитела (Krakowka и сар., 1987). Постојана антивирусна лимфоцитима посредована цитотоксичност одређује клинички исход код инфицираних паса. Јак ћелијски имунитет доводи до елиминације вируса, док је недостатак истог повезан са перзистенцијом вируса у ЦНС-у (Appel и сар., 1982). Ћелије природне убице (*natural killer cells, NK cells*, енг.) чини се имају малу улогу у одбрани домаћина од вируса штенећака (Ringler и Krakowka, 1985).

Механизми којима вирус штенећака доводи до имуносупресије резултат су дејства више фактора. Током акутне фазе штенећака лимфопенија се карактерише пролазном деплецијом $CD4+$ Т помоћних, $CD8+$ Т цитотоксичних и $CD21+$ Б ћелија у периферној крви. Смањен број имуних ћелија у циркулацији током штенећака може бити последица сметњи у стварању ових ћелија у примарним и секундарним лимфатичним органима као и апоптозе лимфоцита периферне крви. Програмирана ћелијска смрт се може утврдити у значајном броју неинфицираних лимфоцита што указује на постојање додатног механизма апоптозе који је

независан од вируса (Moro и сар., 2003а; Kumagai и сар., 2004; Schobesberger и сар., 2005). Према томе, механизми поред директно вирусом изазване апоптозе, као што је апоптоза изазвана активацијом *Fas* рецептора, узимају се у обзир као могући механизми смрти лимфоцита код инфекције вирусом штенећака (Moro и сар., 2003b; Schobesberger и сар., 2005; Kajita и сар., 2006). Преостали лимфоцити у периферној крви код паса инфицираних штенећаком показују изразито супримиран лимфопрлиферативни одговор на митогене (Krakowka и сар., 1975a). Постоје механизми оштећења имуних ћелија који не укључују директну вирусну инфекцију лимфоцита (Krakowka и сар., 1975a, 1980). Krakowka (1982) наводи могућност постојања популације моноклеарних супресорских ћелија које доводе до описане дуготрајне имуносупресије код штенећака.

Вирус штенећака омета функцију моноцита инхибицијом *IL-1* док је ослобађање простагландина *E2 (PGE2)* повећано код ове популације ћелија код виремичних паса (Krakowka и сар., 1987b). Поремећај презентације антигена од стране моноцита може допринети смањеној диференцијацији Б лимфоцита, стварању плазма ћелија и продукцији имуноглобулина (Krakowka и сар., 1987b). Имуномодулаторна способност хемаглутинаина вируса штенећака путем везивања за *Fc γ* рецептор (*CD32*) експримираног на Б лимфоцитима такође доводи до супресије неинфицираних ћелија (Kerdiles и сар., 2006). Смањена функција помоћних Т ћелија код перзистентно инфицираних паса можда доприноси поремећеном стварању герминативних центара и редуковању преласка са *IgM* на *IgG* (Winters и сар., 1983). Могуће је да хемаглутинин вируса штенећака индиректно има улогу на функцију Т ћелија ометањем презентације антигена дендритичних ћелија путем интеракције са *CD32* и последичним смањеним стварањем *IL-12*, као што је описано код вируса богиња (Schneider-Schaulies и Dittmer, 2006). Употребом рекомбинантног вируса штенећака код феретки је доказано да вирусни *V* протеин одржава умножавање вируса и деплецију Т ћелија. Вирусни *V* протеин је есенцијални антагонист интерферона и инхибитор одговора на цитокине код штенећаком инфицираних феретки (von Messling и сар., 2006). Непостојање мерљиве експресије цитокина у лимфоцитима периферне крви је у вези са великим оптерећењем вирусом и виремијом, што указује да јака вирусна инфекција може супримирати стварање цитокина у лимфоцитима (Gröne и сар.,

1998). Изражена имуносупресија и смртни исход код феретки инфицираних вирусом штенећака повезани су са недостатком експресије цитокина у леукоцитима периферне крви. Поређења ради, преживеле феретке имају снажну и константну продукцију цитокина са почетним *Th-1* и касније *Th-2* подржаним имуним одговором (Svitek и von Messling, 2007).

2.6. Клиничка слика

Тежина обољења и исход инфекције варирају у великој мери између различитих врста и зависе од неколико фактора, као што су вируленција генотипа, узраст јединке домаћина и имуни статус. Почетни знаци инфекције су често суптилни и ретко се уочавају (Williams, 2001). Ако животиња развије јак имуни одговор не долази до клиничке манифестације болести. Процене су да 50-70 % инфекција вирусом штенећака код паса пролази супклинички (Green и Appel, 1990). Иако се углавном јавља код младих, штенећак се често дијагностикује и код одраслих јединки (Tipold и сар., 1992). Није уочена расна нити полна предиспозиција.

Према клиничким манифестацијама могу се разликовати катарална и нервна форма или њихова комбинација у оквиру акутне системске форме, и хронична нервна форма (Baumgärtner, 1993; Krakowka и сар., 1985). Поред тога јавља се низ различитих неубичајених манифестација, укључујући енцефалитис старих паса и болест тврдих шапа (Krakowka и сар., 1985; Baumgärtner, 1993; Moritz и сар., 2000).

2.6.1. Акутна форма болести

Акутно системско обољење се јавља 2-3 недеље након инфекције (Williams, 2001). Вирус наставља да се умножава и шири по организму изазивајући изражене клиничке симптоме, који обухватају грозницу, серозни до мукопурулентни исцедак из очију и носа, коњунктивитис, кашаљ, диспнеју,

апатију, анорексију, кожни осип, повраћање и дијареју (која може бити крвава) (Appel и сар., 1982; Winters и сар., 1983; Krakowka и сар., 1985). Током ове фазе инфекције вирус се налази у свим секретима и екскретима организма (Krakowka и сар., 1985). Нервни симптоми се могу јавити истовремено или 2-3 недеље након знакова системског обољења. Прогресивни су и разноврсни, варирају у зависности од регије мозга захваћене променама (Greene и Appel 1998). Углавном обухватају абнормално понашање, миоклонус, нистагмус, конвулзије, нападе, покрете жвакања, слепило, церебеларне и вестибуларне симптоме, парезу или парализу, инкоординацију и кретање у круг (Appel и сар., 1991; Williams, 2001; Koutinas и сар., 2002; Vandavelde и Zubriggen, 2005; Amude и сар., 2007). Инфекција ЦНС-а резултира акутном демиелинизацијом и већина животиња угине 2-4 недеље након инфекције (Winters и сар., 1983; Appel и сар., 1984). Као последица имуносупресивног дејства вируса штенећака, клиничка слика је углавном погоршана секундарном бактеријском инфекцијом коже и респираторног система (Krakowka и сар., 1985; Greene и Appel, 1990). Инфекција током раних развојних фаза, пре избијања сталних зуба, може довести до инфекције амелобласта доводећи до хипоплазије глеђи (Dubielzig и сар., 1981; Bittegeko и сар., 1995).

У зависности од степена и брзине опоравка имуног система животиња брзо може постати морибундна или се опоравити након благе или супклиничке болести. Између се налазе животиње које опорављају споро и парцијално, са тенденцијом развоја хроничне болести и прогресијом демиелинизујућих лезија као последицом имунопатолошких реакција (Vandavelde и сар., 1981, 1982).

2.6.2. Хронична форма болести

У појединим случајевима побољшање имуног одговора, посебно повећано стварање вирус специфичних неутрализујућих антитела, може довести до опоравка животиње. Ипак, упркос елиминацији вируса из периферне крви и већине унутрашњих органа, вирус може перзистирати у одређеним ткивима укључујући дужицу, ЦНС, лимфатичне органе и јастучиће шапа (доводећи до хиперкератозе) (Appel, 1970, 1987; Zubriggen и сар., 1995a,b; Greene и Appel, 1998;

Gröne и сар., 2003а; Schobesberger и сар., 2005). Код неких животиња се јавља касна прогресија болести. Као последица перзистенције вируса у ЦНС-у јављају се видљиви клинички симптоми обољења ЦНС-а као последица нервне форме штенећака. Пси са нервним симптомима углавном угину али се неки опораве и до краја живота могу показивати резидуалне знаке болести као што је перзистентни миоклонус (Beineke и сар., 2009). Нервни симптоми као последица штенећака се могу јавити много касније (месецима и годинама) након системске инфекције као „постинфективни енцефалитис“ (Tipold и сар., 1992).

Нервни симптоми код штенећака варирају у великој мери. Клинички знаци углавном осликавају дистрибуцију вируса и последичних лезија у ЦНС-у. Клиничко-патолошка корелација често недостаје код нервне форме. Клиничким прегледом се углавном утврди постојање фокалне лезије, али су хистолошки лезије најчешће мултифокалне. Некада су знаци обољења кичмене мождине са парезом и атаксијом једини неуролошки симптоми (Tipold и сар., 1992). Неуролошки симптоми укључују знаке вестибуларне болести (кривљење главе, нистагмус, тенденција ка падању, дефицити кранијалних нерава и свесне проприоцепције) и поремећаја малог мозга (атаксија са хиперметријом и клаћењем главе), ареактивност на надражаје, изостанак страха од људи код дивљих животиња, наслањање главе на предмете (*head pressing*, енг.), интермитентне „*petit*“ и „*grand mal*“ епилептиформне нападе (Seimon и сар., 2013; Beineke и сар., 2015). Једнострано или обострано слепило, некада са дилатираним дужицама, узроковано је оштећењем оптичких нерава, отоком оптичког диска или запаљењем мрежњаче. Ретко, може се видети генерализована мишићна атрофија као последица фокалних лезија коре великог мозга (Tipold и сар., 1992). Миоклонус, ритмичко подрхтавање једног или групе мишића, је чест знак штенећака код паса и налази се у 40% случајева, захватајући углавном мишиће ногу и главе, ређе трупа. Иако се некад сматра патогномоничним за штенећак, миоклонус се среће и код других инфламаторних болести. Патогенеза миоклонуса остаје неоткривена иако експерименталне студије сугеришу на фокалне лезије кичмене мождине. Друга могућност је да лезије базалних једара иницирају овај симптом стварајући „пејсмејкер“ у кичменој мождини или мозданом стаблу (de Lahunta, 1983).

Штенећак се може јавити заједно са другим инфекцијама ЦНС-а (Green и Appel, 1990). Јака имуносупресија изазвана овим вирусом може довести до активације латентних протозоалних инфекција, пре свега врстама *Toxoplasma gondii* и *Neospora caninum*. У овим случајевима се поред нервних симптома често среће и изражен миозитис (Wolf и сар., 1991).

Клиничка слика штенећака код дивљих животиња умногоме одговара оној код домаћих паса (Loots и сар., 2017). Код природних инфекција дивљих популација лисица углавном се приметне поремећаји у понашању са губитком страха од људи и дезоријентисаност (Origgi и сар., 2012).

2.7. Патоморфолошке промене

Ширење вируса доводи до тога да се вирусни антигени и последичне лезије, укључујући цитоплазматске и интрануклеарне инклузије, могу наћи у многим ткивима и органима.

Генерализована деплеција лимфатичних органа и последична имуносупресија представљају једну од првих манифестација штенећака (Krakowka и сар., 1975a; Krakowka, 1982). Респираторне манифестације обухватају серозни до мукопурулентни ринитис, интерстицијалну пнеумонију и некротизујући бронхиолитис, који се често компликују гнојном бронхопнеумонијом услед секундарне бактеријске инфекције (Caswel и Williams, 2007). Код неких животиња се јавља дифузна хиперплазија алвеоларних ћелија типа 2 са стварањем цитоплазматских и једарних вирусних инклузионих телашаца (Seimon и сар., 2013). Инфекција црева доводи до катаралног ентеритиса са деплецијом Пајерових плоча (Krakowka и сар., 1985; Greene и Appel, 1998; Decaro и сар., 2004). Код природно инфицираних паса може се јавити егзантем штенећака - пустуларни дерматитис унутрашње стране бутине, вентралног абдомена и унутрашње стране ушне шкољке. Хистолошки се уочавају хипер- и паракератоза са стварањем везикула и пустула као и мултиједарне циновске ћелије (Baumgärtner, 1993; Maeda и сар., 1994). Болест тврдих шапа представља

ретку кутану манифестацију штенећака и карактерише се хиперкератозом јастучића шапа и носне печурке (Moritz и сар., 2000). Иако је патогенеза ове необичне манифестације и даље непозната, изгледа да вирус изазива поремећај у диференцијацији кератиноцита и истражује се да ли је епидермална инфекција такође последица ограничене вирусне инфекције (Gröne и сар., 2003b, 2004a). Услед инфекције амелобласта током развоја сталних зуба вирус доводи до хипоплазије глеђи (Dubielzig и сар., 1981; Bittegeko и сар., 1995).

Код младих паса при системској форми штенећака долази до перзистирања примарне спонгиозе у метафизама дугих костију што је познато као метафизеална остеосклероза (Baumgärtner и сар., 1996). Претпоставља се да је последица некрозе остеокласта услед инфекције вирусом што спречава ремоделирање костију и последично перзистирање спонгиозе. Истиче се морфолошка сличност између ових лезија изазваних вирусом штенећака и Пагетове болести костију људи и постоје претпоставке о заједничкој етиологији (Gordon и сар., 1991, 1992; Мее, 1999). Ипак услед другачијих резултата неки не подржавају овакво мишљење (Ralston и сар., 1991; Helfrichet и сар., 2000; Ooi и сар., 2000).

Код лисица се морфолошки уочава конјунктивитис, пустуларни дерматитис, лимфохистиоцитни полиоенцефалитис и бронхоинтерстицијална пнеумонија са појавом вирусних инклузионих телашаца и синцицијалних ћелија (Origgi и сар., 2012).

2.7.1. Патолошке промене код нервне форме штенећака

Макроскопске промене на мозгу код инфекције вирусом штенећака се ретко срећу. У акутној форми може се уочити конгестија крвних судова менинги, а врло ретко и дилатација комора као последица повећаног притиска цереброспиналне течности услед едема. У хроничној форми некада се могу уочити некрозе и кавитације у белој маси као последица хроничне инфламације (Green и Vandavelde, 2012).

Иако постоје варијације између појединих генотипова вируса штенећака и лезија које они изазивају (Summers и сар., 1984) у већини случајева природног

штенећака вирус изазива мултифокалне лезије како у сивој тако и белој маси ЦНС-а (Summers и сар., 1995).

Полиоенцефалитиси, укључујући енцефалитис старих паса, енцефалитис са инклузионим телима и поствакцинални енцефалитис, су ретка манифестација инфекције вирусом штенећака и најчешће су локализовани у кортикалним подручјима и једрима možданог стабла. Неурони и протоплазматски астроцити представљају доминантну захваћену популацију ћелија (Nesseler и сар., 1999). Хистолошки, лезије се састоје од некрозе неурона и неуронофагије са инфилтрацијом микроглија ћелија/макрофага и Т лимфоцита, периваскуларним инфилтратима и интрануклераним инклузијама у неуронима и астроцитима (Nesseler и сар., 1997). Студије које се баве патогенезом полиоенцефалитиса код штенећака подржавају хипотезу о ограниченој инфекцији сиве масе као механизму вирусне перзистенције (Nesseler и сар., 1999). У мозгу великих мачака недостају типичне лезије беле масе, али се може видети лимфоцитни менингоенцефалитис са интензивном малацијом у možданом стаблу, малом мозгу и таламусу. Вирусна инклузиона тела и вирусни антигени се могу утврдити у глија ћелијама и неуронима малатичних подручја (Seimon и сар., 2013).

За разлику од полиоенцефалитиса, ДЛ представља најчешћу манифестацију нервне форме штенећака. Због сличности штенећак представља користан модел за проучавање патогенезе хуманих демиелинизујућих имунски посредованих обољења укључујући мултиплу склерозу (Baumgärtner и Alldinger, 2005).

Лезије код ДЛ-а се налазе у белој маси малог и, нешто ређе, великог мозга и у кичменој мождини (Baumgärtner и сар., 1989; Bathen-Nöthen и сар., 2008). Промене су најчешће присутне у проводним сноповима у близини možданих комора, унутар велума малог мозга, педункулима малог мозга и оптичком тракту (Summers и Appel, 1994). Промене се могу окарактерисати као акутне, субакутне неинфламаторне, субакутне инфламаторне, хроничне и склеротичне лезије (McCullough и сар., 1974a,b; Raine, 1976; Summers и сар., 1979; Higgins и сар., 1982; Krakowka и сар., 1985; Summers и Appel, 1987; Gaedke и сар., 1999). Неколико различитих типова плакова се може наћи истовремено у мозгу оболелих

паса (Baumgärtner и сар., 1989; Alldinger и сар., 1993a,b; Gaedke и сар., 1999; Wünschmann и сар., 1999).

Настанак плакова је интензивно проучаван код природно и експериментално инфицираних паса (McCullough и сар., 1974a,b; Raine, 1976; Summers и сар., 1979; Higgins и сар., 1982; Summers и Appel, 1987). Акутне лезије се састоје од фокалне вакуолизације беле масе, благе глиозе са мало активираних астроцита и макрофага/микроглија ћелија. Код експериментално инфицираних паса примарне промене као што је вакуолизација услед интрамијелинског едема субпендимске и субпијалне беле масе се уочавају већ после 24 дана. Ове вакуоле расту бројчано и у величини и формирају демиелинизујући плак са микроглиозом, астроглиозом и појавом вишеједарних циновских ћелија. Мононуклерани инфилтрат се ретко јавља у овој почетној фази. Ремиелинизација огољених аксона је редак догађај код старијих демиелинизујућих лезија (Wisniewski и сар., 1972; McCullough и сар., 1974b; Raine, 1976; Higgins и сар., 1982; Summers и Appel, 1987). Последичне инфламаторне промене се карактеришу прогресивном периваскуларном мононуклераном инфилтрацијом. Склеротичне промене, такозвани „*burned out*“ плакови, састоје се од астроцитних ожиљака сачињених од изоморфне астроглиозе (Vandeveldelde и сар., 1981, 1982). Упркос јаком вирус специфичном имуном одговору ране лезије без приметне инфламације могу се видети у близини хроничних лезија са израженом инфламацијом и смањеном или непостојећом вирусном експресијом (Alldinger и сар., 1993b). Ипак, скорашња имунохистохемијска испитивања показују присуство имуних ћелија већ у акутним и субакутним неинфламаторним лезијама указујући да оваква подела ДЛ-а представља произвољан приступ класификацији плакова код штенећака (Tipold и сар., 1999; Wünschmann и сар., 1999).

2.8. Дијагноза, терапија, вакцинација и превенција

Постављање дијагнозе штенећака може бити изазов јер велики број болести узрокује настанак симптома који личе на ову болест. Постоје различите

дијагностичке методе којима се може доказати штенећак.

Клиничка дијагноза се може поставити користећи неколико метода. Крвна слика код инфекције штенећаком се карактерише апсолутном лимфопенијом услед лимфоцитне деплеције, некрозе и апоптозе (Green и Appel, 2006; Pardo, 2006), некада у комбинацији са леукопенијом, анемијом, моноцитозом и ретко тромбоцитопенијом (Greene и Appel, 1990). Биохемијски налази нису специфични и ретко су корисни у дијагностици ове болести. Идентификација инклузија у лимфоцитима, моноцитима, неутрофилним гранулоцитима и еритроцитима ради се бојењем размаза периферне крви *Wright-Leishman* методом (Greene и Appel, 1998). Идентификација инклузија је битна за дијагнозу штенећака, али њихова појава није патогномонична (López-Reña и сар., 1994).

Радиографска идентификација вирусне пнеумоније може бити од користи, као и различити серолошки тестови (имуноензимски тест, директна и индиректна имунофлуоресценција, серум неутрализациони тест, имунофлуоресцентне технике откривања вирусних антигена, итд.), али већина има значајна ограничења и некада може показивати лажно позитивне резултате (Pardo, 2006). Друге антемортем дијагностичке технике обухватају анализу цереброспиналне течности, изолацију вируса и методе засноване на детекцији вирусне нуклеинске киселине, као што су методе базиране на ланчаној реакцији полимеразе (*polymerase chain reaction, PCR*, енг.) (Greene и Appel, 2006).

Тестом имунофлуоресценције (*immunofluorescence assay, IFA*, енг.) може се заживотно утврдити присуство антигена вируса у десквамисаним ћелијама конјунктиве, лимфоцитима периферне крви, ћелијама седимента урина, епителним ћелијама респираторног система, ћелијама цереброспиналне течности, и узорцима добијеним биопсијом јастучића шапа и носа када је присутна хиперкератоза ових делова. Овај тест је најмеродавнији унутар прве три недеље од инфекције у акутној фази (Kapil и Yeary, 2011). Присуство *IgM* у серуму се може мерити имуноензимским тестом (*enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*, енг.), при чему висок титар указује на скорашњу инфекцију или вакцинацију и може трајати и до три месеца после инфекције. Титар *IgG* антитела у серуму се мери као вредности титра у два узорка узета у размаку од 14 дана и код

невакцинисаних јединки пораст титра указује на инфекцију. Повећање вредности титра веће од 4 пута указује на инфекцију и код раније вакцинисаних животиња. Утврђивање присуства антитела у ЦСТ-и сигурно говори о инфекцији јер антитела индукована вакцинацијом не пролазе крвно-мождану баријеру (Kapil и Yeary, 2011). Изолација вируса у култури ћелија може потрајати и до три недеље. Новије континуиране ћелијске линије као што су *Vero* ћелије које експримирају *SLAM* рецепторе паса могу дати резултате унутар неколико дана (Tatsuo и сар., 2001; Seki и сар., 2003). Ланчана реакција полимеразе може утврдити присуство вируса у респираторним секретима, ЦСТ-и, фецесу, урину, пуној крви, и брисевима ока и конјунктиве. Негативан резултат не искључује штенећака (Kapil и Yeary, 2011).

Проблем у серолошкој дијагностици представља чињеница да позитиван резултат не прави разлику између природно створених антитела и антитела насталих вакцинацијом. Имунизација модификованом живом вакцином интерферира са резултатима серолошких тестова око 3-4 недеље показујући лажно позитиван резултат (Kapil и Yeary, 2011). Постоји један серотип вируса штенећака, па се генотипови не могу разликовати коришћењем класичних серолошких техника употребом поликлонских антитела (Harder и Osterhaus, 1997). Тестови ланчане реакције полимеразе су дизајнирани да амплификују делове *H*, *F*, *M* или *N* гена да докажу присуство РНК вируса штенећака (Kapil и Yeary, 2011). Потпуна идентификација соја и диференцијација између вакциналног и дивљег соја захтева примену секвенцирања и амплификације региона *H* гена (Kapil и сар., 2008).

За постморталну хистопатолошку дијагностику након обдукције узимају се узорци слезине, тонзила, лимфних чворова, желуца, бубрега, плућа, дуоденума, мокраћне бешике и можданог ткива који се обрађују стандардним методама и боје конвенционалним бојама, имунофлуоресцентним антителима или имунохистохемијски моноклонским антителима. Употреба имунохистохемије за идентификацију антигена вируса штенећака у парафинским исечцима једна је од најкориснијих метода за постављање дефинитивне дијагнозе (Hewicker и сар., 1990). Респираторни и епител дигестивног система су се показали као најприкладнија места за детекцију антигена вируса штенећака (López-Reña и сар., 1994).

Тренутно не постоји специфична терапија против штенећака. Потпорном антибиотском терапијом се спречавају секундарне бактеријске инфекције. Оболеле животиње треба ставити у чист, миран простор. У случају постојања симптома обољења дигестивног система (дијареја, повраћање) успоставља се надокнада течности и лекови против повраћања. Ублажавање нервних симптома се постиже применом антиепилептичних лекова и глукокортикостероида (Greene и Appel, 2006). Апликација хиперимунних серума се врши у раним фазама болести (Greene и Appel, 2006).

Проучавање патогенезе лезија ЦНС-а код штенећака служи као основа за развој стратегија терапије, посебно на нивоу имуномодулације и/или реактивације олигодендроцита из прогениторског ћелијског пула, чак и код хроничних демиелинизованих лезија. Иако постоје помаи на нивоу модификације штетног инфламаторног одговора, основни проблем остаје перзистенција вируса унутар ЦНС-а (Schobesberger и сар., 2002).

Постоји неколико вакцина које се данас рутински користе у превенцији болести код паса. Највећи део вакцина су пореклом од *America* - 1 и - 2 генотипа (Martella и сар., 2007; Demeter и сар., 2010). Највише се користе атенуиране вакцине које садрже модификовани живи вирус (*modified live virus, MLV*, енг.) и то сојеви *Onderstepoort, Snyder Hill, Lederle, Rockborn*. Ови вакцинални сојеви су изоловани још тридесетих година прошлог века и не зна се да ли још увек циркулишу у природи јер нису откривени дужи низ година (Martella и сар., 2007; Schatzberg и сар., 2009).

Вакцине против штенећака изазивају дуготрајан имунитет код паса (Schultz и сар., 2010). Имуитет у трајању од три године утврђен је и код атенуиране и код рекомбинанте вакцине против штенећака (Larson и сар., 2007). Употреба рекомбинантних ДНК вакцина пореклом од секвенци вирулентног генотипа вируса индукује и хуморални и ћелијски имуни одговор против антигена вируса (Cherpillod и сар., 2000). Ипак, иако су значајно довеле до смањене појаве болести, поједине вакцине не пружају адекватну заштиту против нервне форме штенећака (Tipold и сар., 1996) док друге могу изазвати поствакцинални енцефалитис (Hartley, 1974; Cornwell и сар., 1988).

Постоје мишљења да су нове генетске варијанте вируса повезане са променама у патогенези и избегавању имуног система код паса који су вакцинисани постојећим вакцинама (Martella и сар, 2006). Структурне варијације у резидуама кључних аминокиселина *H* и *F* протеина могу изменити интеракцију између ових протеина током везивања и фузије са пријемчивим ћелијама доводећи тако до промена у антигености, вируленцији и тропизму постојећих варијанти вируса (Lee и сар., 2010; Sawatsky и von Messling, 2010).

Ефективна антивирусна терапија против морбилivirusа није доступна па се најважнија улога придаје превенцији. Обухваћеност вакцинацијом од 95% је потребна за контролу ове болести код паса (Rikula и сар, 2007). Најбоље средство за прекид циркулације вируса између пријемчивих популација дивљих животиња и паса је вакцинација паса и спречавање њиховог слободног лутања и контакта са невакцинисаним псима и животињама које могу излучивати вирус (Kapil и Yeary, 2011). Вакцинација угрожених врста дивљих животиња пријемчивих на штенећак је битна за успех програма опоравка популација. Такви су примери вакцинације рекомбинантним вакцинама црноноге феретке и лисица са острва Санта Каталина (Clifford и сар., 2006; Kapil и Yeary, 2011). Орална вакцинација мамцима је у употреби за контролу беснила, док за контролу штенећака овакве вакцине нису тренутно доступне (Kapil и Yeary, 2011). Највећи проблеми у стварању ефикасне оралне вакцине за штенећак представља постизање адекватног мукозног имуног одговора у цревима и превазилажење интерференције са матерналним антителима код јувенилних јединки (Kapil и Yeary, 2011). Индукција локалног имунитета на слузницама употребом различитих рекомбинантних вакцина против штенећака испробана је код феретки (Welter и сар., 1999, 2000). Иако је интрамускуларна и интраназална апликација у потпуности успела, интрадуоденална вакцинација показала је ефикасност од само 60% (Welter и сар., 1999), док ниједан облик апликације није био заштитни код постојања матерналних антитела (Welter и сар., 2000). И када би произвели ефикасан метод оралне вакцинације дивљих животиња против штенећака, свеобухватна вакцинација паса ће и даље бити примарни метод контроле ове болести (Kapil и Yeary, 2011). Услед глобалне дистрибуције вируса штенећака и широког спектра пријемчивих врста мало је вероватна - ерадикација вируса.

2.9. Штенећак код лисица

Иако се о штенећаку највише сазнало проучавањем природне и експерименталне инфекције код паса, постоји и одређени број радова у литератури који описује ову болест код дивљих животиња. У највећем броју случајева ради се о серолошким доказивањима присуства антитела против вируса штенећака код различитих врста дивљих месоједа у оквиру епизоотиолошких испитивања. Нека од тих испитивања баве се и различитим врстама лисица.

Amundson и Yuill (1981) нису установили присуство антитела против вируса штенећака код сивих лисица у Висконсину, САД. McCue и O'Farrel (1988) утврђују присуство антитела у серуму 14% испитаних малих (ушатих) лисица са подручја Сан Хоакин долине у Калифорнији.

Ballard и сар. (2001) испитујући присуство антитела против вируса штенећака у серуму арктичких лисица као и присуство вируса тестом флуоресценције узорака нервног ткива нису нашли доказе о постојању инфекције овим вирусом. Ипак сами аутори наводе два могућа разлога за добијање оваквих резултата - услед великог процента младих животиња (89%) обухваћених испитивањем није дошло до излагања ових животиња вирусу или да је од контакта са вирусом до узорковања прошло сувише мало времена да би се развила мерљива имунска реакција или адекватна репликација вируса у нервном ткиву. Серолошка испитивања андских и јужноамеричких сивих лисица у Аргентини показала су укупну серопреваленцију од само 3,6%, при чему су све три позитивне јединке припадале сивим лисицама док од 28 испитаних јединки андске лисице нити једна није показала мерљив титар антитела против вируса штенећака (Martino и сар., 2004). Тражећи могуће објашњење за овако низак проценат серопреваленције, аутори сугеришу да или вируса нема у великој мери у испитиваној области или се ради о јединкама које нису биле у конктакту са вирусом, позивајући се на наводе у литератури да штенећак код појединих врста лисица има велики морталитет (Davidson и сар., 1992; Martino и сар., 2004).

Gese и сар. (2004) испитивањем узорака серума преријских лисица у Колораду серум неутрализационом тестом (*serum neutralization test, SNT*, енг.) утврђују преваленцију од 5% код одраслих и 0% код младих јединки (млађих од 9 месеци старости) при чему су и овде све серопозитивне јединке биле женке. Позивајући се и на радове других аутора (Olson и Lindzey, 2002; Karki, 2003) који наводе примере угинућа преријских лисица услед штенећака, закључују да је штенећак једини од испитиваних инфективних агенаса који је довео до угинућа лисица описаних у овом раду (Gese и сар., 2004).

Група аутора испитујући узроке наглог пада бројности острвске лисице са острва Санта Каталина у Калифорнији открива позитивне вредности титра антитела код 87% испитаних животиња свих старосних категорија (Timm и сар., 2009). Обдукцијом уинулог младог мужјака налазе знакове пнеумоније и лимфаденопатије, док је хистопатолошки налаз обухватао некротичну бронхопнеумонију, налаз интрацитоплазматских и интрануклеарних еозинофилних инклузија у бронхијалним епителним ћелијама, лимфоцитима, хистиоцитима, ћелијама епидидимиса, епителу јастучића шапа, уретре и ћелијама сржи надбубрега. Наспрам изражене лимфатичне хиперплазије у лимфним чворовима утврђена је лимфоцитолита у слезини и деплеција лимфоног ткива крајника. Мозак није био доступан за преглед. Штенећак је потврђен имунохистохемијским методама (моноклонским антителом на нуклеопротеин вируса штенећака) са јаком позитивном реакцијом у бронхијалним епителним ћелијама, лимфоцитима и епителним ћелијама које су формирале синцицијум, као и молекуларним методама употребом ланчане реакције полимеразе (Timm и сар., 2009). Поред бронхопнеумоније изазване вирусом штенећака код ове јединке као узрок угинућа наведена је и токсоплазмоза. Екстраполацијом добијених резултата аутори сугеришу да је само 5% популације острвских лисица са Санта Каталине преживело епизоотију (Timm и сар., 2009).

Ferreira и сар. (2009), употребом теста директне имунофлуоресценције, доказују присуство вируса штенећака у нервном ткиву лисице крабоједа у Аргентини. Одрасли мужјак ове врсте је пронађен са израженим нервним симптомима укључујући парезу, аутомутилацију, покрете жвакања и абнормално понашање. Исте године група аутора из Бразила доказује да је женка лисице

крабоједа са знацима генерализованог миоклонуса угинула од штенећака (Megid и сар., 2009). Хистопатолошки налаз показује интерстицијалну пнеумонију са конгестијом и едемом, фокални емфизем, ателектазу и поља крвављења, мултифокалну инфилтрацију ћелијама запаљења и вишеједарним ћелијама са пролиферацијом пнеумоцита, мултифокалном коагулационом некрозом, лимфатичном некрозом у слезини, и демиелинизацијом, малацијом, дегенерацијом и местимичном глиозом у различитим деловима централног нервног система. Присуство вируса употребом теста флуоресценције и *RT-PCR* (*reverse transcriptase PCR*, енг.) доказано је у свим испитаним узорцима што говори о дисеминованој инфекцији. Филогенетска испитивања сугеришу да су пси -извор инфекције као и да се генотип разликује од вакциналног (Megid и сар., 2009). Fiorello и сар. (2007) не проналазе серолошке доказе о инфекцији ове врсте лисица вирусом штенећака, али утврђују присуство антитела код пампаске лисице са истог подручја. У дискусији сугеришу да су можда лисице крабоједи мање пријемчиве на ову вирусну инфекцију или јако пријемчиве са смртним исходом и малом вероватноћом да преживе и произведу антитела, позивајући се на друга два аутора који тврде да сива и црвена лисица са подручја југоистока Сједињених Држава, иако живе на истом подручју, поседују велике разлике у пријемчивости на вирус штенећака – сиве су јако пријемчиве док црвене нису (Davidson и Nettles, 1997).

Megid и сар., (2010) описује по први пут случај штенећака код сребрне лисице. Клиничким прегледом констатују дехидрираност и отежано дисање, носни и очни исцедак, тетрапарезу, миоклонус и дијареју. Крвна слика показује лимфопенију и тромбоцитопенију као и присуство интрацитоплазматских инклузија на крвном размазу. На обдукцији се уочава пнеумонија. Хистопатологија открива грануломатозни менингоенцефаломијелитис, мултифокалне спонгиформне промене и глиозу беле масе малог мозга у непосредној близини четврте мождане коморе, конгестију плућа, вакуолизацију јетре, гломерулонефритис и инклузије у епителним ћелијама мокраћне бешике (Megid и сар., 2010). Штенећак је потврђен ланчаном реакцијом полимеразе доказивањем вирусне РНК из узорака мозга и плућа. Након филогенетске анализе генетског материјала аутори закључују да су извори инфекције вероватно пси

(Megid и сар., 2010). Серолошка испитивања (*SNT*) преријских и малих (ушатих) лисица са запада Сједињених Америчких Држава показују релативно низак проценат животиња које су биле у контакту са вирусом штенећака (13%) (Miller и сар., 2000). Ниску преваленцију аутори објашњавају кратким преживљавањем вируса у спољашњој средини и потребом за блиским контактом да би дошло до преноса инфекције.

У Аргентини је описан случај штенећака код пампаске сиве лисице (Giannitti и сар., 2012). Одрасла женка је примећена са знацима изражене инкоординације и слепилом, и због лоше прогнозе еутаназирана. Обдукција је показала само промене на плућима у виду мултифокалних светло-црвених до беличастих неправилних поља и гумасту до чврсто-еластичну конзистенцију плућног паренхима. Изражена дифузна субакутна некротизујућа бронхоинтерстицијална пнеумонија са хиперплазијом пнеумоцита типа 2 и стварањем синцицијума у алвеолама је утврђена микроскопски. У овим и епителним ћелијама бронхиола мултифокално су се уочавале овалне до округле хомогене еозинофилне интрацитоплазматске, ређе интрануклеарне, инклузије величине - 3-5 μ m. На другим органима није било значајних патолошких промена. Имунохистохемијски позитиван грануларни материјал, доминантно интрацитоплазматски, је запажен у епителним ћелијама бронхиола, ћелијама синцицијума, алвеоларним макрофагима, као и пнеумоцитима типа 1 и 2 (Giannitti и сар., 2012). Животиња је истовремено била инфицирана и са *Hepatozoon spp.*, али аутори сматрају да је клиничка слика била изазвана првенствено штенећаком.

Група аутора у Индији (Belsare и сар., 2014) истражујући изложеност индијских лисица вирусом штенећака одређује титре *IgG* и *IgM* у серуму употребом имуноензимског (*ELISA*) теста. Добијени резултати показују серопреваленцију од 18% (22% код мужјака и 13% код женки). При томе, код 5 јединки (15%) утврђују присуство *IgM*, што указује да се ради о тренутној или скорашњој инфекцији (Blixenkronе-Møller и сар., 1991). Три од ових пет јединки су угинуле у року од месец дана, што говори о високом морталитету код инфекције вирусом штенећака и може објаснити релативно ниску серопреваленцију у односу на испитане псе из исте области (Belsare и сар., 2014).

Pore и сар. (2016) доказују присуство вируса штенећака код сивих лисица и ракуна. Присуство антитела је утврђено код 74% испитаних јединки, при чему 86% код оних са клиничким знацима болести и 55% код клинички здравих јединки. Међутим, аутори дају ове податке збирно за обе врсте, не наводећи колика је преваленција само код сивих лисица. Ни овде није утврђена полна предиспозиција. Клинички знаци, макроскопске и хистолошке промене су сличне код обе врсте (Pore и сар., 2016). Клинички знаци варирали су у интензитету и обухватали су респираторне (носни исцедак) и/или нервне симптоме (конфузија, измењено понашање, шкљоцање зубима). Макроскопски утврдили су исцедак из носа и/или очију, пнеумонију, ендо- и ектопаразите, док неке од јединки нису показивале макроскопски видљиве промене. Микроскопски, уочили су инклузије у уротелу (већином интрацитоплазматске), мозгу (углавном интрануклеарне у астроцитима) и плућима (и интрануклеарне и интрацитоплазматске), затим синцицијалне ћелије, глијалне чвориће, микроглиозу, благи лимфоплазмоцитни периваскуларни енцефалитис, пнеумоније (еозинофилну до грануломатозну, грануломатозну до пиогрануломатозну, интерстицијалну), фиброзу јетре, миокардитис (некротизујући еозинофилни и лимфоцитни) и благу инфламацију паренхима бубрега. Чест налаз чинили су паразити: токсоплазма у разним органима, ларве метастронгилида у плућима, и метиљи у јетри (Pore и сар., 2016). Аутори потврђују присуство вируса молекуларним методама (*real-time RT-PCR*, енг.) при чему утврђују да се ради о различитом генотипу од до тада описаних предлажући назив *America-4*. У закључку подвлаче да је код више од половине испитаних животиња утврђено присуство вируса или антитела, да су промене сличне оним описаним код паса и других дивљих месоједа, као и да услед имуносупресивног деловања вируса лакше долази до паразитске инфекције и развоја промена које иначе нису карактеристичне за штенећак (Pore и сар., 2016).

Stimmelmayer и сар. (2018) описују налаз липидне пнеумоније (*lipid pneumonia*, енг.) код арктичких лисица на Аљасци у вези са морбилivirusном инфекцијом. Ни код једне од 24 испитане лисице различите старости нису уочене макроскопске промене док је хистолошки код неких од њих била присутна липидна пнеумонија са појавом макрофага испуњених липидима у алвеолама и мањим бројем лимфоцита и плазма ћелија, затим лимфоцитна деплеција са

местимичном лимфоцитозом, задебљањем зида алвеола и хиперплазијом пнеумоцита типа 2. Такође, уочено је формирање синцицијума у лимфним чворовима. Позитивна имунохистохемијска реакција на присуство антигена вируса штенећака доказана је код 5 од 6 испитаних јединки и то у ткиву плућа, мезентеријалном лимфном чвору, слезини, бубрежним ћелијама и абдоминалном масном ткиву. Од 5 позитивних јединки 4 су биле младунци млађи од 3 месеца и једна одрасла женка. Инфекција вирусом штенећака доказана је и молекуларним методама (*RT-PCR*) (Stimmelmayr и сар., 2018).

Осмогодишње истраживање на арктичким лисицама са Свалбарда показује преваленцију антитела против штенећака од 11% (варирајући од 4 до 25% током различитих година) што говори да је и на овом подручју вирус ензоотског карактера (Tryland и сар., 2018).

Велики број радова се бави испитивањем црвених лисица, код којих, за разлику од сивих, Amundson и Yuill (1981) утврђују присуство антитела против штенећака код 11% јединки у истој области.

López-Reña и сар. (1994) описују хистопатолошке и имунохистохемијске промене код седам црвених лисица оболелих од штенећака (1 дивљу и 6 из заточеништва). Све животиње су показивале знаке респираторног обољења. Макроскопски уочен је колапс плућа, увећани трахеобронхални лимфни чворови, мукопурулентни очни исцедак и хиперкератоза јастучића шапа. Пет јединки имало је ексудативну фибринозну пнеумонију различитог интензитета. Хистолошки, уочена је интерстицијална пнеумонија са инфилтрацијом алвеоларних септи мононуклеарним ћелијама док су алвеоле биле испуњене макрофагима, лимфоцитима и десквамисаним алвеоларним ћелијама. Такође, била је присутна и хиперплазија алвеоларног епитела и појава хијалиних мембрана у лумену алвеола. Перибронхијално, перибронхиоларно и периваскуларно често се уочавао мононуклеарни инфилтрат. Еозинофилне интрацитоплазматске инклузије су биле присутне у епителним ћелијама душника, бронхија, бронхиола, као и макрофагима у ексудату код 4 јединке. Величина и број је варирао, док се периферни хало лако уочавао. Доминантна лезија код свих животиња био је демиелинизујући енцефалитис, посебно изражен око четврте

мождане коморе. Била је присутна конгестија менингеалних крвних судова. Ипак, аутори нису приметили периваскуларни инфилтрат. У слезини и лимфним чворовима уочавала се лимфоцитна деплеција. Инклузије су биле присутне у циркулишућим макрофагима, епителу мокраћне бешике, епителу бубрежне карлице, тубулоцитима, и епителним ћелијама жучних канала. Имунохистохемијски позитиван материјал се уочавао као смеђе до тамно смеђе грануле дифузно распоређене у цитоплазми и, ретко, у једру. Оваква реакција видела се и у ћелијама у којима су уочене инклузије. Позитивна реакција је била присутна код свих животиња у епителним ћелијама респираторног система. Поред тога, антиген вируса је идентификован у ћелијама бронхијалних жлездица, епендимским ћелијама, глијалним ћелијама, ендотелним ћелијама, ћелијама бубрежне карлице, епителним ћелијама желуца и црева, мезангијалним ћелијама бубрега, епителним ћелијама трећег очног капка, хепатоцитима и циркулишућим макрофагима (López-Reña и сар., 1994).

Имунохистохемијска испитивања на узорцима мозга 90 лисица у Немачкој нису показала присуство антигена вируса штенећака (van Moll и сар., 1995). У истој студији испитано је и 146 јединки из фамилије мустелида са истог географског простора, при чему је код 37% утврђено присуство вируса штенећака а код 45% од укупног броја позитивних хистолошки су биле присутне промене карактеристичне за акутну фазу болести (van Moll и сар., 1995).

Frölich и сар. (2000) испитивањем серума (*SNT*) црвених лисица у Немачкој показују преваленцију антитела против штенећака од 5% (30 од 591), и то 10% у градским, 3,5% у приградским и 0% у сеоским срединама. Значајна разлика у процентима између појединих средина сугерише да се дивље животиње у природи могу инфицирати при контакту са псима. При томе, молекуларна испитивања (*RT-PCR*) су између осталог показала присуство вирусне РНК и у узорцима који су потицали од серолошки негативних јединки. Такође, резултати су показали да су секвенце изолата вируса пореклом од црвених лисица врло сличне секвенцама вакциналног соја вируса штенећака (Frölich и сар., 2000). Аутори на крају закључују да резултати истраживања подржавају концепт трансмисије вируса штенећака између паса и дивљих месоједа.

Моноклонским антителима, методом имунофлуоресценције, доказан је штенећак код четири угинуле младе црвене лисице (6-12 месеци) са израженим нервним симптомима у Италији (Martella и сар., 2002). Постоји наглашена генетска разлика у *H* и *N* гену "нових" и "старих" сојева вируса штенећака који циркулишу на простору Италије (Martella и сар., 2002).

Damien и сар. (2002) употребом *SNT* и *ELISA* теста добијају донекле различите резултате, па их статистичком обрадом стављају у распон од 9-13%. Они објашњавају овакве резултате чињеницом да *SNT* детектује само антитела против *H* и *F* протеина, док *ELISA* детектује и друга антитела као што су она против *N* протеина.

Sobrino и сар. (2008) *ELISA* тестом показују преваленцију антитела од 17,1% у Шпанији, са значајном разликом између појединих области (7,8% у Ла Манчи до 26,4% у Арагону), при чему не утврђују значајну разлику у преваленцији између полова и различитих старосних категорија.

Santos и сар. (2009), употребом теста микронеутрализације, доказују присуство антитела код 9,1% испитаних серума црвених лисица из Португалије.

Серолошким испитивањима инфективних болести код месоједа у националном парку Јелоустоун Almberg и сар. (2009) тестом неутрализације вируса код црвених лисица утврђују преваленцију од 33,3%.

Серолошка студија о присуству различитих инфективних агенаса код месоједа на простору Скандинавије показује серопреваленцију антитела против вируса штенећака (*SNT*) од 12,3% код црвених и 11,6% код арктичких лисица (Åkerstedt и сар., 2010). Статистички значајно више је било позитивних узорака код одраслих него код младих јединки црвене лисице (<12 месеци), при чему статистички значајно више код женки него мужјака. Наводећи да, осим појединачних угинућа, нема података о ранијим епизоотијама штенећака код црвених лисица то може бити последица неутврђених случајева угинућа у дивљини, високе отпорности домаћина или мале вирулентности сојева који циркулишу у датом подручју (Åkerstedt и сар., 2010). Како је вирус релативно неотпоран у спољашњој средини (Appel, 1987) релативно висока преваленција

антитела сугерише на ензоотску и непрекидну циркулацију вируса како између самих дивљих животиња тако и између дивљих животиња и паса (Åkerstedt и сар., 2010).

Martella и сар. (2010) доказују штенећак код три младе црвене лисице у Италији *RT-PCR* методом. Животиње су показивале изражене клиничке симптоме (прострација, измењено понашање, конјунктивитис). Након тога најмање тридесет лисица са измењеним понашањем је примећено у истој области. Већину случајева чиниле су младе јединке. Током епизоотије потврђена су и три случаја штенећака код паса који су живели у истој области, и аутори сматрају да је до њихове инфекције дошло „преливањем“ (*spillover*, енг.) инфекције са црвених лисица (Martella и сар., 2010). С обзиром на то да у наведеној области није било пријављених случајева штенећака имунитет пријемчиве популације је био веома низак што је и условило настанак епизоотије (Martella и сар., 2010).

Monne и сар. (2011) описују нови генотип вируса који изазива распрострањену инфекцију код дивљих месоједа у алпском региону Италије. У раду описују појаву штенећака код више врста дивљих животиња, укључујући и 66 црвених лисица. Аутори наводе да су све животиње пронађене или угинуле или са израженим једним или више клиничких симптома: миоклонус, атаксија, исцедак из носа и очију и респираторне сметње. Молекуларно-генетичким испитивањима доказују да се ради о мутираном облику вируса који у том периоду није нађен код паса из те области, што може бити последица изостанка контакта или адаптације вируса на дивље животиње (Monne и сар., 2011).

Испитивањем узорака ткива пореклом од 12 црвених лисица које су пронађене угинуле, група аутора из Грчке успева да изолује вирусне антигене у три случаја (*RT-PCR*). Молекуларна испитивања показала су високу подударност са вирусима штенећака који потичу од паса што говори о интерспецијској циркулацији вируса између паса и дивљих месоједа (Billinis и сар., 2013). Они закључују да се вакцинацијом спречава циркулација вируса штенећака и тиме ограничава пренос на дивљи свет. Висок морталитет доприноси умањењу стварне преваленције испитиваних животиња. Поред тога што се пси сматрају сталним

извором инфекције сумња се да се патоген одржава у популацији различитих врста дивљих животиња (Billinis и сар., 2013).

Преваленција од 30,5% (*real time RT-PCR*) утврђена је код црвених лисица у немачкој савезној држави Саксонија Анхалт (Denzin и сар., 2013). Током двогодишњег истраживања није утврђена статистички значајна разлика између појединих година испитивања (33,7 и 27,1%). Ипак значајна разлика утврђена је између појединих група испитаних животиња. Тако је преваленција код групе која се састојала од животиња које су показивале клиничке знаке болести или сумњиво понашање износила 70,0%. Код друге две групе, које су чиниле угинуле, одстрелене и јединке које су страдале у саобраћају, није било значајне разлике у преваленцији (34,1%, 14/41 и 27,9%). Аутори закључују да и у овој регији вирус штенећака има ензоотски карактер и препоручују заштиту паса програмом вакцинације (Denzin и сар., 2013).

Испитивање здравственог статуса црвених лисица са севера Немачке показује да 11,4% има знаке енцефалитиса док 20,3% има знаке пнеумоније. Међутим, ни једна од ових јединки није показивала неуролошке знаке обољења а имунохистохемијске и молекуларне методе нису успеле да докажу присуство вирусног агенса. Само код једне од 79 јединки је доказано присуство антитета против штенећака (*SNT*), при чему аутори не дају до знања да ли се ради о животињи са утврђеним патолошким променама (Lempp и сар., 2017).

Након неколико година, крајем 2017. и почетком 2018. опет се појављује штенећак у Белгији. Од 13 испитаних црвених лисица, од којих је 6 показивало абнормално понашање, методом *RT-PCR* је установљена вирусна РНК код 10 јединки. Хистопатолошки, код свих су уочене типичне неуропатолошке лезије карактеристичне за штенећак. Вирус није био пореклом од вакциналног соја и аутори сматрају да је нагла појава ове инфекције на малом простору са високим морталитетом последица поновне појаве болести у популацији јединки која претходно није била у контакту са вирусом (Garigliany и сар., 2018).

3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ

Циљ ове докторске дисертације је анализа морфолошких промена и дефинисање дистрибуције антигена вируса штенећака и инфламаторног инфилтрата у мозгу природно инфицираних лисица.

Наведени циљ је остварен кроз следеће задатке:

- Испитивање узорака мозга методом директне имунофлуоресценције у циљу искључивања животиња позитивних на беснило;
- Испитивање узорака серума у циљу детекције лисица серолошки позитивних на присуство антитела против вируса штенећака;
- Опис макроскопских промена на различитим деловима мозга (фронтална кора, таламус, хипокампус, мали мозак) серолошки позитивних лисица;
- Опис микроскопских промена у наведеним деловима мозга;
- Опис експресије и дистрибуције антигена вируса штенећака (*CDV-NP*) у наведеним деловима мозга применом имунохистохемијских метода;
- Опис инфламаторног инфилтрата у наведеним деловима мозга применом имунохистохемијских метода;
- Одређивање степена демјелинизације беле мождане масе;
- Испитивање присуства вирусне РНК молекуларно-генетичким методама;
- Статистичка обрада добијених резултата.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Материјал

4.1.1. Испитивани материјал

За потребе израде ове докторске дисертације извршено је испитивање мозгова одраслих црвених лисица (*Vulpes vulpes*) оба пола, које су одстрелене у лову и донете на преглед у Ветеринарски специјалистички институт "Краљево" у Краљевоу у оквиру програма мониторинга на беснило. Од септембра 2016. до септембра 2017. укупно 285 лисица је испитано на присуство вируса беснила. На основу критеријума као што су квалитет серума (одсуство хемолизе), одсуство узнапредовалих постморталних промена и употребљивост možданог ткива за морфолошка испитивања, одабрано је 68 узорака серума који су испитани индиректним имуноензимским тестом на присуство антитела против вируса штенећака. Потом је извршено испитивање узорака мозгова 25 црвених лисица које су серолошки биле позитивне на вирус штенећака.

4.1.2. Узорковање серума

По узорковању бризгалицом и иглом директно из срца крв је остављена да коагулише. Након центрифуговања серум је пресут у епрувете, замрзнут и чуван на температури испод -15°C до коришћења.

4.1.3. Припрема хистолошких препарата

Након што је утврђено да је јединка негативна на вирус беснила, половина мозга је замрзавана на температурама испод -20°C а друга половина фиксирана у 10% пуферизованом неутралном формалину 72 сата, у односу фиксатива и ткива 10:1. За хистолошко и имунохистохемијско испитивање трансверзалним резевима

од сваке лисице узорковани су следећи делови мозга: фронтална кора, таламус, хипокампус и мали мозак. Након сечења поменути делови фиксирани су још 24 сата. По фиксацији, узорци су обрађени у аутоматском ткивном процесору *Leica TP 1020* (дехидратација кроз серију алкохола, просветљавање у ксилолу, импрегнација парафином) и укалупљени у парафинске блокове. Употребом микротоме *Leica RM 2235* парафински калупи су сечени на исечке дебљине 3-5µm, монтирани на предметна стакла и осушени на 56°C током 24 сата у термостату *Binder E/B28*. Депарафинисани у ксилолу и рехидрирани кроз серију алкохола (апсолутни алкохол, 96%, 70%) ткивни исечци су бојени различитим хистохемијским и имунохистохемијским методама.

Узорковање серума и ткива, као и серолошка испитивања на присуство вируса беснила и вируса штенећака обављена су у ВСИ "Краљево", Краљево. Припрема хистолошких препарата, хистохемијска и имунохистохемијска бојења обављена су на Катедри за патолошку морфологију Факултета ветеринарске медицине, Универзитет у Београду. Анализа ткивних исечака извршена је употребом светлосног микроскопа *Olympus BX51* а фотографије су направљене дигиталном камером *Olympus ColorView III®*.

4.2. Методе

4.2.1. Директна имунофлуоресценција

Након узорковања делови хипокампуса, малог мозга и možданог стабла од сваке животиње су испитани на присуство антигена вируса беснила методом директне имунофлуоресценције. Отисак препарати су фиксирани на пламенику, а након наношења специфичних антитела инкубирани су 30 минута у влажној комори на 37°C. Коришћена су комерцијална моноклонска антитела произвођача *Sifin, Deutschland (FLI-B 555)*. Антитела су конјугована флуоресцеин-изотиоцијанатом. По инкубацији препарати су испирани 3 пута по 5 минута у фосфатном пуферу (*phosphate-buffered-saline – PBS*, енг.), деминерализованој води, осушени на ваздуху, покривени глицерином и покровницом, и посматрани под флуоресцентним микроскопом *Zeiss Axio Observer A1*.

4.2.2. Индиректна *ELISA*

Употребом индиректног имуноензимског теста (*indirect ELISA*, енг.) серуми лисица су испитивани на присуство специфичних антитела (*IgG*) против *N* протеина вируса штенећака (*Ingezim Moquillo IgG 15.CDG.K1, Ingenasa, Madrid, Spain*). Серуми су разблажени у односу 1:100 у раствору за разблаживање добијеним од произвођача. Сви реагенси су пре употребе били на собној температури. Разблажени узорци серума су разливени у тест плочу заједно са контролама у дупликату. Покривена тест плоча је инкубирана 10 минута на собној температури. Након испирања додат је конјугат и покривена плоча је инкубирана још 10 минута на собној температури. Након другог испирања додат је раствор супстрата и инкубиран 5 минута на истој температури. По додавању стоп раствора употребом *ELISA* читача читавана је апсорпција сваког бунарчића при оптичкој густини/таласној дужини (*optical density - OD*, енг.) од 450nm. Према препорукама произвођача, гранична вредност је добијена множењем вредности *OD* 450nm позитивне контроле (*OD pc*) са 0,2. Како су контроле испитиване у дупликату то је вредност *OD* 450 nm позитивне контроле добијена дељењем збира појединачних вредности са два. Негативни узорци су били они чије су оптичке густине биле мање од граничне вредности док су позитивни били узорци серума са вредностима већим од граничне. Позитивни узорци су подељени у три групе: са ниским вредностима титра (узорци између 0,2 x *OD pc* и 0,4 x *OD pc*), средњим вредностима (од 0,4 x *OD pc* до 0,8 x *OD pc*) и високим вредностима титра (преко 0,8 x *OD pc*).

4.2.3. Хематоксилин еозин (*HE*)

Депарафинисани и рехидрирани ткивни исечци су бојени у хематоксилину у трајању од 5 минута. Након диференцирања у киселом алкохолу бојени су у еозину током 3 минута. Између ових бојења и диференцирања исечци су испирани у води. По дехидрацији у серији алкохола растуће концентрације и третмана ксилолом, ткивни исечци су монтирани и покривени стакленим лъуспицама.

4.2.4. Luxol fast blue

У циљу потврђивања демиелинизације ткивни исечци са карактеристичним променама су бојени *luxol fast blue (LFB, енг.)* методом (*Luxol fast blue Kluver Barrera, code 04-200812, Bio-Optica Milano S.p.A., Italy*) која се користи за доказивање мијелина и фосфолипида у хистолошким исечцима. Ова боја (луксол фаст плава) је дериват тетрабензотетразо-порфирина. Порфирини имају селективан афинитет за мијелин и афинитет ове боје у централном нервном систему се приписује везама које она формира са фосфолипидним структурама као што су лецитин и сфингомијелин.

Након депарафинизације и довођења исечака до 95% етанола, плочице су спуштане у инкубациону кутију (саставни део кита спремљен према упутству произвођача) и на исечак је накапано 10 капи реагенса А, кутија је затворена и инкубирана на 56°C преко ноћи. Након тога плочице су испране у 95% етанолу и дестилованој води, па је накапано 10 капи реагенса Б и остављено да делује 30 секунди, а потом диференцирано у 70% етанолу и добро испрано у дестилованој води најмање два пута. По испирању накапано је 10 капи реагенса Ц и 5 капи реагенса Д, плочице су стављене у инкубациону кутију и инкубиране 20 минута на 56°C, а потом диференциране у 95% етанолу све док Нислова супстанца није постала светло ружичаста. По дехидрирању у апсолутном алкохолу и избељивању у ксилолу вршено је монтирање.

Позитивна реакција се огледала у појави фокуса са слабијим интензитетом или потпуним одсуством плаве боје.

4.2.5. Имунохистохемијска метода

Имунохистохемијско бојење применом стрептавидин-биотин технике (*labelled streptavidin-biotin – LSAB+, DAKO*) вршено је на узорцима фиксираним у формалину и укалупљеним у парафинске блокове. Након депарафинизације рађено је демаскирање антигена у цитратном пуферу (рН 6,0) загревањем у микроталасној пећници на 560W у трајању од 21 минут, хлађење узорака дестилованом водом, па испирање водом из чесме а потом и дестилованом водом.

Блокирање ендогене пероксидазе вршено је употребом раствора 3% водоник-пероксида у метанолу током 15 минута на собној температури (22±3°C). За преинкубацију коришћен је 2% раствор нормалног козјег серума током 20 минута на собној температури. Примарна антитела у различитим концентрацијама (разблажена по упутству произвођача) инкубирана су у влажној комори на собној температури током 60 минута, након чега су исечци преливани биотинизованим везним антителом и инкубирани 20 минута на собној температури. Такође, инкубација узорака са стрептавидин-пероксидазом вршена је током 20 минута на собној температури. По завршетку сваког од набројаних корака узорци су испирани фосфатним пуфером (*phosphate-buffered-saline* – *PBS*, енг.). За визуелизацију антиген-антитело комплекса коришћен је хромоген диаминобензидин (*3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride*, *DAB+kit*, *DAKO*) до постизања видљиве реакције након чега су узорци испрани дестилованом водом. Контрастирање је вршено концентрованим хематоксилином (*Mayer's hematoxylin*) током 1-2 секунде, после чега су узорци испрани водом и покривени воденим медијумом за монтирање. На месту позитивне реакције јавља се преципитат смеђе боје. Списак коришћених антитела налази се у табели 1.

Испитивањем присуства и дистрибуције вирусног антигена интензитет позитивне реакције је подељен на основу броја позитивних ћелија у 1 видном пољу великог увећања микроскопа у три категорије: (+) - слаб (мање од 10% позитивних ћелија), (++) - умерен (10-50%) и (+++) - јак (више од 50% позитивних ћелија). Као позитивне контроле коришћени су узорци пореклом од еутаназираног пса са израженим нервним симптомима и доказаним штенећаком, док су као негативне контроле коришћени узорци код којих је у инкубацији изостављено примарно антитело.

Испитивањем карактера и дистрибуције инфламаторног инфилтрата утврђивано је присуство позитивних моноклеарних ћелија и њихова дистрибуција у нервном ткиву (фокално, мултифокално, дифузно, периваскуларно, субепендимски). На основу заступљености позитивних ћелија у односу на укупан број моноклеарних ћелија запаљења у једном видном пољу великог увећања интензитет инфилтрације је подељен у три категорије: (+) - слаб (мање од 10%

позитивних ћелија), (++) - умерен (10-50%) и (+++) - јак (више од 50% позитивних ћелија).

Табела 1. Списак антитела коришћених у имунохистохемијским реакцијама

Антитело	Произвођач	Преникубација	Разређење	Инкубација	Кит за детекцију
CDV-NP	INGENASA	норм. козји серум, 2%, 20', 22±3°C	1:2200	преко ноћи, 4°C	DAKO
CD3	DAKO	норм. козји серум, 2%, 20', 22±3°C	1:50	1h, 22±3°C	DAKO
CD21	DAKO	норм. козји серум, 2%, 20', 22±3°C	<i>Ready to use</i>	1h, 22±3°C	DAKO

4.2.6. Ланчана реакција полимеразе

Испитивање присуства нуклеинске киселине вируса штенећака рађено је методом ланчане реакције полимеразе (*RT-PCR*). Хомогенизација и центрифугирање узорака и екстракција РНК су рађени према упутству произвођача кита за екстракцију *RNeasy Total RNA Kit (Qiagen S.p.A. Italy)*. Екстрахована РНК чувана је на температури од -70°C до почетка испитивања.

Ланчана реакција полимеразе изведена је применом комерцијалног кита *Gene Amp RNA PCR kit (Applied Biosystems, Applied, Italy)*. Прајмери коришћени у испитивању су специфични за ген који кодира синтезу нуклеопротеина вируса и описани су у раду Elia и сар. (2006). Овај ген се сматра високо конзервисаним геном са малим степеном варијабилности (Rima и сар., 1995). Позиција и секвенце коришћених прајмера налазе се у табели 2.

Табела 2. Секвенце прајмера коришћених у *RT-PCR* методи

Прајмер	Секвенца
p1	ACAGGATTGCTGAGGACCTAT
p2	CAAGATAACCATGTACGGTGC

За реакцију реверзне транскрипције коришћена је следећа мешавина: *PCR* пуфер 1 x (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.3), MgCl₂ 5 mM, 1 mM сваког дезоксинуклеотида (*dATP*, *dCTP*, *dGTP*, *dTTP*), инхибитор рибонуклеазе 1 U,

MuLV реверзна транскриптаза 2.5 U, насумични хексамери 2.5 U. Реверзна транскрипција је рађена на 42°C током 30 минута. По инактивацији реверзне транскриптазе додата је мешавина прајмера (по 1 µM сваког прајмера) након чега су узорци пренети у *Applied Biosystems 2720* уређај у којем је извођена реакција на температурном режиму приказаном у табели 3.

Табела 3. Параметри *RT-PCR* реакције

	Реверзна транскрипција	Активација полимеразе	PCR		
			45 циклуса		
			<i>denaturation</i>	<i>annealing</i>	<i>extension</i>
Температура	42°C	95°C	94°C	59,5°C	72°C
Време	30 min	10 min	2 min	2 min	1 min

Последња екстензија рађена је на 72°C у трајању од 10 минута. По завршетку ланчане реакције полимеразе рађена је хоризонтална гел-електрофореза испитиваних узорака ради визуелизације добијених продуката. Електрофореза је рађена у комерцијалним, претходно изливеним касетама са 2% агарозним гелом и већ додатим етидијум-бромидом, у трајању од 26 минута. По завршетку електрофорезе касета са гелом је пренета у *Gel Doc XR system (Bio-Rad)* ради визуелизације под УВ светлом. Дужина добијеног производа је поређена са молекуларним маркером *Fermentas O Gene Ruler 100-1000* базних парова. Појава траке величине 287 базних парова на агарозном гелу је сматрана позитивним налазом (Frisk и сар., 1999).

4.2.7. Статистичка обрада података

При описивању добијених резултата употребљени су дескриптивни статистички параметри (аритметичка средина, стандардна девијација, стандардна грешка аритметичке средине, интервал варијација) који су омогућили описивање добијених резултата и њихово тумачење. Значајност разлика је установљена на нивоу од 95% и 99%. Добијени резултати су приказивани табеларно и графички. Статистичка анализа је урађена у програмима *Microsoft Excel* и *GraphPad Prism 6*.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Резултати директне имунофлуоресценције на присуство антигена вируса беснила

Испитивањем отисак препарата 285 узорака мозга лисица методом директне имунофлуоресценције није утврђено присуство антигена вируса беснила.

5.2. Резултати индиректног *ELISA* теста на присуство антитела против вируса штенећака

Имуноензимским тестом (индиректна *ELISA*) испитано је 68 узорака серума. Добијене вредности титра антитела свих узорака налазе се у табели 4.

Табела 4. Вредности титра антитела против вируса штенећака добијених имуноензимским тестом (индиректна *ELISA*)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,888	0,226	0,232	0,158	0,227	0,394	0,158	0,124	0,207
B	0,207	0,175	0,488	0,355	0,144	0,216	0,192	0,444	0,210
C	0,301	0,167	0,216	0,211	0,168	0,199	0,341	0,649	0,562
D	0,347	0,099	0,880	0,227	0,124	0,222	0,330	0,365	0,611
E	0,349	0,320	0,548	0,176	0,169	0,128	0,186	0,372	0,123
F	0,225	0,235	0,146	0,891	0,155	0,102	0,180	0,242	0,125
G	0,144	0,249	0,493	0,249	0,168	0,194	0,335	0,147	1,213
H	0,186	0,435	0,678	0,238	0,352	0,232	0,401	0,142	1,293

У пољима E9 и F9 налазе се вредности негативних контрола, док G9 и H9 представљају вредности позитивних контрола.

Гранична вредност (*cut off value*, енг.) износила је 0,2506. Слабо позитивне (+) вредности биле су од 0,2506 до 0,5012, средње позитивне (++) од 0,5012 до 1,0024, а јако позитивне (+++) преко 1,0024.

Од испитаних 68 узорака 25 (36,8%) је било позитивно на присуство антитела против вируса штенећака. Од тога слабо позитивне вредности титра имало је 17 узорака (25%), док је 8 узорака (11,8%) имало средње вредности титра. Није било узорака са високим вредностима титра антитела.

5.3. Резултати макроскопског прегледа

Прегледом нативних узорака и попречних пресека фиксираних узорака мозга нису уочене макроскопски видљиве патолошке промене.

5.4. Резултати хистохемијских анализа

Микроскопским прегледом препарата бојених хематоксилином и еозином установљен је низ хистопатолошких промена. Приказ уочених хистопатолошких промена по регијама мозга налази се у табели 5.

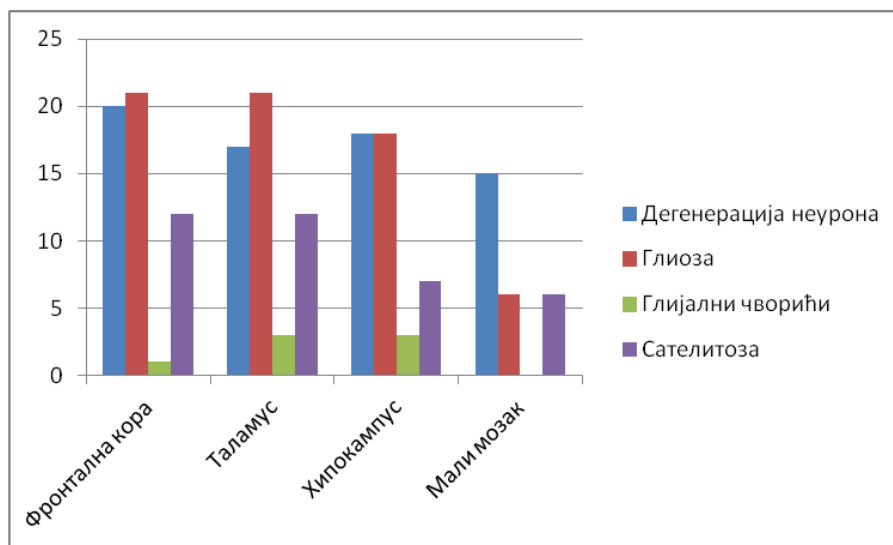
Најучесталија промена била је дифузна глиоза, која је утврђена код 21/25 (84%) јединки (слике 3-5). Углавном је била присутна у белој маси предњих и средњих делова мозга док се само код 6/25 (24%) животиња могла видети у белој маси малог мозга. Код 5/25 (20%) јединки уочена је изражена глиоза са формирањем глијалних чворића, при чему су се углавном налазили у регији таламуса и хипокампуса (слика 6).

Дегенерација неурона утврђена је код 20/25 (80%) животиња, и то код свих 20 животиња на неуронима фронталне коре великог мозга, и у нешто мањој мери у осталим исечцима. Промене на неуронима су обухватале оток ћелија са

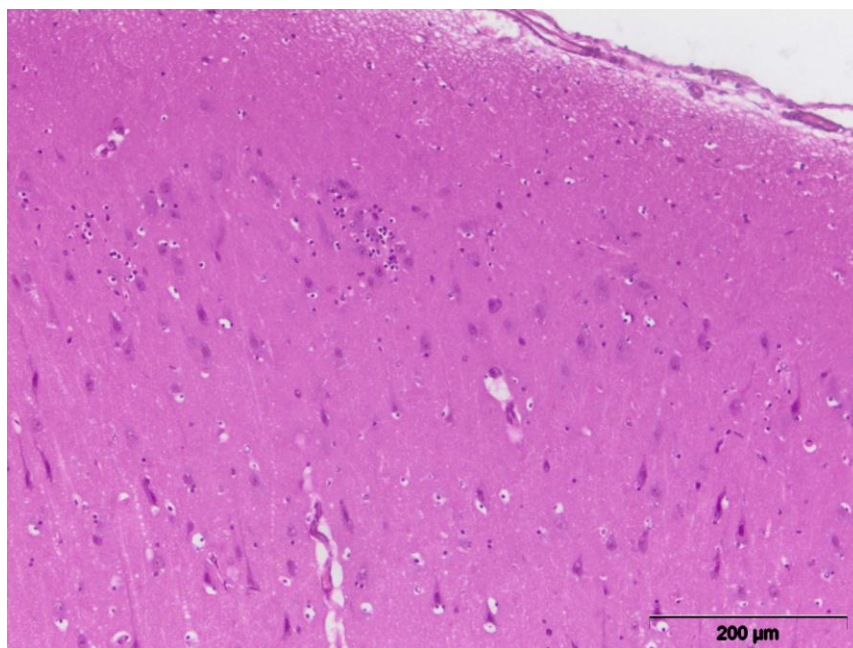
Табела 5. Најзначајније хистопатолошке промене у различитим регијама мозга лисица серолошки позитивних на штенећак

Хистолошка промена	Укупно	Фронтална кора	Таламус	Хипокампус	Мали мозак
Дегенерација неурона	20	20	17	18	15
Глиоза	21	21	21	18	6
Глијални чворићи	5	1	3	3	-
Сателитоза	14	12	12	7	6
Инфламација	12	11	4	8	2
Менингитис	4	4	-	1	-
Инклузије у неуронима	4	4	2	1	1
Инклузије у астроцитима	5	4	4	3	2
Едем	8	8	3	6	6
Хиперплазија крвних судова	4	4	3	1	3
Инклузије у ендотелним ћелијама	1	1	-	-	-
Хеморагије	4	4	4	1	2
Синцицијум ћелија хориоидних сплетова	3	1	1	-	1
Инклузије у епендимским ћелијама	3	1	-	1	1
Дегенерација ћелија хориоидних сплетова	4	-	2	1	2
Расветљења у неуронима	6	5	4	4	1
Дегенерација Пуркинијевих ћелија	14	-	-	-	14
Инклузије у Пуркинијевим ћелијама	1	-	-	-	1
Инклузије у олигодендроцитима	1	-	1	-	-
Демиелинизација	9	6	5	4	8
Астроцитоза	1	1	-	-	-
Калцификација	2	2	-	1	-

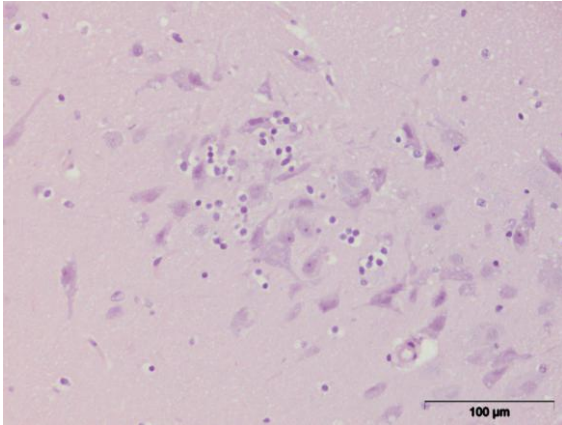
пикнозом једра, хипереозинофилију, централну хроматолизу, исхемичне промене, дислокацију једра ка периферији, кариолизу, гранулисаност цитоплазме, као и вакуолизацију једра и/или цитоплазме (слике 5, 8, 9). Сателитоза је уочена код 14/25 (56%) јединки, и то у највећој мери у сивој маси фронталне коре и регије таламуса (графикон 1; слика 7).



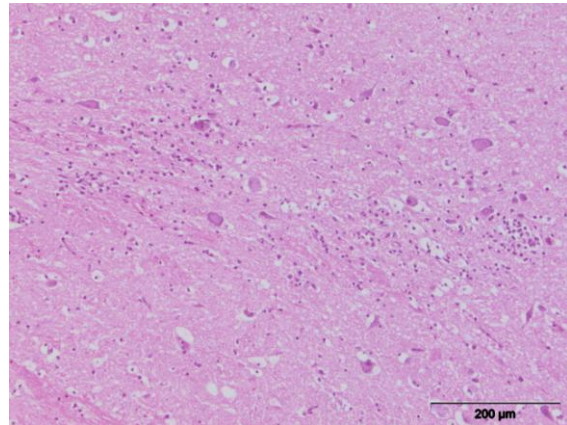
Графикон 1. Учесталост дегенерације неурона, глиозе и сателитозе по регијама мозга



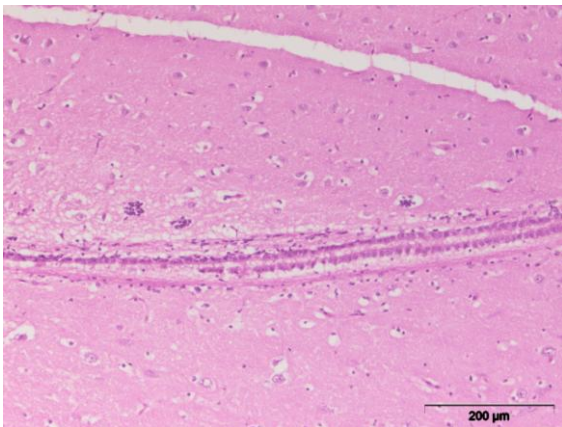
Слика 3. Мозак лисице, фокална глиоза и сателитоза, HE



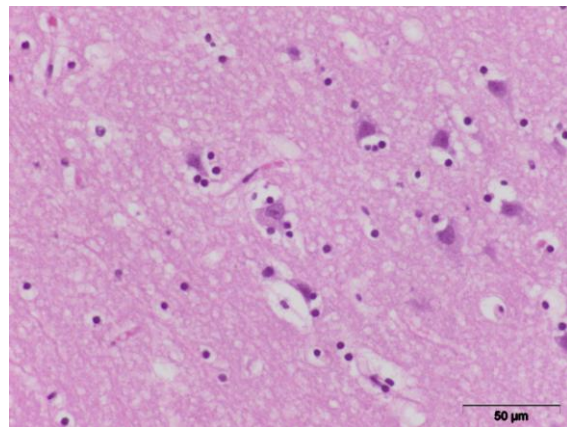
Слика 4. Мозак лисице, фокална глиоза, *HE*



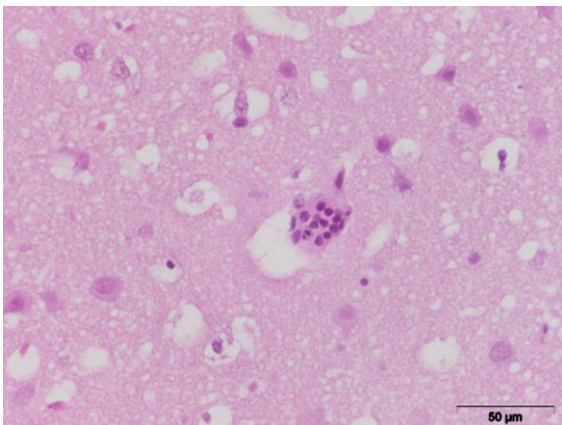
Слика 5. Мозак лисице, глиоза и централна хроматолиза, *HE*



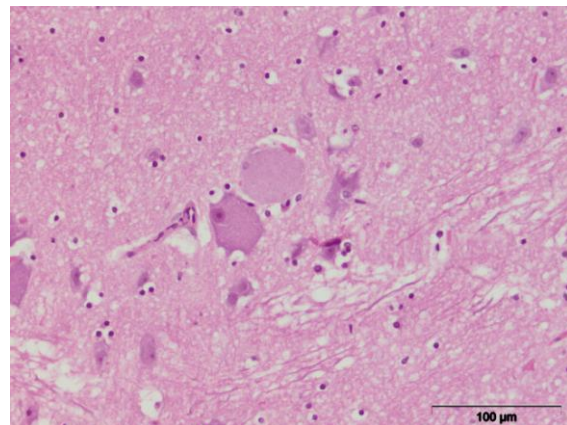
Слика 6. Мозак лисице, глијални чворићи, *HE*



Слика 7. Мозак лисице, сателитоза, *HE*

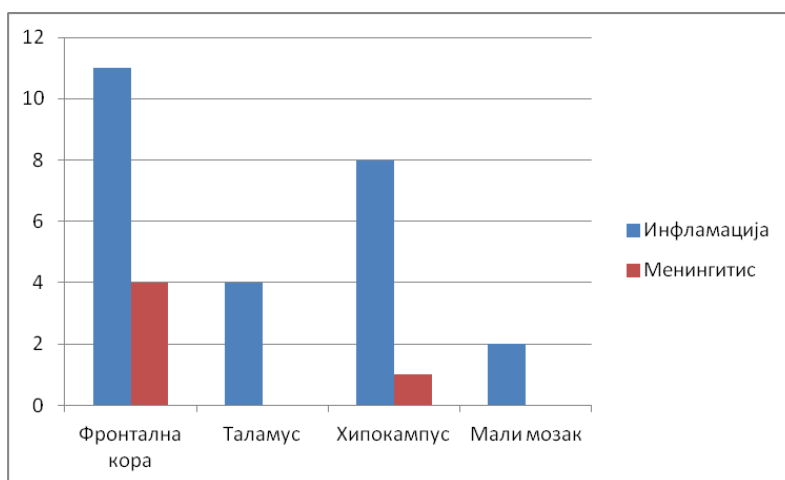


Слика 8. Мозак лисице, неуронофагија, *HE*



Слика 9. Мозак лисице, дегенерација неурона и астроцита (гемистоцит), *HE*

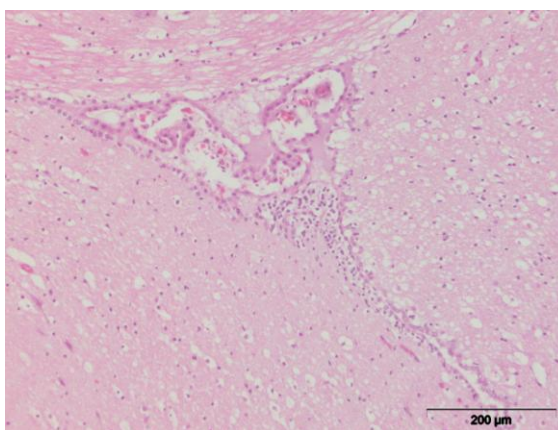
Инфламаторне промене су утврђене код 12/25 (48%) јединки. У највећем броју случајева радило се о благом периваскуларном инфилтрату сачињеном од мононуклеарних запаљенских ћелија сложених у 1 до 3 реда. Само код две животиње (2/25, 8%) уочена је јаче изражена инфламаторна реакција где се периваскуларни инфилтрат састојао од више од три слоја мононуклеарних ћелија (слике 10-15). Код 4/25 (16%) поред периваскуларног инфилтрата присутни су били и знаци менингитиса, и то готово у потпуности само у пределу фронталне коре (графикон 2; слике 16-17, 23).



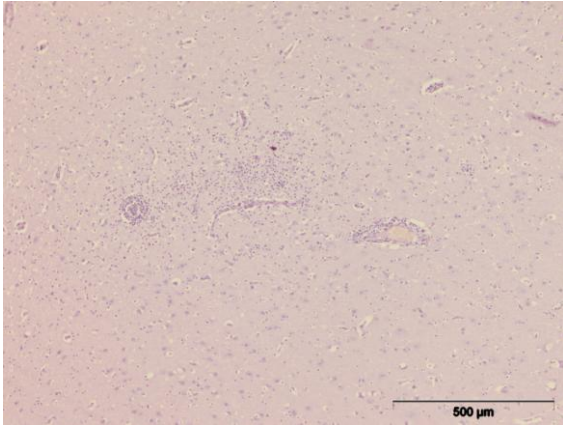
Графикон 2. Приказ учесталости периваскуларних инфилтрата и менингитиса по регијама мозга.



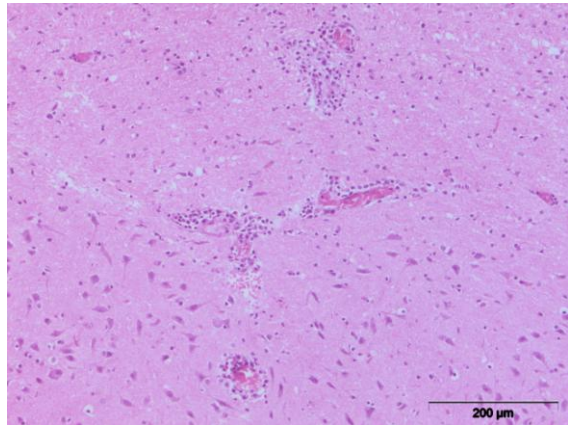
Слика 10. Мозак лисице, маргинализација инфламаторних ћелија у крвном суду, *HE*



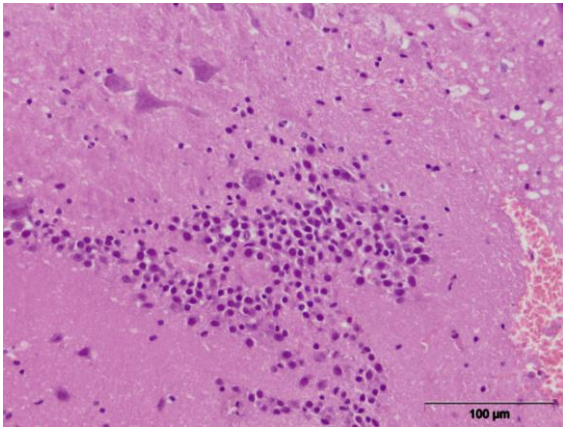
Слика 11. Мозак лисице, субепендимски мононуклеарни инфилтрат, *HE*



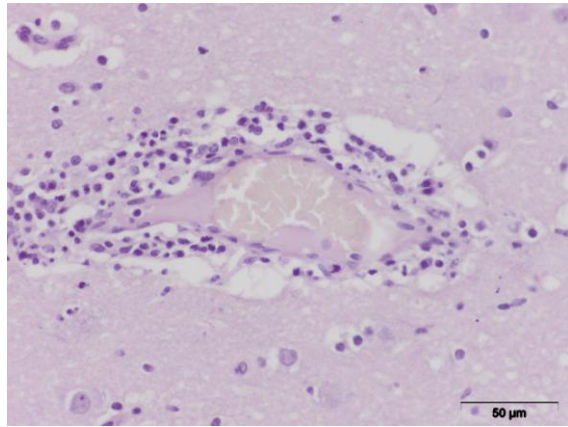
Слика 12. Мозак лисице, мултифокални мононуклерани инфилтрат, *HE*



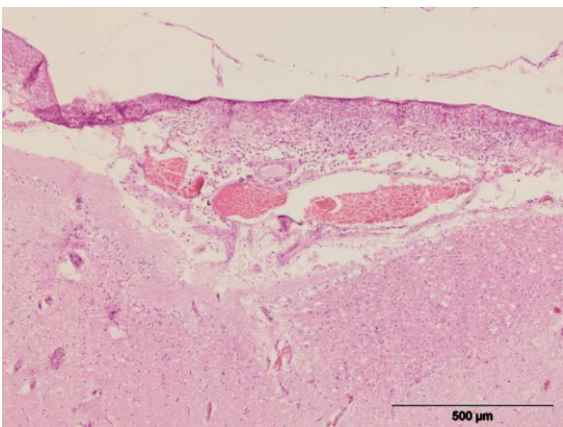
Слика 13. Мозак лисице, мултифокални периваскуларни мононуклеарни инфилтрат, *HE*



Слика 14. Мозак лисице, изражен мононуклеарни инфламаторни инфилтрат, *HE*



Слика 15. Мозак лисице, периваскуларни мононуклеарни инфилтрат, *HE*



Слика 16. Мозак лисице, негнојни менингитис, *HE*



Слика 17. Мозак лисице, негнојни менингитис, *HE*

Округле до овалне, еозинофилне, интрацитоплазматске и интрануклеарне инклузије су уочене код 5/25 (20%) јединки у астроцитима (слике 18-19) и 4/5 (16%) јединке у неуронима (слике 20-21). Инклузије су примећене и у другим ћелијама – код 3/25 лисице (12%) у епендимским ћелијама, а у ендотелним, Пуркинијевим и олигодендроцитима у појединачним случајевима (1/25, 4%) (слике 22-23). Појава овалних расветљења у цитоплазми и једрима неурона, која морфолошки одговарају инклузијама али без изражене еозинофилије, могла се видети код 6/25 (24%) лисица (слике 24-25).

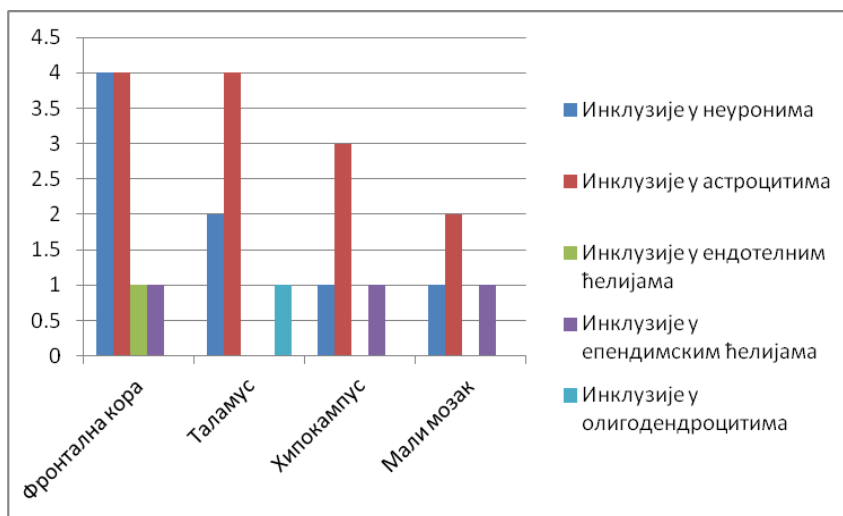
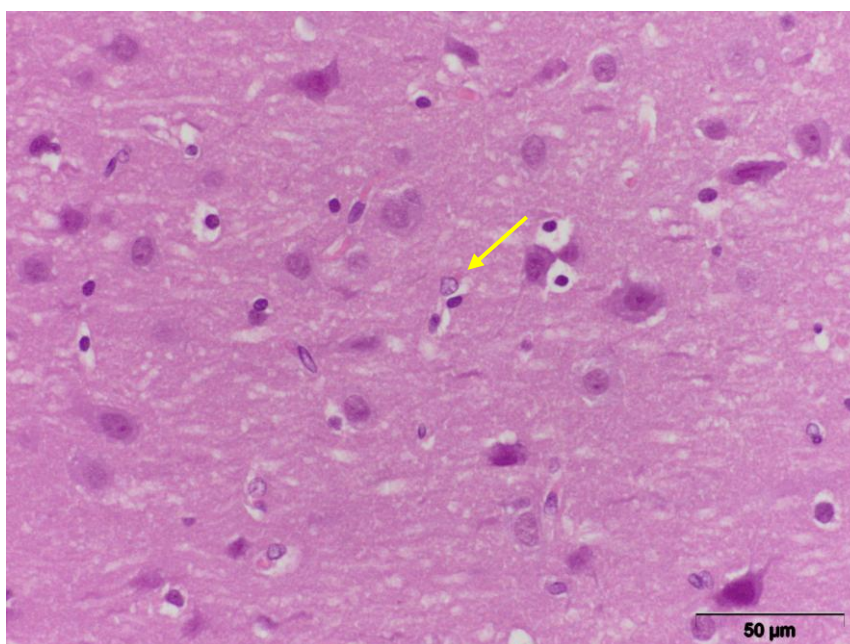
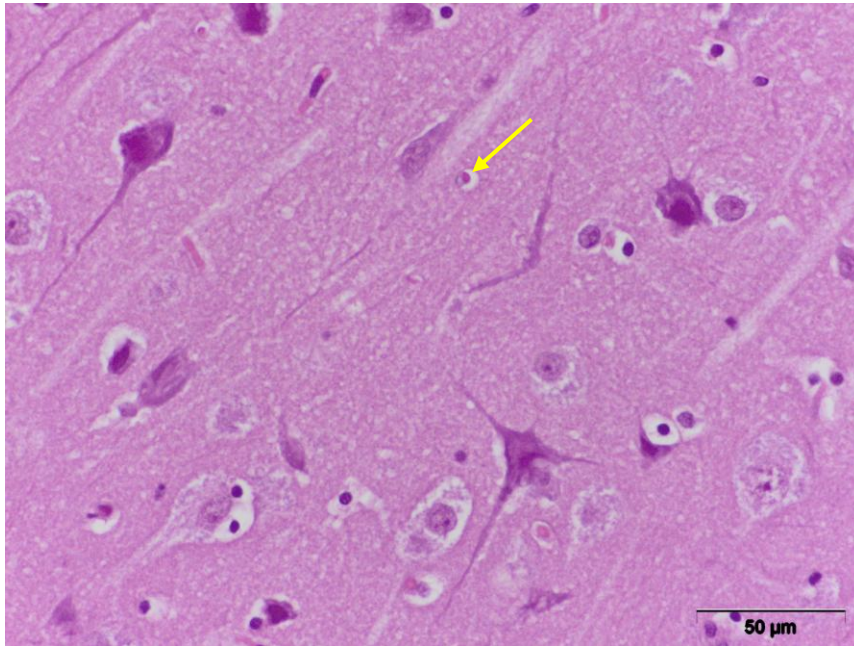


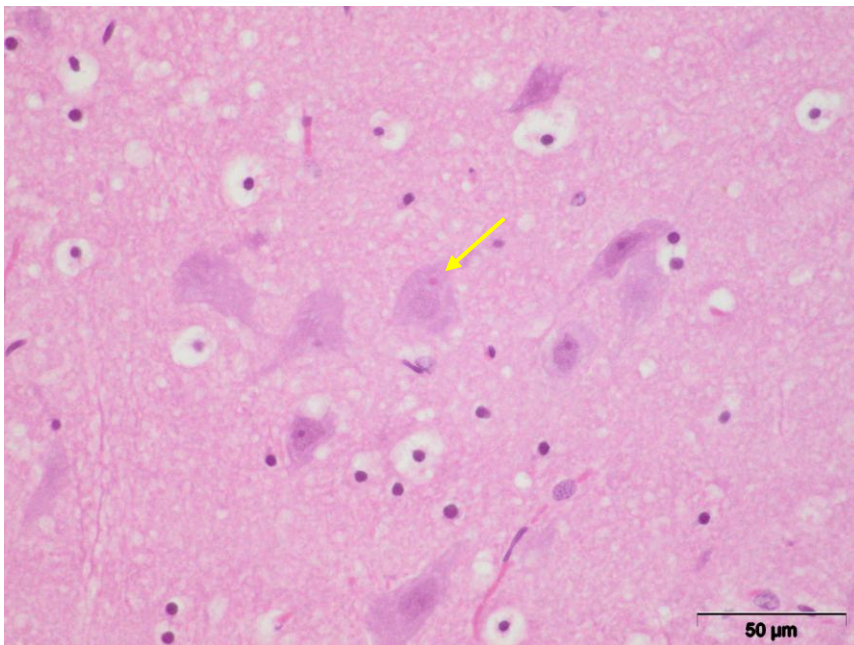
График 3. Учесталост појаве инклузија у различитим ћелијама по регијама мозга



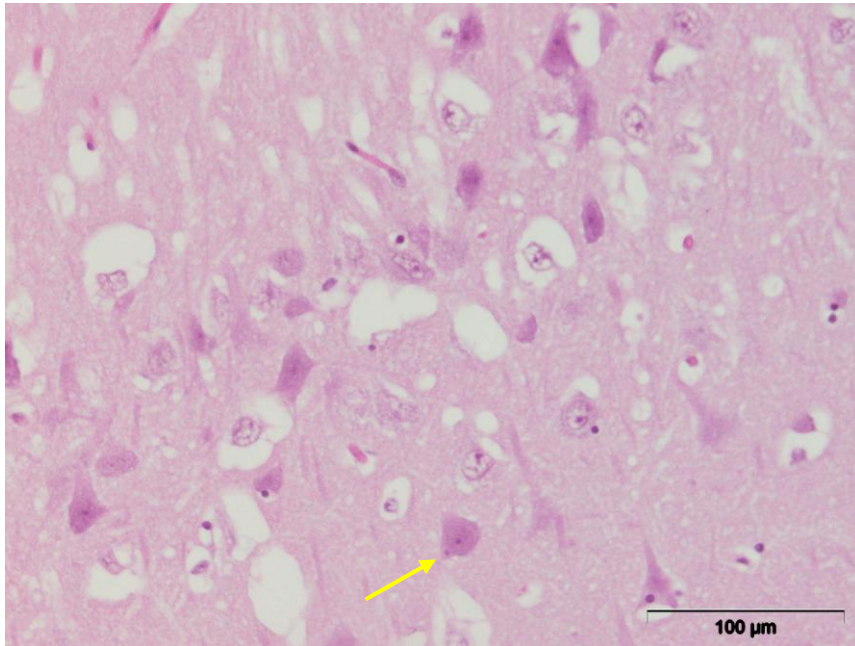
Слика 18. Мозак лисице, инклузија у цитоплазми астроцита (стрелица), HE



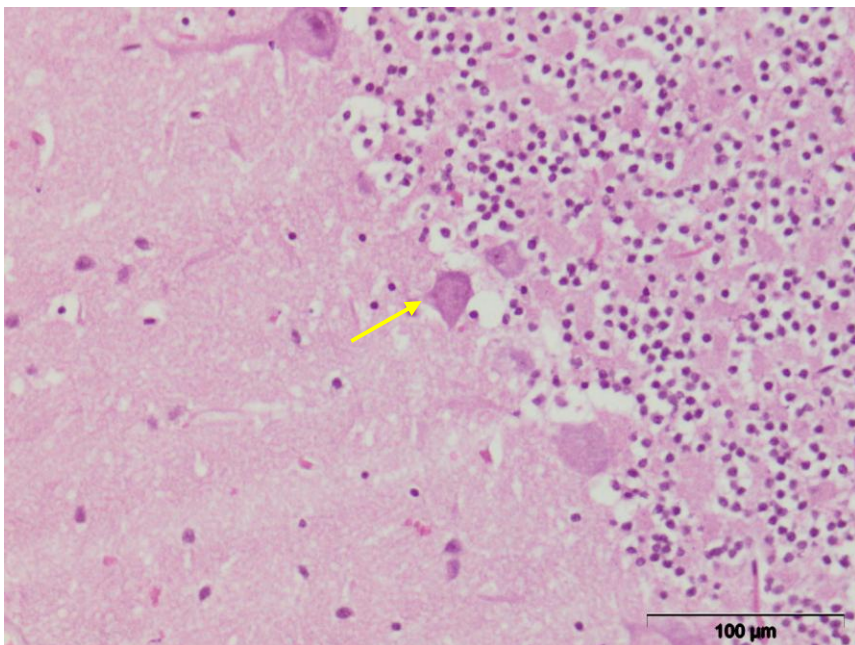
Слика 19. Мозак лисице, инклузија у једру астроцита (стрелица), *HE*



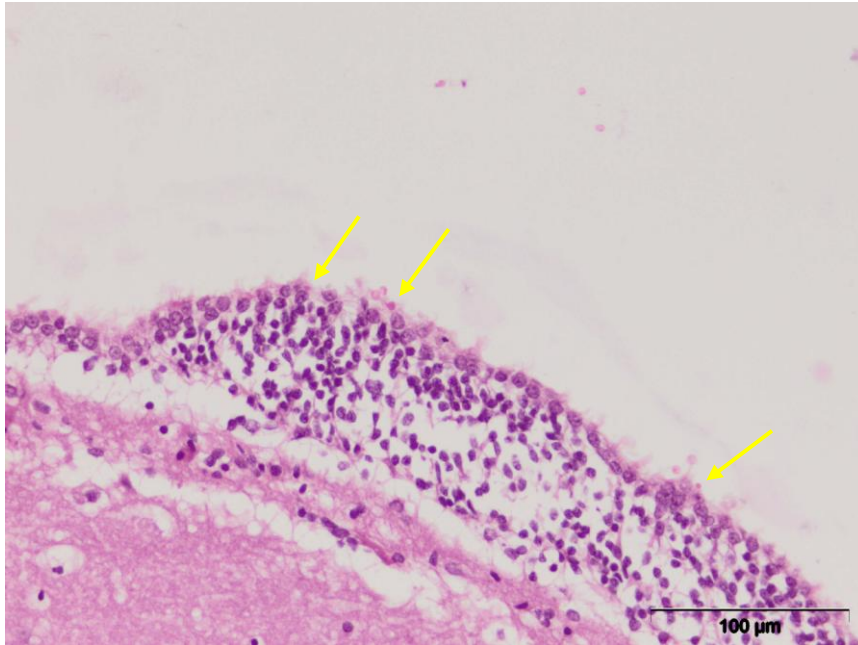
Слика 20. Мозак лисице, инклузија у цитоплазми неурона (стрелица), *HE*



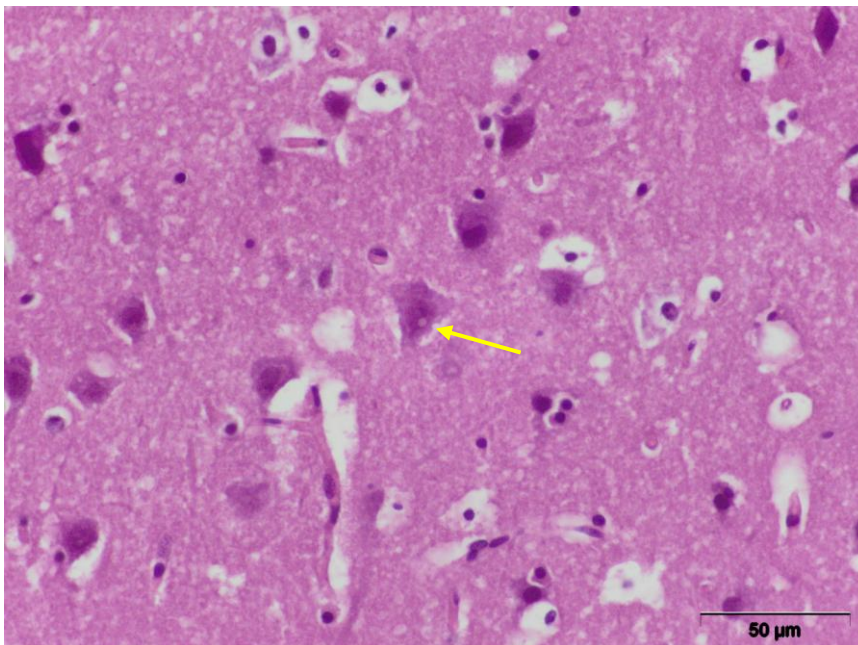
Слика 21. Мозак лисице, инклузија у цитоплазми неурона Амоновог рога (стрелица), *HE*



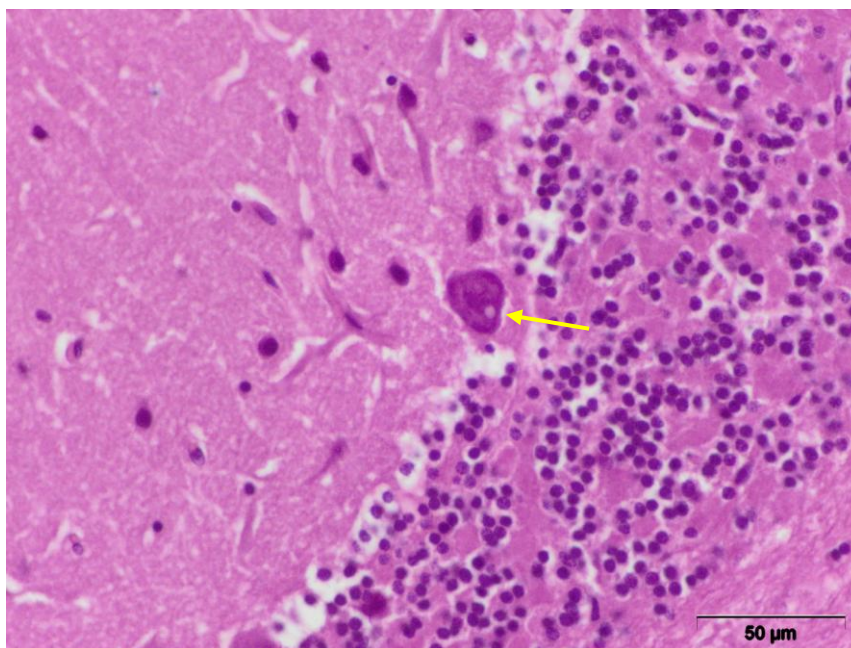
Слика 22. Мозак лисице, инклузија у цитоплазми Пуркинијеве ћелије (стрелица), *HE*



Слика 23. Мозак лисице, изражен негнојни менингитис. Инклузије у цитоплазми епендимских ћелија (стрелице), *HE*



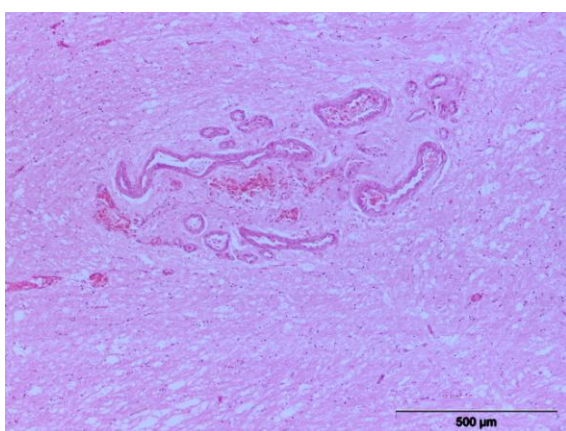
Слика 24. Мозак лисице, интрануклеарна инклузија у неурону (стрелица), *HE*



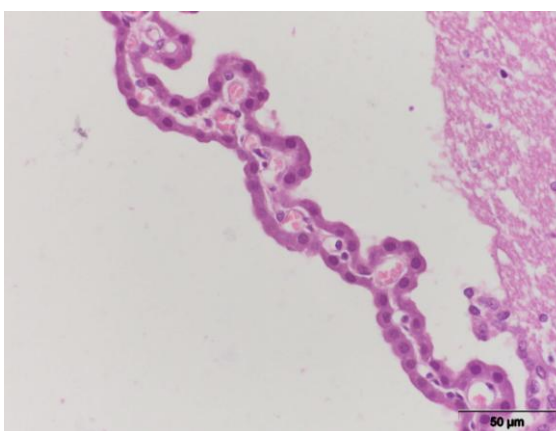
Слика 25. Мозак лисице, перинуклеарна цитоплазматска инклузија у Пуркинијевој ћелији (стрелица), *HE*

Едем, у највећој мери изражен периваскуларно, уочен је код 8/25 (32%) животиња. Хиперплазија крвних судова примећена је код 4/25 (16%) лисице, а у истом проценту су биле присутне и ситне, углавном периваскуларне, хеморагије (слика 26).

Дегенерација епителних ћелија хориоидних плексуса, са појавом гранулисаних, хипоеозинофилне цитоплазме и губљењем обрса једра, примећена је код 4/25 (16%) животиње (слика 27), док се појава синцицијума у овим ћелијама могла видети у три случаја (3/25, 12%).

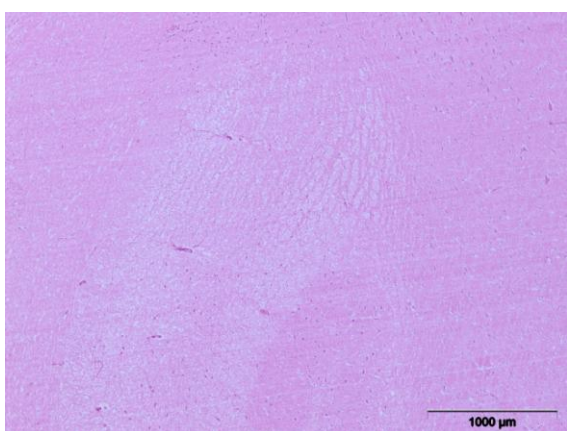


Слика 26. Мозак лисице, хиперплазија и хипертрофија ендотелних ћелија и периваскуларна крвављења, *HE*

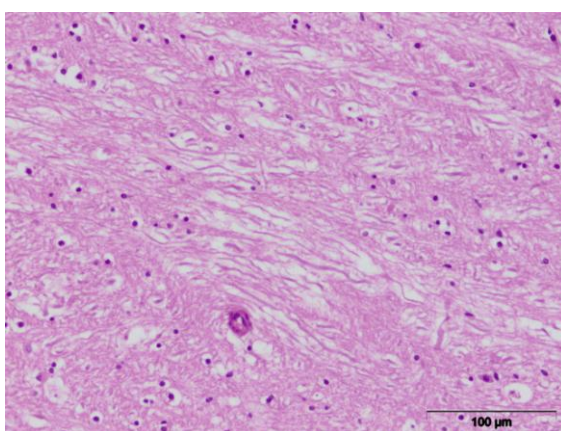


Слика 27. Мозак лисице, дегенерација ћелија хориоидног сплета, *HE*

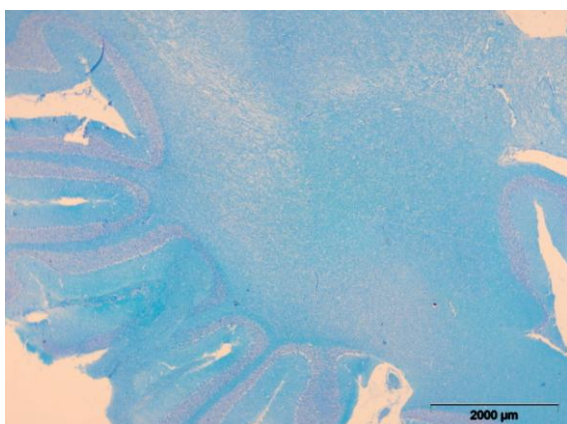
Знаци демиелинизације уочени су код 9/25 (36%) лисица, најизраженији у белој маси малог мозга (слике 28-29). У циљу потврђивања и лакше визуелизације поља демиелинизације ткивни исечци су бојени *LFB* методом. Код свих узорака су уочени фокуси демиелинизације различите величине, који су се под малим увеличањем микроскопа видели као вакуолизована поља сачињена од оптички празних простора и ткива које је обојено слабијим интензитетом плаве боје. Није утврђено присуство макрофага са *LFB* позитивним материјалом у цитоплазми (слике 30-31).



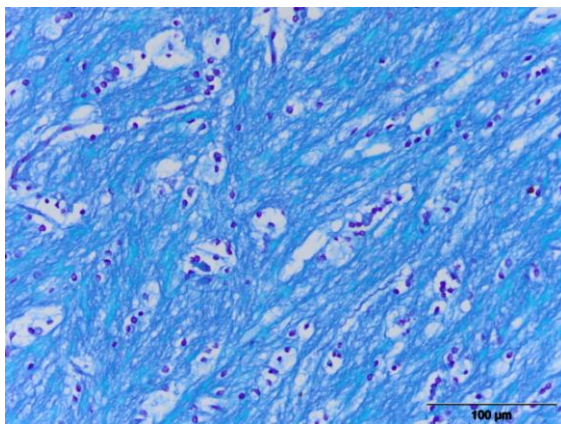
Слика 28. Мозак лисице, демиелинизација беле масе малог мозга, *HE*



Слика 29. Мозак лисице, демиелинизација беле масе фронталног режња великог мозга, *HE*

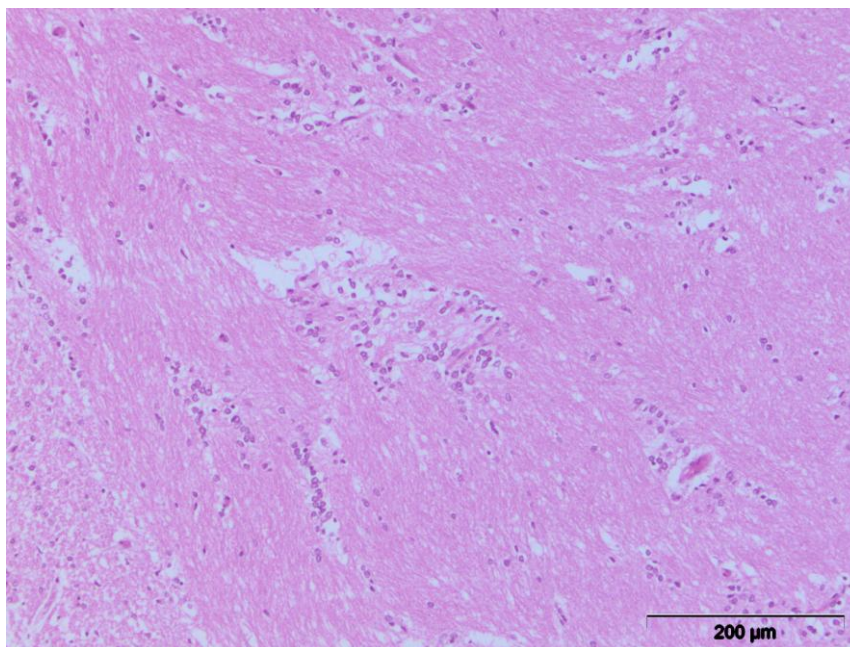


Слика 30. Мозак лисице, демиелинизација беле масе малог мозга, *LFB*



Слика 31. Мозак лисице, демиелинизација беле масе фронталног режња великог мозга, *LFB*

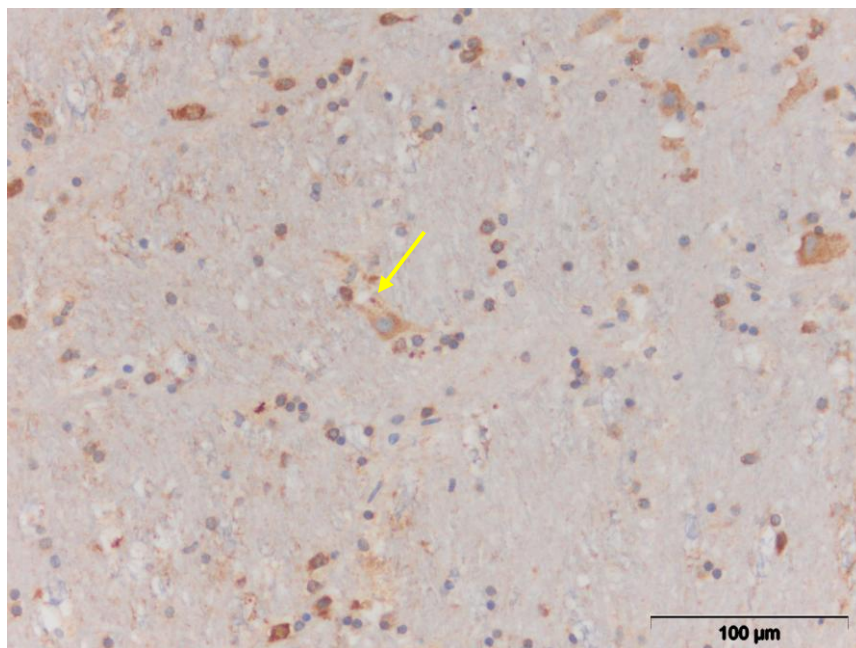
Дегенерација Пуркинијевих ћелија у малом мозгу примећена је код 14/25 (56%) лисица. Код једне јединке је уочена дифузна астроцитоза беле масе узорка фронталног режња (1/25, 4%) (слика 32). Код две лисице (2/25, 8%) примећена су ситна поља калцификације.



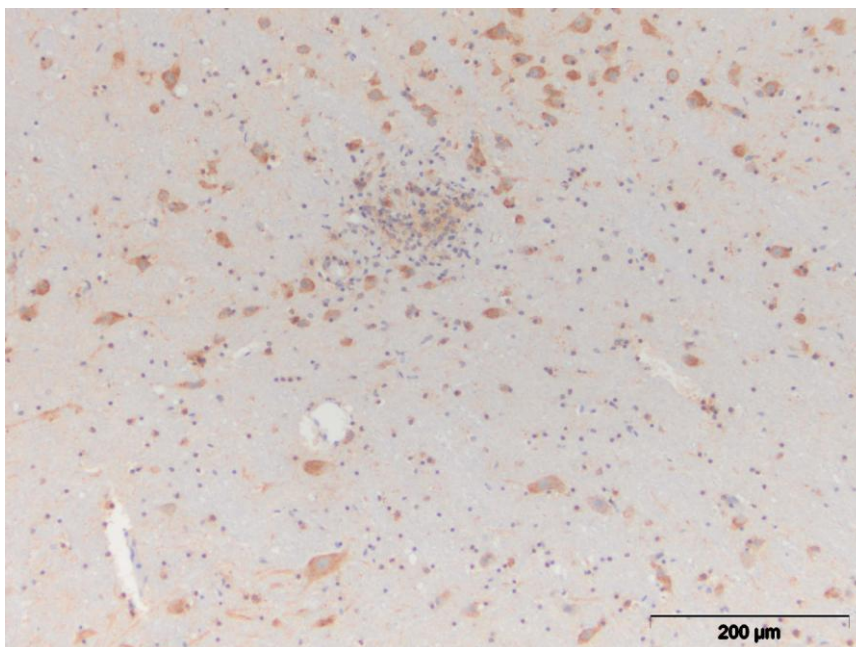
Слика 32. Мозак лисице, анизоморфна астроцитоза беле масе фронталног режња великог мозга, *HE*

5.5. Резултати имунохистохемијских анализа

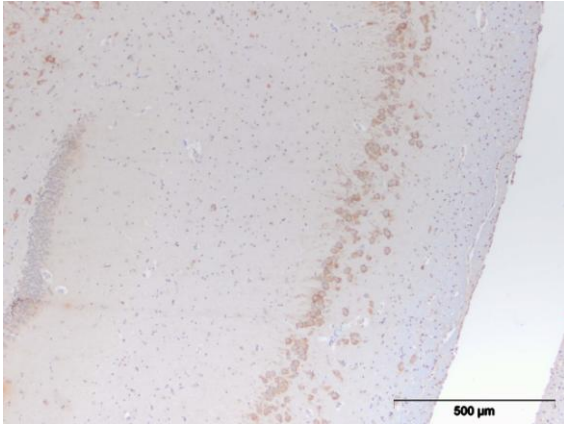
Узорци са карактеристичним променама бојени су имунохистохемијским методама. Доказивање присуства и испитивање дистрибуције вирусног антигена вршено је употребом моноклонских антитела против вирусног нуклеопротеина (*CDV-NP*). Сви испитани узорци показали су позитивну реакцију умереног до јаког интензитета. Имунохистохемијски позитиван материјал, у виду гранулисаног преципитата смеђе боје, могао се уочити у глија ћелијама и неуронима (слике 33-40), епендимским и ћелијама хориоидних сплетова (слика 38). Преципитат антигена се готово искључиво уочавао у цитоплазми ових ћелија. Није уочена позитивна реакција ендотелних ћелија (слика 39).



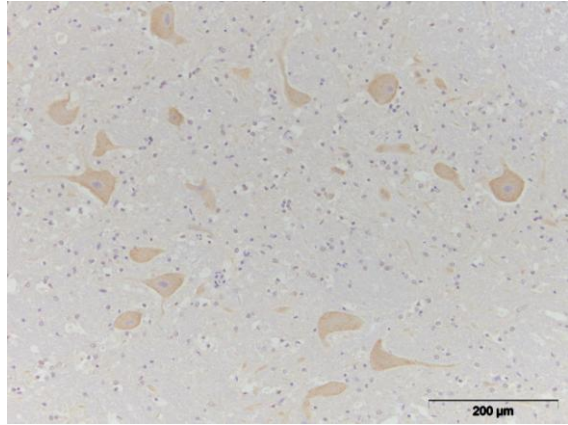
Слика 33. Мозак лисице, експресија *CDV-NP* антигена у цитоплазми неурона и глија ћелија фронталног режња великог мозга. У цитоплазми позитивних ћелија уочава се преципитат који морфолошки одговара инклузијама (стрелица), *CDV-NP*, *LSAB+*



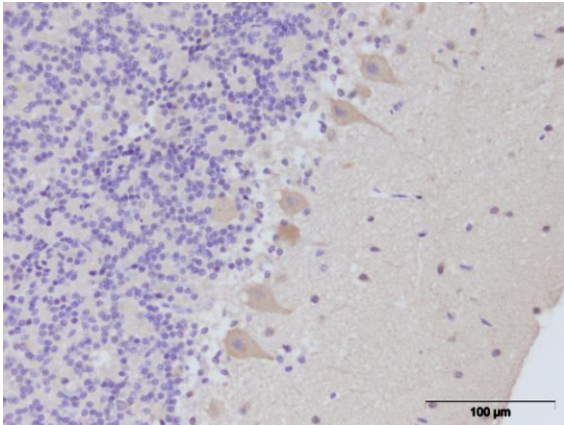
Слика 34. Мозак лисице, експресија *CDV-NP* антигена изражена у цитоплазми неурона и умерена у глија ћелијама таламуса великог мозга. Фокус мононуклеарне инфилтрације у којем се уочава позитивна реакција у цитоплазми, *CDV-NP*, *LSAB+*



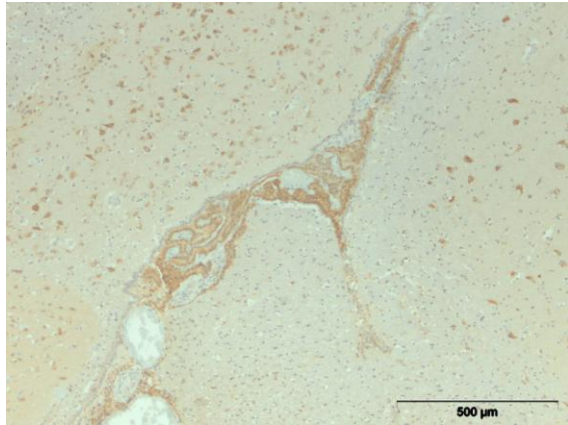
Слика 35. Мозак лисице, експресија *CDV-NP* антигена у цитоплазми неурона хипокампуса, *CDV-NP*, *LSAB*+



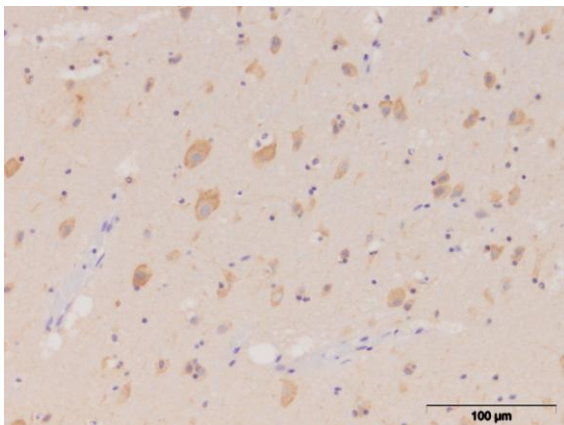
Слика 36. Мозак лисице, експресија *CDV-NP* антигена у цитоплазми неурона малог мозга, *CDV-NP*, *LSAB*+



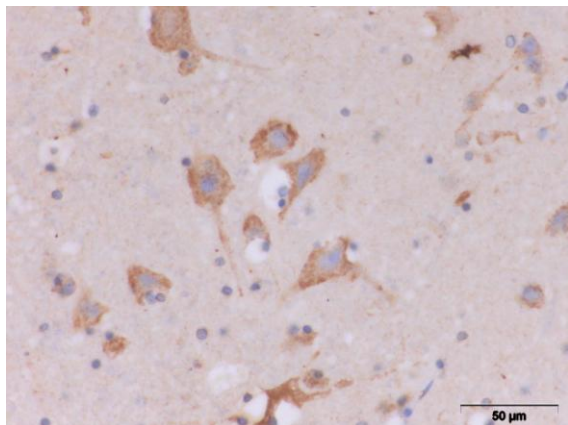
Слика 37. Мозак лисице, експресија *CDV-NP* антигена у цитоплазми Пуркинијевих ћелија и одсуство у неуронима грануларног слоја малог мозга, *CDV-NP*, *LSAB*+



Слика 38. Мозак лисице, експресија *CDV-NP* антигена у ћелијама хориоидног сплета постране моздане коморе и околним неуронима, *CDV-NP*, *LSAB*+

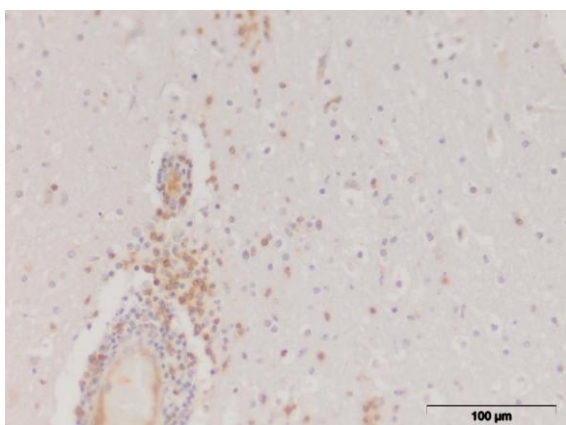


Слика 39. Мозак лисице, експресија *CDV-NP* антигена у цитоплазми неурона и глија ћелија и одсуство експресије у ендотелним ћелијама, *CDV-NP*, *LSAB*+

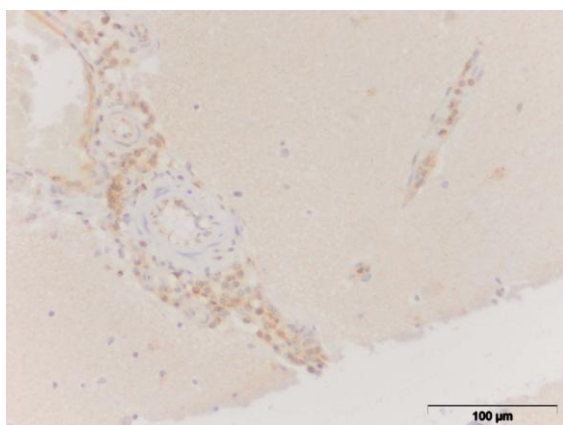


Слика 40. Мозак лисице, експресија *CDV-NP* антигена у цитоплазми неурона и глија ћелија, *CDV-NP*, *LSAB*+

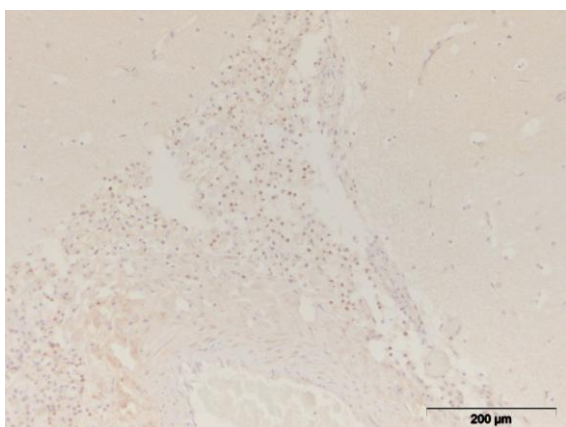
Узорци мозга лисица са утврђеним инфламаторним променама су имунохистохемијски испитани применом антитела против *CD3* рецептора Т лимфоцита и *CD21* рецептора Б лимфоцита како би се утврдило евентуално присуство и дистрибуција ових ћелија у запаљенском инфилтрату. У свим испитаним узорцима утврђено је присуство *CD3*⁺ Т лимфоцита у периваскуларним инфилтратима, посебно код узорака пореклом од две јединке са израженим инфламаторним променама. Интензитет позитивне реакције се кретао од слабог, са неколико позитивних ћелија, до јаког, где су већину инфламаторних ћелија чинили Т лимфоцити. Присуство *CD21*⁺ Б лимфоцита је такође утврђено у свим испитаним узорцима, али у виду појединачних позитивних ћелија које су се спорадично уочавале у нервном ткиву, док се њихово присуство у периваскуларним инфилтратима ретко уочавало.



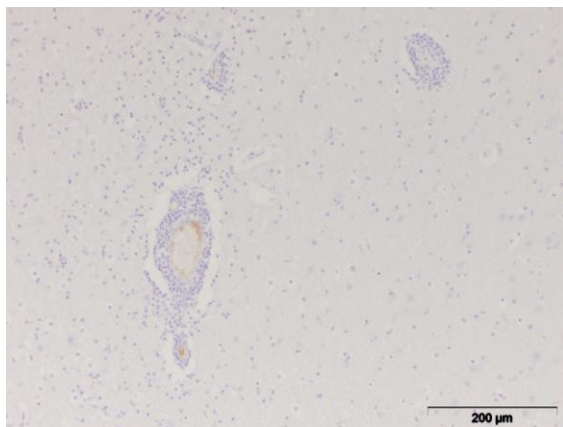
Слика 41. Мозак лисице, експресија *CD3* антигена ћелија периваскуларног инфилтрата, *CD3*, *LSAB*⁺



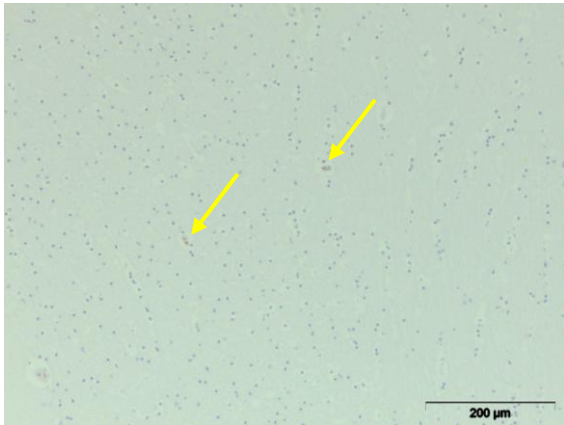
Слика 42. Мозак лисице, експресија *CD3* антигена интраваскуларних и ћелија периваскуларног инфилтрата, *CD3*, *LSAB*⁺



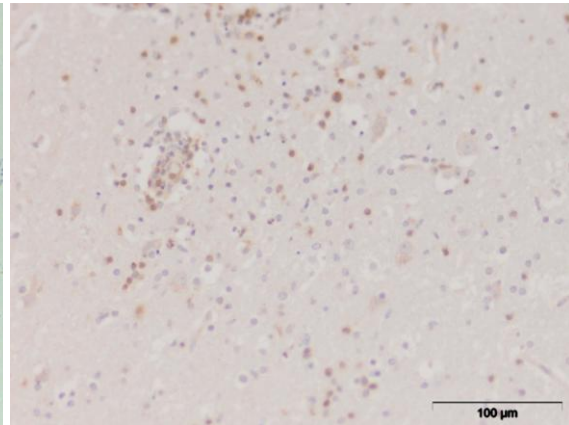
Слика 43. Мозак лисице, менингитис, одсуство експресије *CD3* антигена, *CD3*, *LSAB*⁺



Слика 44. Мозак лисице, одсуство експресије *CD21* антигена, *CD21*, *LSAB*⁺



Слика 45. Мозак лисице, спорадична експресија *CD21* антигена у неуропилу (стрелице), *CD21*, *LSAB*+



Слика 46. Мозак лисице, експресија *CD3* антигена у дифузном мононуклеарном инфилтрату, *CD3*, *LSAB*+

5.6. Резултати ланчане реакције полимеразе (*RT-PCR*)

Испитивањем узорака методом ланчане реакције полимеразе (*RT-PCR*) у агарозном гелу није утврђено присуство генома (гена који кодира синтезу нуклеопротеина) вируса штенећака.

5.7. Резултати статистичких анализа

Анализа добијених резултата урађена је у програму *GraphPad Prism 6.0*. Поређењем средњих вредности хистопатолошких промена између појединих сегмената мозга статистичком обрадом података методом анализе варијансе са интервалом поузданости од 95% ($p < 0,05$) утврђена је статистички значајна разлика са високом сигнификантношћу између добијених вредности промена фронталног сегмента мозга и региона хипокампуса ($p = 0,0028$). Такође, са интервалом поузданости од 95% утврђена је сигнификантност и између добијених вредности хистопатолошких промена исечака фронталног дела мозга и малог мозга ($p = 0,0333$). Поређењем осталих добијених вредности није утврђена

сигнификантна разлика у учесталости хистопатолошких промена различитих сегмената мозга (табела 6).

Табела 6. Резултати поређења средњих вредности хистопатолошких промена између појединих сегмената мозга са интервалом поузданости од 95% ($p < 0,05$) (printscreen)

1way ANOVA Multiple comparisons									
4									
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	FRONTALNA KORA vs. TALAMUS	1.150	-0.2526 to 2.553	No	ns	0.1320			
8	FRONTALNA KORA vs. HIPOKAMPUS	1.550	0.5004 to 2.600	Yes	**	0.0028			
9	FRONTALNA KORA vs. MALIMOZAK	2.650	0.1744 to 5.126	Yes	*	0.0333			
10	TALAMUS vs. HIPOKAMPUS	0.4000	-0.8805 to 1.680	No	ns	0.8159			
11	TALAMUS vs. MALIMOZAK	1.500	-0.8746 to 3.875	No	ns	0.3147			
12	HIPOKAMPUS vs. MALIMOZAK	1.100	-0.9893 to 3.189	No	ns	0.4680			
13									
14									
15	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
16									
17	FRONTALNA KORA vs. TALAMUS	5.450	4.300	1.150	0.4988	20	20	3.260	19
18	FRONTALNA KORA vs. HIPOKAMPUS	5.450	3.900	1.550	0.3733	20	20	5.872	19
19	FRONTALNA KORA vs. MALIMOZAK	5.450	2.800	2.650	0.8804	20	20	4.257	19
20	TALAMUS vs. HIPOKAMPUS	4.300	3.900	0.4000	0.4554	20	20	1.242	19
21	TALAMUS vs. MALIMOZAK	4.300	2.800	1.500	0.8445	20	20	2.512	19
22	HIPOKAMPUS vs. MALIMOZAK	3.900	2.800	1.100	0.7430	20	20	2.094	19

У статистичкој анализи са интервалом поузданости од 99% ($p < 0,01$) још увек постоји сигнификантна разлика у учесталости промена између фронталног сегмента и региона хипокампуса ($p = 0,0028$), док се губи значај у разлици вредности између фронталног дела мозга и малог мозга (табела 7).

Табела 7. Резултати поређења средњих вредности хистопатолошких промена између појединих сегмената мозга са интервалом поузданости од 99% ($p < 0,01$) (printscreen)

1way ANOVA Multiple comparisons									
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	6							
3	Alpha	0.01							
4									
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	99% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
6									
7	FRONTALNA KORA vs. TALAMUS	1.150	-0.6326 to 2.933	No	ns	0.1320			
8	FRONTALNA KORA vs. HIPOKAMPUS	1.550	0.2160 to 2.884	Yes	**	0.0028			
9	FRONTALNA KORA vs. MALIMOZAK	2.650	-0.4963 to 5.796	No	*	0.0333			
10	TALAMUS vs. HIPOKAMPUS	0.4000	-1.227 to 2.027	No	ns	0.8159			
11	TALAMUS vs. MALIMOZAK	1.500	-1.518 to 4.518	No	ns	0.3147			
12	HIPOKAMPUS vs. MALIMOZAK	1.100	-1.555 to 3.755	No	ns	0.4680			
13									
14									
15	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
16									
17	FRONTALNA KORA vs. TALAMUS	5.450	4.300	1.150	0.4988	20	20	3.260	19
18	FRONTALNA KORA vs. HIPOKAMPUS	5.450	3.900	1.550	0.3733	20	20	5.872	19
19	FRONTALNA KORA vs. MALIMOZAK	5.450	2.800	2.650	0.8804	20	20	4.257	19
20	TALAMUS vs. HIPOKAMPUS	4.300	3.900	0.4000	0.4554	20	20	1.242	19
21	TALAMUS vs. MALIMOZAK	4.300	2.800	1.500	0.8445	20	20	2.512	19
22	HIPOKAMPUS vs. MALIMOZAK	3.900	2.800	1.100	0.7430	20	20	2.094	19

Поређењем средњих вредности учесталости појаве инклузија статистичком обрадом података са интервалом поузданости од 95% ($p < 0,05$) није утврђена статистички значајна разлика између различитих сегмената мозга (табела 8).

Табела 8. Резултати поређења средњих вредности учесталости појаве инклузија између појединих сегмената мозга са интервалом поузданости од 95% ($p < 0,05$) (printscreen)

1way ANOVA								
Multiple comparisons								
1	Number of families	1						
2	Number of comparisons per family	6						
3	Alpha	0.05						
4								
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
6								
7	FRONTALNA KORA vs. TALAMUS	0.1667	-1.594 to 1.928	No	ns	0.9837		
8	FRONTALNA KORA vs. HIPOKAMPUS	0.6667	-1.158 to 2.491	No	ns	0.5756		
9	FRONTALNA KORA vs. MALI MOZAK	0.6667	-1.601 to 2.935	No	ns	0.7130		
10	TALAMUS vs. HIPOKAMPUS	0.5000	-0.7603 to 1.760	No	ns	0.5181		
11	TALAMUS vs. MALI MOZAK	0.5000	-1.345 to 2.345	No	ns	0.7567		
12	HIPOKAMPUS vs. MALI MOZAK	0.0	-0.9527 to 0.9527	No	ns	> 0.9999		
13								
14								
15	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q
16								DF
17	FRONTALNA KORA vs. TALAMUS	1.500	1.333	0.1667	0.4773	6	6	0.4939
18	FRONTALNA KORA vs. HIPOKAMPUS	1.500	0.8333	0.6667	0.4944	6	6	1.907
19	FRONTALNA KORA vs. MALI MOZAK	1.500	0.8333	0.6667	0.6146	6	6	1.534
20	TALAMUS vs. HIPOKAMPUS	1.333	0.8333	0.5000	0.3416	6	6	2.070
21	TALAMUS vs. MALI MOZAK	1.333	0.8333	0.5000	0.5000	6	6	1.414
22	HIPOKAMPUS vs. MALI MOZAK	0.8333	0.8333	0.0	0.2582	6	6	0.0

6. ДИСКУСИЈА

Иако је узрочник штенећака паса откривен још пре више од сто година, и убрзо након тога се започело са вакцинацијом, то је и данас једно од најважнијих обољења код ових животиња. Штенећак се јавља широм света и болест често завршава угинућем (Beineke и сар., 2009). Вирус показује лимфо-, неуро- и епителиотропизам па за последицу углавном има системску инфекцију са различитим клиничким симптомима (Lempp и сар., 2014; von Messling и сар., 2004). Клинички ток и патогенеза одговарају инфекцији вирусом малих богиња код људи, са појавом високе температуре, респираторних сметњи, осипа, лимфопеније и изражене имуносупресије са генерализованом деплецијом лимфног ткива током акутне фазе (von Messling и сар., 2006). Инфекција овим вирусом показује високу учесталост неуролошких компликација (Lempp и сар., 2014).

Ипак, за разлику од вируса малих богиња који се одржава у једној врсти, вирус штенећака доводи до појаве симптома код великог број различитих врста животиња (Frölich и сар., 2000; Deem и сар., 2000). Зато се последњих година све више говори о овој болести код различитих врста дивљих животиња. Клиничка слика и патоморфолошки налаз углавном одговарају оним код паса, али морбидитет и морталитет варирају од врсте до врсте (Beineke и сар., 2009). Код неких од њих ова болест има морталитет и до 100%, па на тај начин може угрозити опстанак појединих угрожених врста (Deem и сар., 2000; McCarthy и сар., 2007). Сматра се да су мутације *H* гена у вези са појавом ове болести код нових врста (Origgi и сар., 2012; Sattler и сар., 2014).

Да лисице могу оболети од штенећака зна се већ дуже време, још од када је Green 1926. године доказао вирус штенећака код лисица (Whitney и Whitney, 1953). Томе се није придавао велики значај. Међутим, поједина испитивања су показала да ове животиње могу представљати значајан резервоар вируса у природи. Та тврдња добија на значају ако се узме у обзир све чешћи контакт

лисица и паса, као последица уласка ових адаптивних предатора у насељена места у циљу искоришћавања лако доступних извора хране у градским и приградским срединама (Mackenstedt и сар., 2015; Bradley и Altizer, 2007). Црвена лисица је најраспрострањенији дивљи копнени месојед у многим земљама Европе (Wandeler и сар., 2003; Plumer и сар., 2014; Scott и сар., 2014). Циљеви овог рада били су испитивање постојања контакта дивље популације црвене лисице са вирусом штенећака детекцијом серолошки позитивних јединки, а потом и морфолошка испитивања евентуалних промена на мозгу позитивних јединки, имунохистохемијско потврђивање присуства вируса употребом моноклонског антитела и описивање његове дистрибуције у мозганом ткиву, одређивање карактера инфламаторног инфилтрата, молекуларно генетичка испитивања присуства вирусне РНК, као и одређивање степена демијелинизације специјалним бојењем. Пре свега тога је рађено испитивање узорака на присуство вируса беснила.

Беснило је заразна, смртоносна болест изазвана вирусом из рода *Lyssavirus*. Све топлокрвне животиње се сматрају пријемчивим, болест има велики зоонозни значај и представља важан проблем за јавно здравље (Neumann, 2014). Црвена лисица је идеалан и важан резервоар вируса беснила у Европи (Blancou, 1988). Хистопатолошке промене у мозгу лисица заражених вирусом беснила су у типу акутног негнојног енцефалитиса благог до умереног интензитета, са појавом периваскуларних моноклеарних инфилтрата, дифузне и фокалне глиозе, сателитозе и неуронофагије, серолимфоцитног лептоменингитиса и еозинофилних интрацитоплазматских инклузија (Негријева телашца) у неуронима (Васковић, 2015). Из ових разлога један од првих задатака био је искључивање узорака који потичу од лисица евентуално инфицираних вирусом беснила употребом директне имунофлуоресценције која представља стандардну методу која се користи у рутинској дијагностици ове болести (Malovrh и Hostnik, 2005).

Испитивањем отисак препарата наведених узорака мозга методом директне имунофлуоресценције ни код једне од 285 лисица није утврђено присуство вируса беснила. Од 2010. године, када започео програм оралне вакцинације лисица, број случајева беснила у Србији је значајно опао (Васковић, 2015). Ипак, према подацима „Пастеровог завода“ у Новом Саду, беснило се и даље спорадично

јавља код црвене лисице. Током последње две године у Србији је утврђен по један случај беснила код лисица, док је у периоду узорковања материјала за ова испитивања (септембар 2016. – септембар 2017.) беснило дијагностиковано код три јединке ове врсте (<https://sites.google.com/site/pasterovzavodnovisad/home/epizootija-besnila>).

Употребом индиректног имуноензимског теста од испитаних 68, присуство *IgG* антитела утврђено је код 25 узорака серума (36,8%). Слабо позитивне вредности титра имало је 17 (25,0%) узорака док је преосталих 8 (11,8%) имало средње вредности, док није било узорака са високим вредностима титра.

Основа серолошке дијагностике вирусних инфекција јесте доказивање сероконверзије или значајног повећања циркулишућих вирусних антитела током трајања болести (Bryan, 1987). У серолошкој дијагностици штенећака највише се користе *SNT*, тест индиректне имунофлуоресценције и имуноензимски тест (*ELISA*). Имуноензимски тест се може користити за детекцију *IgM* и *IgG* антитела. Повећање специфичности је постигнуто употребом рекомбинантног *N* протеина вируса као антигена (Barben и сар., 1999; von Messling и сар., 1999; Latha и сар., 2007a,b). Антитела против *N* и *P* протеина код паса се *ELISA* тестом могу утврдити већ 6 - 8 дана након инфекције (Green, 2012). За разлику од *IgM*, висок титар *IgG* може бити последица давне или актуелне инфекције вирусом или вакцинације (Barben и сар., 1999).

Серолошка детекција антитела представља сигуран показатељ контакта невакцинисане животиње са узрочником. Постоји више студија о серопреваленцији антитела против вируса штенећака код различитих врста лисица, и утврђени проценат се креће у распону од 0% (Amundson и Yuill, 1981; Ballard и сар., 2001; Martino и сар., 2004, Fiorello и сар., 2007) до високих 87% у популацији лисице са острва Санта Каталина (Timm и сар., 2009). Када су црвене лисице у питању утврђена серопреваленција се креће од 5% (Frölich и сар., 2000) до 33,3% (Almberg и сар., 2009), па тако серопреваленција од 36,8% добијена у овом испитивању представља једну од највиших до сада описаних.

Иако Damien и сар. (2002) наводе да *ELISA* детектује већи број антитела од серум неутрализационог теста, то се може рећи само у случају када се као антиген

користи комплетна вирусна партикула штенећака. Ово испитивање је рађено методом која као антиген користи рекомбинантни *N* протеин вируса, па како се ради о методи са већим степеном специфичности (Barben и сар., 1999; von Messling и сар., 1999; Latha и сар., 2007a,b) могу се очекивати и веће вредности позитивних резултата. Не постоје раније студије о серопреваленцији антитела против вируса штенећака код црвених лисица на територији Србије па се добијене вредности не могу упоредити. Ако се узму у обзир кратко време преживљавања вируса у спољашњој средини и потреба за блиским контактом да би дошло до преноса инфекције (Miller и сар., 2000) овако висока серопреваленција може да говори и о великој бројности популације црвене лисице на датом подручју. То се поклапа и са тенденцијом смањења броја случајева беснила, које значајно доприноси mortalitetу ове врсте (Müller T и сар., 1995).

Висок проценат серопреваленције антитела против вируса штенећака код црвене лисице и не чуди ако се узме у обзир да се ове животиње сматрају релативно отпорнијом врстом на ову болест (Amundson и Yuill, 1981) као и да имунитет након природне инфекције може да траје годинама (Green, 2012). Висок mortalitet доприноси умањењу стварне преваленције испитаних животиња (Billinis и сар., 2013) што може објаснити разлике у серопреваленцији различитих врста које живе на истом простору. Ове разлике могу бити веома изражене и унутар исте врсте о чему говоре резултати испитивања Sobrino и сар. (2008) који су утврдили серопреваленцију код црвених лисица од 7,8 до 26,4% у различитим деловима Шпаније.

На крају, овде треба истаћи и резултате добијене истраживањем црвених лисица у Немачкој. Denzin и сар. (2013) молекуларним методама утврђују преваленцију вируса штенећака од 33,7%, при чему вредност код животиња које су показивале знаке болести или сумњиво понашање износи 70,0 %. Како се у нашем истраживању ради о одстреленим јединкама немамо података да ли је нека од животиња показивала симптоме обољења. С обзиром на изражене хистопатолошке промене можданог ткива уочене код мањег броја јединки није искључено да би се пажљивим посматрањем уочили знаци неуролошких поремећаја. Висок проценат позитивних јединки говори о ензоотском карактеру вируса на испитаном простору.

Како је вирус неотпоран у спољашњој средини релативно висока преваленција антитела сугерише на ензоотску и непрекидну циркулацију вируса како између самих дивљих животиња тако и између дивљих животиња и паса (Åkerstedt и сар., 2010).

Макроскопским испитивањем мозга серолошки позитивних јединки није утврђено постојање патолошких промена на површини мозга нити на попречним пресецима. При описивању макроскопских патоморфолошких промена код лисица оболелих или уинулих од штенећака и велики број аутора не наводи промене централног нервног система (López-Peña и сар., 1994; Ferreyira и сар., 2009; Megid и сар., 2009, 2010; Giannitti и сар., 2012; Pore и сар., 2016). Макроскопске промене на мозгу код инфекције вирусом штенећака се ретко уочавају. Најчешће се уочава конгестија менингеалних крвних судова. У узнапредовалим случајевима штенећака услед израженог едема може се приметити отечен, увећан мозак са заравњеним наборима и суженим браздама, дилатацијом комора код повећаног притиска цереброспиналне течности, а у хроничној форми и малатична поља и каверне услед изражене некрозе (Summers и сар., 1995; Green и Vandeveld, 2012). Ипак, таква оштећења углавном за последицу имају и појаву изражених нервних симптома који, посебно код дивљих животиња, умногоме смањују могућност преживљавања. Из тог разлога, како се ради о уловљеним животињама у доброј кондицији нисмо очекивали да уочимо макроскопске промене. При том, појаву конгестије крвних судова менинги не бисмо могли да припишемо штенећаку с обзиром да се ради о устрелјеним животињама.

Микроскопским прегледом препарата бојених хематоксилин еозином утврђен је низ промена различитог дијагностичког значаја. Најзаступљеније промене су биле глиоза (84%), дегенерација неурона (80%) и сателитоза (64%). Стварање глијалних чворића утврђено је код 5 јединки (20%). Дегенерација Пуркинијевих ћелија уочена је код 14 животиња (64%).

Глиоза (реактивна глиоза) се састоји од активације и пролиферације глија ћелија (астроцита и микроглије) стимулираних различитим цитокинима као што су *IL-1*, *IL-6*, *TNF* (*tumor necrosis factor*, енг.). Глиоза је чест и неспецифичан

одговор неуроглије на различите видове оштећења можданог ткива. Поред запаљења, и исхемија, траума, токсични и други агенси могу изазвати активацију астроцита и микроглије (Norton и сар., 1992). Настанку анизоморфне глиозе (глијалних чворића) доприносе и ћелије из циркулације и ендogene глија ћелије мозга (Summers и сар., 1995).

Уколико се не ради о перакутним оштећењима, најважнија карактеристика дегенерације неурона је хетерогеност у изгледу (Garmin, 2011). У светлосној микроскопији они могу бити смањени, са интензивно еозинофилном цитоплазмом, малим хиперхроматичним једром (*karyopyknosis*) и његовом фрагментацијом (*karyolysis*), или повећани, едематозни, са периферно постављеним некробиотичним једром, светлоеозинофилном, некада вакуолизованом цитоплазмом и хроматолизом. Хетерогеном изгледу доприноси чињеница да се неурони углавном виде у различитим фазама дегенерације (Garmin, 2011).

Хроматолиза је термин који се користи да опише оштећење неурона при којем долази до разлагања Нислове супстанце (телашаца) у цитоплазми, која представља агрегате гранулисаног ендоплазматског ретикулума и слободних полирибозома. Јавља се код различитих неуролошких стања, као што су инфекције неуротропним вирусима, дисаутономија, урођене и стечене дистрофије, оштећење аксона (Summers и сар., 1995). Централна хроматолиза неурона унутар оливарних, понтинских и супраоптичких једара се сматра нормалним налазом (Summers и сар., 1995). Централна, периферна или потпуна хроматолиза ван ових локација се сматра значајном морфолошком променом која се јавља код великог броја различитих обољења ЦНС-а (Wohlsein и сар., 2012).

Појава вакуола у цитоплазми неурона је манифестација вакуоларне дегенерације која може бити изазвана различитим етиолошким агенсима. Треба истаћи да је присуство цитоплазматских вакуола описано и у неуронима здравих јединки у појединим структурама мозга (црвено и хабенуларно једро, ретикуларна формација) и кичмене мождине одраслих говеда и оваца (McGill и Wells, 1993; Summers и сар., 1995; Gavier-Widen и сар., 2001). Вакуолизација неурона описана је и код ракуна у једрима можданог стабла и неуронима мозга без уочених знакова

обољења (Hamir и Fischer, 1999). Ипак, Krinke (2011) истиче да, иако се могу јавити спонтано током процеса старења, вакуоле у цитоплазми неурона представљају неспецифичан налаз који врло често претходи ћелијској смрти.

Сателитоза представља пролиферацију глија ћелија и њихову агрегацију око тела неурона. Перинеуралне сателитске ћелије већином чине олигодендроцити (Graeber и сар., 2002). Ове ћелије се налазе у тзв. "сателитском простору", којим се сматра оквир од 6 μm ширине око тела неурона (Ogawa и сар., 1985). Ипак, перинеуралне ћелије могу бити и астроцити и микроглија ћелије (Summers и сар., 1995). Број сателитских перинеуронских олигодендроцита варира у зависности од врсте и региона мозга, па се често могу наћи у спиналним и тригеминалним ганглијама где се сматрају нормалним налазом и доприносе метаболичкој функцији нервних ћелија. Ипак, сателитоза се јавља и секундарно услед дегенерације неурона и претходи неуронофагији, која се карактерише уклањањем фрагмената некротичних неурона од стране макрофага (Wohlsein и сар., 2012).

Запаљенске промене различитог степена интензитета уочене су код 12 животиња (48%). У највећој мери ови инфилтрати су били сачињени од 1 до 3 слоја моноклеарних ћелија, док је тек код две јединке уочена појава инфилтрата који су били дебљи од 3 слоја ћелија. Менингитис је утврђен код 4 животиње. Једно од главних обележја инфекције неуротропним вирусима јесте карактеристична тријада коју чине дегенерација и некроза неурона, глиоза са појавом микроглијалних чворића и периваскуларни инфилтрати запаљенских ћелија (Vandeveldelde и сар., 2012). Као последица имуносупресивног дејства вируса инфламаторни одговор код инфекције штенећаком варира у великој мери. Одсуство интрацеребралних инфламаторних ћелија је карактеристика почетних фаза инфекције као последица изражене деплеције лимфатичног ткива, док се појава лимфоцитног периваскуларног менингоенцефалитиса везује за њихов опоравак и репулацију (Krawowka и сар., 1980; Summers и Appel, 1994; Wünschmann и сар., 1999). Тако, Pore и сар. (2016) описују појаву благог лимфоцитног периваскуларног енцефалитиса, док López-Рења и сар. (1994) не уочавају присуство периваскуларног инфилтрата у мозгу црвених лисица, али наводе да је присутна лимфоцитна деплеција слезине и лимфних чворова.

Имунохистохемијским испитивањима доказано је да се у периваскуларним инфилтратима у различитој мери налазе *CD3+* Т лимфоцити, некада чинећи главну популацију инфламаторних ћелија, док се *CD21+* Б лимфоцити ретко уочавају, и то углавном као појединачне ћелије које се спорадично срећу у можданом ткиву. Интрацеребрални имуни одговор код природног демиелинизујућег леукоенцефалитиса изазваног вирусом штенећака је превасходно Т ћелијски (Alldinger и сар., 1996; Wünschmann и сар., 1999). Дистрибуција различитих подтипова Т ћелија код енцефалитиса изазваног вирусом штенећака варира у великој мери у зависности од типа плака и дела ЦНС-а, па се може рећи да испољава плак-специфичну временску и просторну дистрибуцију (Wünschmann и сар., 1999). У мозгу са акутним и субакутним неинфламаторним енцефалитисом уочава се мали број насумично распоређених *CD8+* Т ћелија, док се у каснијим фазама болести (субакутни инфламаторни и хронични енцефалитис) ове ћелије срећу унутар и око лезија смештених у неуропилу, док се у периваскуларним инфилтратима уочавају *CD4+* Т лимфоцити и Б ћелије (Wünschmann и сар., 1999). Различит проценат ћелија које сачињавају периваскуларни инфилтрат није експримирао ни *CD3* ни *CD21* антигене. Исто наводе и други аутори, сматрајући да се ради о ендотелним ћелијама, макрофагима, још неутврђеним моноклеарним ћелијама, лимфоцитима са недовољно експримираним површинским антигенима, или другим типовима лимфоцита (*NK* ћелије, $\gamma\delta$ Т ћелије) (Fowlkes и Pardoll, 1989; Wünschmann и сар., 1999). Такође, уочени глијални чворићи нису експримирали нити један од испитаних антигена лимфоцитне ћелијске диференцијације, што указује да се ради о микроглији и/или макрофагима.

Вакуоларна дегенерација (спонгиоза) обухвата вакуолизацију неуропила и везикулизацију мијелинских омотача (Summers и сар., 1995). Осим као последица интрамијелинског едема, јавља се и код спонгиформних стања (вируси, прион протеини, токсини), спонгиформних мијелинопатија, метаболичких промена, дистрофија лизозома, или као последица неадекватне фиксације и обраде ткива (замрзавање, аутолиза, висока концентрација алкохола) (Garman, 2011; Wohlsein и сар., 2012). Знаци демиелинизације утврђени су код 9 јединки (36%), у највећој мери присутни у белој маси малог мозга. У исечцима бојеним хематоксилином и

еозином видели су се као поља слабо до умерено изражене вакуолизације беле масе, са огољеним, јасно видљивим аксонима, док су се хистохемијским бојењем препарата луксол фаст плавом поред оптички празних простора видела и поља са слабијим интензитетом плаве боје, али без присуства макрофага са *LFB* позитивним материјалом у цитоплазми. Одсуство или присуство појединачних *LFB* позитивних макрофага говори да се ради о инактивној или слабо активној демиелинизацији (Wünschmann и сар., 1999). Демиелинизација представља двофазни процес, чија иницијација се приписује директном дејству вируса упоредо са његовом репликацијом у глија ћелијама беле масе док прогресија представља имунопатолошки процес (Vandeveldelde и сар., 1985b; Baumgärtner и сар., 1989; Zurbriggen и сар., 1993; Summers и Appel, 1994; Alldinger и сар., 1996; Baumgärtner и Alldinger, 2005). Узимајући у обзир горе наведено, и чињеницу да не постоји изражен моноклеарни инфилтрат у пределима демиелинизације, можемо рећи да се још увек ради о акутном до субакутном процесу када је демиелинизација у највећој мери последица вирусом изазване метаболичке дисфункције глија ћелија и едема мијелинског омотача. И други аутори описују демиелинизацију код лисица инфицираних вирусом штенећака (Megid и сар., 2009, 2010), при чему López-Рења и сар. (1994) демиелинизујући енцефалитис наводе као доминантну лезију код свих испитаних инфицираних црвених лисица.

Једна од хистолошких карактеристика инфекције вирусом штенећака је појава округлих до овалних, ацидофилних инклузија, промера 1-5 μm , које се најчешће уочавају у епителним ћелијама слузница, леукоцитима, глија ћелијама и неуронима (López-Рења и сар., 1994; Timm и сар., 2009; Megid и сар., 2010; Giannitti и сар., 2012; Green и Vandeveldelde, 2012). Могу бити интрацитоплазматске и интрануклеарне. Хистохемијска испитивања показују да их сачињавају накупине вирусног нуклеокапсида, *HSP* протеини (*heat shock proteins*, енг.) и оштећени делови ћелије који се јављају као последица вирусне инфекције (Oglesbee и Krakowka, 1993). У нашем испитивању присуство инклузија утврђено је у астроцитима код 5 животиња (20%), неуронима код 4 (16%), епендимским ћелијама код 3 (12%) и код по 1 животиње (4%) у олигодендроцитима, ендотелним и Пуркинијевим ћелијама. Ситне, овалне, еозинофилне инклузије су се у највећој мери уочавале у цитоплазми наведених ћелија, док су ретке

интрануклеарне инклузије биле присутне у неуронима. Периферни хало се ретко уочавао и није био проминентан. Иако је највећи број инклузија био присутан у исечку фронталне регије није уочена статистички значајна разлика у учесталости појаве инклузија у различитим испитаним регионима мозга. Појаву инклузија код лисица инфицираних вирусом штенећака описују и други аутори (López-Reña и сар., 1994; Timm и сар., 2009; Megid и сар., 2010; Giannitti и сар., 2012). López-Reña и сар. (1994) истичу да је налаз инклузија битан у постављању дијагнозе штенећака, али да није патогномоничан. Дијагностички значај ових инклузија је упитан, јер представља несталан и неспецифичан налаз, који се лако превиди па се јављају лажно негативни резултати (Green и Vandeveld, 2012).

Код 6 јединки (24%) уочена су овална, јасно ограничена расветљења у једрима неурона, која, осим афинитета према еозину, у потпуности морфолошки одговарају инклузијама које се јављају код инфекције вирусом штенећака. Да ли се стварно ради о инклузијама, њихов значај и разлог зашто се не боје *HE* методом није нам познато, нити се у литератури помињу сличне промене. Чињеница да се оне појављују код више јединки, у различитим исечцима и после поновног бојења умањује вероватноћу да се ради о артефакту. Green и Vandeveld (2012) истичу да се инклузије могу уочити одређено време (5-6 недеља) након инфекције вирусом штенећака, али се нигде не наводи шта се са њима дешава након тога, и да ли у потпуности ишчезавају.

Поред набројаних, у различитом степену уочавале су се и друге промене, као што су едем (32%), умножавање крвних судова (16%), појава ситних хеморагичних поља (16%), стварање синцицијума (12%) и дегенерација ћелија хориоидног плексуса (16%), астроцитоза (4%) и калцификација (4%).

Едем мозга се у различитом степену јавља током свих оштећења мозга без обзира на узрок. Едем се јавља и у сивој маси, али је углавном јаче изражен у подручју беле моздане масе (Summers и сар., 1995). У подручјима малације, посебно сиве масе, као одговор на оштећење јавља се оток и хиперплазија ендотелних ћелија капилара, често са утиском њихове пролиферације (Summers и сар., 1995). Екстравазација мале количине еритроцита се јавља као пропратна појава различитих патолошких стања. Њихов дијагностички значај у овом случају

још више умањује чињеница да се ради о насилној смрти испитаних животиња. Да се ради о акутним крвављењима говори и недостатак сидерофага у подручју ових екстравазата. Поред хематогеног ширења, вирус у мождано ткиво доспева и путем цереброспиналне течности, па су епендимске и епителне ћелије хориоидних сплетова међу првима које бивају инфициране и последично могу да дегенеришу и подлежу некрози. Некада *H* и *F* гликопротеини вируса иницирају фузију инфицираних ћелија доводећи до стварања синцицијума (von Messling и сар., 2005). Као једна од карактеристика инфекције вирусом штенећака налаз синцицијума ових ћелија може бити од значаја при постављању дијагнозе у стандардној хистопатологији. Астроглиоза представља вид глиозе, где долази до активације, хиперплазије и хипертрофије астроцита. Калцификација, како метастатска тако и дистрофична, јавља се у процесима старења као и код великог броја различитих локалних и системских поремећаја. Без обзира на учесталост и интензитет, све набројане промене су неспецифичне јер се јављају као одговор на оштећење код великог броја разлитих патолошких стања. Иако нам говоре да постоји оштећење можданог ткива, њихов значај у дијагностици штенећака код црвених лисица је мали.

Имунохистохемијско доказивање вирусних антигена представља једну од најкориснијих метода за постављање дефинитивне дијагнозе штенећака (Newicker и сар., 1990). У овом испитивању, употребом моноклонских антитела против вирусног нуклеопротеина (*CDV-NP*), дефинитивно је доказана инфекција свих испитаних животиња вирусом штенећака. Позитивна реакција, у виду различите количине гранулисаног преципитата смеђе боје, дифузно је уочена у неуронима и глија ћелијама, епендимским и епителним ћелијама хориоидних плексуса. Позитивна реакција је била умереног до јаког интензитета. Преципитат се готово искључиво могао уочити у цитоплазми ових ћелија. Такође, уочено је местимично нагомилавање преципитата у позитивним ћелијама, које обликом и величином одговара интрацитоплазматским инклузијама примећеним бојењем хематоксилином и еозином. Треба истаћи да у ендотелним ћелијама није уочено присуство позитивног материјала што може да говори да је инфекција наступила путем цереброспиналне течности. У прилог томе иде и изражена позитивна реакција епендимских и ћелија хориоидних сплетова. Ипак, није уочен јачи

интензитет позитивне реакције субependимално у односу на остатак паренхима мозга. Детекција вирусног антигена у ендотелним ћелијама и интраваскуларним леукоцитима указује на виремију (Frisk и сар., 1999). Слично резултатима овог рада, López-Рећа и сар. (1994), такође код црвених лисица, уочавају позитиван материјал углавном у цитоплазми, између осталих, еependимских и глија ћелија. Ипак, они описују позитивну реакцију и ендотелних ћелија, не наводећи којих органа. Такође, они истичу да се епител респираторног и дигестивног система показао као најбоље место за утврђивање присуства антигена вируса штенећака.

Ланчаном реакцијом полимеразе (*RT-PCR*) може се установити присуство вируса у респираторним секретима, цереброспиналној течности, фецесу, урину, пуној крви, конјунктивалним и брисевима из ока, док се након смрти могу користити и узорци многих унутрашњих органа као и узорци из парафинских калупа. У овом истраживању испитивањем узорака методом ланчане реакције полимеразе у агарозном гелу није утврђено присуство генома (гена који кодира синтезу нуклеопротеина) вируса штенећака. Овакав резултат није у складу са нашим очекивањем да се утврди присуство вирусне РНК посебно након позитивних серолошких и имунохистохемијских испитивања. Ипак, негативан резултат молекуларних испитивања не искључује штенећак (Kapil и Yeary, 2011). Осетљивост молекуларних метода зависи од природе узорака, метода екстракције вирусне нуклеинске киселине и избора прајмера (Saito и сар., 2006). Како је сакупљање узорака рађено током 2016/17. године а молекуларна испитивања крајем 2018. године може се претпоставити да је, услед познате нестабилности РНК, дошло до њене деградације и смањења укупне количине у испитиваном материјалу. Овакав налаз посебно је значајан за интерпретацију лажно негативних резултата у молекуларној дијагностици указујући на неопходност примене метода различите осетљивости и специфичности у доказивању вируса у ткиву оболеле јединке.

Lepp и сар. (2017) испитујући присуство узрочника инфективних болести код дивљих животиња на северу Немачке утврђују енцефалитис код 11,4% црвених лисица са морфологијом лезија које јасно указују на вирусну етиологију. Серолошки доказују присуство антитела против штенећака код једне јединке док имунохистохемијски и молекуларним методама не успевају да докажу присуство

нити једног познатог вируса који изазива енцефалитис код месоједа. Овакви резултати указују да је мало вероватно да се ради о већој количини вируса присутној у испитаном ткиву (Prachayangprecha и сар., 2014), али да се не може искључити инфекција малом количином вируса која би се могла установити новијим и напреднијим молекуларним методама (Lempp и сар., 2017). Сличан проблем имали су Bourg и сар. (2016) који од 16 црвених лисица са израженим хистопатолошким променама које указују на вирусни енцефалитис доказују вирус штенећака код 6 јединки, док су имунохистохемијска и молекуларна испитивања преосталих 10 животиња била негативна. Негативан резултат не искључује вирусну инфекцију, која се могла одиграти пре одређеног времена након чега је имуни систем успео да уклони вирус, или је при томе дошло до активације аутоимуних механизма, молекуларне мимикрије и/или промене епитопа, доводећи до касних последица пређашње вирусне инфекције (Schwab и сар., 2007). Ипак, за разлику од њихових, у овом испитивању постоји имунохистохемијски установљено присуство вирусних антигена.

Shin и сар. (1995) испитујући присуство РНК вируса штенећака *RT-PCR* методом у моноклеарним ћелијама периферне крви код паса позитивну реакцију утврђују код 53% животиња, при чему ова дијагноза није потврђена нити била у вези са резултатима хистопатолошких и имунохистохемијских испитивања и методама изолације вируса. Узорци серума и пуне крви животиња код којих је дистрибуција вирусних антигена ограничена на ЦНС показују варијабилне резултате употребом *RT-PCR* методе (Frisk и сар., 1999). Они истичу да се негативни или слабо позитивни резултати чешће срећу код паса са нервном формом штенећака и експресијом вирусних антигена ограниченом на ЦНС. Осетљивост *RT-PCR* методе варира између појединих прајмера у зависности од њихове позиције унутар гена, а као последица аутолитичне разградње вирусне РНК услед ослобађања ендогених нуклеаза могу се јавити лажно негативни резултати (Frisk и сар., 1999). Како је највећи број тихих мутација (замена нуклеотида) уочен код животиња са хроничним лезијама у мозгу Frisk и сар. (1999) наговештавају да можда постоји корелација између измена у секвенцама гена нуклеопротеина вируса штенећака и његове перзистенције. Поставља се питање да ли су овакве мутације довољне да доведу до лажно негативних

результата у случају испитивања присуства тих нуклеинских секвенци. Детекција вируса штенећака *RT-PCR* методом није задовољавајућа током почетне и крајње фазе инфекције (Kim и сар., 2001). Salas и сар. (2018) наводе могућност лажно негативних резултата као последицу људског фактора (неправилно подешени инструменти, контаминација узорака, недефинисан дијагностички протокол који има ниску осетљивост), искуства у откривању нуклеинске киселине *H* гена (због високе нуклеотидне варијабилности) или због нестабилности вирусне РНК.

7. ЗАКЉУЧЦИ

1. Испитивањем узорака мозга црвених лисица методом директне имунофлуоресценције није утврђено присуство јединки позитивних на беснило, што је очекиван налаз услед вишегодишње вакцинације лисица против ове болести.
2. Испитивањем узорака серума црвених лисица имуноензимским тестом (индиректна *ELISA*) присуство антитела против вируса штенећака утврђено је код 36,8% животиња. Овако висока серопреваленција говори о ензоотском карактеру вируса штенећака на испитиваном подручју. Није утврђен утицај висине титра антитела на израженост патоморфолошких промена.
3. Макроскопским испитивањем површине и попречних пресека различитих делова мозга серолошки позитивних црвених лисица није установљено присуство промена, и поред изражених хистопатолошких промена код неких јединки.
4. Микроскопске промене на мозгу црвених лисица код инфекције вирусом штенећака су у типу негнојног паненцефалитиса и демјелинизујуег леукоенцефалитиса. Глиоза је била присутна код 84% серолошки позитивних јединки, претежно у белој маси предњих и средњих делова мозга. Дегенерација неурона, која се карактерисала ћелијским едемом, кариопикнозом и кариолизом, хиперезинофилијом, централном хроматолизом, дислокацијом једра ка периферији, као и вакуолизацијом једра и/или цитоплазме, запажена је код 80% серолошки позитивних лисица. Присуство цитоплазматских и једарних инклузија утврђено је у највећој мери у астроцитима (20%) и неуронима (16%). Хистопатолошке промене у мозгу лисица инфицираних вирусом штенећака не разликују се од других вирусних енцефалитиса лисица.
5. Сви испитани узорци мозга серолошки позитивних лисица показали су позитивну реакцију против вирусног нуклеопротеина (*CDV-NP*) умереног до јаког интензитета у глија ћелијама и неуронима, епендимским и ћелијама

хориоидних сплетова. Имунохистохемијско утврђивање присуства антигена вируса штенећака (*CDV-NP*) у ткивним исечцима парафинских калупа узорака мозга представља поуздан метод за доказивање инфекције вирусом штенећака код црвених лисица. Позитивна реакција се уочавала у цитоплазми набројаних ћелија у свим сегментима мозга.

6. Присуство Т ћелија утврђено је у највећој мери у моноклеарним периваскуларним инфилтратима, где су повремено чиниле највећи део ћелијске популације. Присуство Б ћелија утврђено је у виду појединачних ћелија у неуропилу док оне нису уочене у периваскуларним инфилтратима. У глијалним чворићима није уочено присуство ћелија лимфоцитне лозе.
7. Знаци демиелинизације уочени су код 36% серолошки позитивних црвених лисица и били су најизраженији у белој маси малог мозга. Степен демиелинизације беле мождане масе код црвених лисица инфицираних вирусом штенећака утврђиван је применом *LFB* методе која открива подручја демиелинизације која се не виде бојењем ткива хематоксилином и еозином.
8. Употребом молекуларно-генетичке методе (*RT-PCR*) није утврђено присуство вирусне РНК у испитиваним узорцима. Овакав налаз посебно је значајан за интерпретацију лажно негативних резултата у молекуларној дијагностици указујући на неопходност примене метода различите осетљивости и специфичности у доказивању вируса у ткиву оболеле јединке.
9. Поређењем средњих вредности хистопатолошких промена између појединих сегмената мозга статистичком обрадом података са интервалом поузданости од 95% ($p < 0,05$) утврђена је статистички значајна разлика са високом сигнификантношћу између добијених вредности промена фронталног сегмента мозга и региона хипокампуса ($p = 0,0028$), као и сигнификантност између добијених вредности хистопатолошких промена исечака фронталног дела мозга и малог мозга ($p = 0,0333$). Из тог разлога, за дијагностику инфекције вирусом штенећака црвених лисица увек би требало узети узорке фронталног режња мозга.

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Acosta-Jamett G, Chalmers WS, Cunningham AA, Cleaveland S, Handel IG, BRonsvoort BM: Urban domestic dog populations as a source of canine distemper virus for wild carnivores in the Coquimbo region of Chile. *Veterinary Microbiology*, 2011, 152: 247-257.
2. Åkerstedt J, Lillehaug A, Larsen IL, Eide NE, Arnemo JM, Handeland K: Serosurvey for canine distemper virus, canine adenovirus, *Leptospira interrogans*, and *Toxoplasma gondii* in free-ranging canids in Scandinavia and Svalbard. *Journal of Wildlife Diseases*, 2010, 46(2): 474-480.
3. Alexander KA, Appel MJG: African wild dogs (*Lycaon pictus*) endangered by a canine distemper epizootic among domestic dogs near the Masai Mara National Reserve. *Journal of Wildlife Diseases*, 1994, 30: 481-485.
4. Alexander KA, McNutt JW, Briggs MB, Standers PE, Funston P, Hemson G, Keet D, van Vuuren M: Host pathogens and carnivore management in southern Africa. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2010, 33: 249-265.
5. Alldinger S, Baumgärtner W, Örvell C: Restricted expression of viral surface proteins in canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathologica*, 1993b, 85: 635-645.
6. Alldinger S, Baumgärtner W, van Moll P, Örvell C: *In vivo* and *in vitro* expression of canine distemper viral proteins in dogs and non-domestic carnivores. *Archives of Virology*, 1993a, 132: 421-428.
7. Alldinger S, Wünschmann A, Baumgärtner W, Voss C, Kremmer E: Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis. *Acta Neuropathologica*, 1996, 92: 273-280.
8. Almberg ES, Mech LD, Smith DW, Sheldon JW, Crabtree RL: A serological survey of infectious disease in Yellowstone National Park's canid community. *PloS One*, 2009, 4: e7042.
9. Amude AM, Alfieri AA, Alfieri AF: Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Research in Veterinary Science*, 2007, 82: 416-422.
10. Amundson TE, Yuill TM: Prevalence of selected pathogenic microbial agents in the red fox (*Vulpes fulva*) and gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*) of southwestern Wisconsin. *Journal of Wildlife Diseases*, 1981, 17: 17-22.
11. Appel MJ, Gillespie JH: Canine distemper virus. In: Gard S, Hallauer C, Meyer KF (Eds.), *Virology Monographs*, vol. 11, 1972, Springer, New York, pp. 1-96.
12. Appel MJ, Mendelson SG, Hall WW: Macrophage Fc receptors control infectivity and neutralization of canine distemper virus-antibody complexes. *Journal of Virology*, 1984, 51: 643-649.
13. Appel MJ, Reggiardo C, Summers BA, Pearce-Kelling S, Maré CJ, Noon TH, Reed RE, Shively JN, Örvell C: Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). *Archives of Virology*, 1991, 119: 147-152.

14. Appel MJ, Sheffy BE, Percy DH, Gaskin JM: Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 1974, 34: 1459-1463.
15. Appel MJ, Shek WR, Summers BA: Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. *Infection and Immunity*, 1982, 37: 592-600.
16. Appel MJ, Yates RA, Foley GI, Bernstein JJ, Santinelli S, Spelman LH, Miller LD, Arp LH, Anderson M, Barr, et al: Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1994, 6: 277-288.
17. Appel MJ: Distemper pathogenesis in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1970, 156: 1681-1684.
18. Appel MJ: Pathogenesis of canine distemper. *American Journal of Veterinary Research*, 1969, 30: 1167-1182.
19. Appel MJ: Virus infections of carnivores. 1st ed., Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1987, 500 pp.
20. Armstrong JA, Froelich EJ: Inactivation of viruses by benzalkonium chloride. *Applied Microbiology* 1964, 12: 132-137.
21. Armstrong WH, Anthony CH: An epizootic of canine distemper in a zoological park. *Cornell Vet*, 1942, 32: 286-288.
22. Axthelm M, Krakowka S: Canine distemper virus: the early blood-brain barrier lesion. *Acta Neuropathologica*, 1987, 75: 27-33.
23. Ballard WB, Follmann EH, Ritter DG, Robards MD, Cronin MA: Rabies and canine distemper in an arctic fox population in Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, 2001, 37: 133-137.
24. Barben G, Stettler M, Jaggy A, Vandeveld M, Zubriggen A: Detection of IgM antibodies against a recombinant nucleocapsid protein of canine distemper virus in dog sera using a dot-blot assay. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A*, 1999, 46: 115-121.
25. Bathen-Nöthen A, Stein VM, Puff C, Baumgärtner W, Tipold A: Magnetic resonance imaging findings in acute canine distemper virus infection. *Journal of Small Animal Practice*, 2008, 49: 460-467.
26. Baumgärtner W, Alldinger S, Beineke A, Gröters S, Herden C, Kaim U, Müller G, Seeliger F, van Moll P, Wohlsein P: Das Staupevirus – ein Erreger auf der Suche nach neuen Wirten. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 2003, 110: 137-142.
27. Baumgärtner W, Alldinger S, Gaedke K, Moritz A: Metaphyseal osteosclerosis in young dogs with naturally occurring distemper. *European Journal of Veterinary Pathology*, 1996, 2: 23-32.
28. Baumgärtner W, Alldinger S: The pathogenesis of canine distemper virus induced demyelination – a biphasic process. In: Lavi E, Constantinescu CS (eds.), *Experimental models of multiple sclerosis*. Springer, New York, 2005, pp. 871-887.
29. Baumgärtner W, Örvell C, Reinacher M: Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues. *Acta Neuropathologica*, 1989, 78: 504-512.
30. Baumgärtner W: Virale Infektionskrankheiten bei Welpen und Junghunden unter besonderer Berücksichtigung der Staupevirusinfektion. *Der Praktische Tierarzt*, 1993, 74: 26-32.

31. Beineke A, Baumgärtner W, Wohlsein P: Cross-species transmission of canine distemper virus – an update. *One Health*, 2015, 1: 49-59.
32. Beineke A, Puff C, Seehusen F, Baumgärtner: Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, 127: 1-18.
33. Belsare AV, Vanak AT, Gompper ME: Epidemiology of viral pathogens of free-ranging dogs and indian foxes in a human-dominated landscape in Central India. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2014, 61(1): 78-86.
34. Berentsen AR, Dunbar MR, Becker MS, M'Soka J, Droge, Sakuya NM, Matandiko W, McRobb R, Hanlon CA: Rabies, canine distemper and canine parvovirus exposure in large carnivore communities from two Zambian ecosystems. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 2013, 13: 643-649.
35. Billinis C, Valiakos G, Athanasiou LV, Mamuris Z, Birtsas P, Spyrou V: Phylogenetic analysis of canine distemper viruses from red foxes, Greece. *Veterinary Record*, 2013, 173: 194.
36. Bittegeko SB, Arnbjerg J, Nkya R, Tevik A: Multiple dental developmental abnormalities following canine distemper infection. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 1995, 31: 42-45.
37. Blakemore WF, Summers BA, Appel MG: Evidence of oligodendrocyte infection and degeneration in canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathologica*, 1989, 77: 550-553.
38. Blancou J: Dog distemper: imported into Europe from South America? *Historia Medicinae Veterinariae*, 2004, 29: 35-41.
39. Blancou J: Ecology and epidemiology of fox rabies. *Reviews of Infectious Diseases*, 1988, 10: 606-614.
40. Blixenkron-Möller M, Pedersen IR, Appel MJ, Griot C: Detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1991, 3: 3-9.
41. Blixenkron-Möller M, Svansson V, Have P, Botner A, Nielsen J: Infection studies in mink with seal-derived morbillivirus. *Archives of Virology*, 1989, 106: 165-170.
42. Blixenkron-Möller M: Detection of intracellular canine distemper virus antigen in mink inoculated with an attenuated or a virulent strain of canine distemper virus. *American Journal of Veterinary Research*, 1989, 50: 1616-1620.
43. Bourg M, Nobach D, Herzog S, Lange-Herbst H, Nessler A, Hamann HP, Becker S, Hoper D, Hoffmann B, Eickmann M, Herden C: Screening red foxes (*Vulpes vulpes*) for possible viral causes of encephalitis. *Virology Journal*, 2016, 13: 151.
44. Bradley CA, Altizer S: Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends in Ecology & Evolution*, 2007, 22: 95-102.
45. Bryan JA: The serologic diagnosis of viral infection. An update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 1987, 111: 1015-1023.
46. Bürge T, Griot C, Vandeveld M, Peterhans E: Antiviral antibodies stimulate production of reactive oxygen species in cultured canine brain cells infected with canine distemper virus. *Journal of Virology*, 1989, 63: 2790-2797.

47. Bush M, Montali RJ, Brownstein D, James AE, Appel MJ: Vaccine-induced canine distemper in a lesser panda. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1976, 169: 959-960.
48. Cammer W, Bloom BR, Norton WT, Gordon S: Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages: a possible mechanism of inflammatory demyelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1978, 75: 1554-1558.
49. Caswel JL, Williams KJ: Respiratory system. In: Grant Maxie M (Ed.), *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 5th ed. Elsevier Saunders, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, pp. 635-636.
50. Cerruti-Sola S, Kristensen F, Vandeveld M, Bichsel P, Kihm U: Lymphocyte responsiveness to lectin and myelin antigens in canine distemper infection in relation to the development of demyelinating lesions. *Journal of Neuroimmunology*, 1983, 4: 77-90.
51. Cherpillod P, Tipold A, Griot-Wenk M, Cardozo C, Schmid I, Fatzer R, Schobesberger M, Zurbriggen R, Bruckner L, Roch F, Vandeveld M, Wittek R, Zurbriggen A: DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper. *Vaccine*, 2000, 18: 2927-2936.
52. Cleaveland S, Appel MG, Chalmers WS, Chillingworth C, Kaare M et al.: Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. *Veterinary Microbiology*, 2000, 72: 217-227.
53. Clifford DL, Mazet JA, Dubovi EJ, et al.: Pathogen exposure in endangered island fox (*Urocyon littoralis*) populations: Implication for conservation management. *Biological Conservation*, 2006, 131: 230-243.
54. Cornwell HJ, Thompson H, McCandlish IA, McCartney L, Nash AS: Encephalitis in dogs associated with a batch of canine distemper (Rockborn) vaccine. *Veterinary Record*, 1988, 122: 54-59.
55. Cypher BL, Scrivner JH, Hammer KL, O'Farrell TP: Viral antibodies in coyotes from California. *Journal of Wildlife Diseases*, 1998, 34: 259-264.
56. Damien B, Martina B, Losch S, Mossong J, Osterhaus A, Muller C: Prevalence of antibodies against canine distemper virus among red foxes in Luxembourg. *Journal of Wildlife Diseases*, 2002, 38: 856-859.
57. Daoust PY, McBurney SR, Godson DL, van de Bildt MW, Osterhaus AD: Canine distemper virus-associated encephalitis in free-living lynx (*Lynx canadensis*) and bobcats (*Lynx rufus*) of eastern Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 2009, 45: 611-624.
58. Davidson WR, Nettles VF, Hayes IE, Howerth EW, Couvillion CE: – Diseases diagnosed in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from the southeastern United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 1992, 28, 28-33.
59. Davidson WR, Nettles VF: *Field manual of wildlife diseases in the southeastern United States*. 2nd Edition. Southeastern cooperative wildlife disease study, Athens, Georgia, 1997, p. 417.
60. de Almeida Curi NH, Coelho CM, de Campos Cordeiro Malta M, Magni EM, Sabato MA, Araujo AS, Lobato ZI, Santos JL, Santos HA, Ragozo AA, de Sousa SL: Pathogens of wild maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, 2012, 48: 1052-56.

61. de Lahunta A: Small animal spinal cord disease. In: de Lahunta (ed.) *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*, 1983, WB Saunders, Philadelphia, PA, p. 175-214.
62. Decaro N, Camero M, Greco G, Zizzo N, Tinelli A, Campolo M, Pratelli A, Buonavoglia C: Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiology*, 2004, 27: 177-181.
63. Deem SI, Spelman LH, Yates RA, Montali RJ: Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2000, 31:441-451.
64. Demeter Z, Palade EA, Hornyak A, et al.: Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Veterinary Microbiology*, 2010, 142(3-4): 420-426.
65. Denzin N, Herwig V, van der Grinten E: Occurrence and geographical distribution of canine distemper virus infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) of Saxony-Anhalt, Germany. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162: 214-218.
66. Di Francesco CE, Gentile L, Di Pirro V, Ladiana L, Tagliabue S, Marsilio F: Serologic evidence for selected infectious diseases in Marsican brown bears (*Ursus arctos marsicanus*) in Italy (2004-09). *Journal of Wildlife Diseases*, 2015, 51: 209-213.
67. Di Sabatino D, Lorusso A, Di Francesco CE, Gentile L, Di Pirro V, Bellacicco AL, Giovannini A, Di Francesco G, Marruchella G, Marsilio F, Savini G: Arctic lineage - canine distemper virus as a cause of death in Apennine wolves (*Canis lupus*) in Italy. *PloS One*, 2014, 9: e82356.
68. Diallo A: Morbillivirus group: genome organization and proteins. *Veterinary Microbiology*, 1990, 23: 155-163.
69. Duarte A, Fernandes M, Santos N, Tavares L: Virological survey in free-ranging wildcats (*Felis silvestris*) and feral domestic cats in Portugal. *Veterinary Microbiology*, 2012, 158: 400-404.
70. Dubielzig RR, Higgins RJ, Krakowka S: Lesions of the enamel organ of developing dog teeth following experimental inoculation of gnotobiotic puppies with canine distemper virus. *Veterinary Pathology*, 1981, 18: 684-689.
71. Elia G, Decaro N, Martella V, Cirone F, Lucente MS, Lorusso E, Di Trani L, Buonavoglia C: Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 2006, 136: 171-176.
72. Feng N, Yu Y, Wang T, Wilker P, Wang J, Li Y, Sun Z, Gao Y, Xia X: Fatal canine distemper virus infection of giant pandas in China. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27518.
73. Ferreyra H, Calderón MG, Marticorena D, Marull C, Leonardo BC: Canine distemper infection in crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Argentina. *Journal of Wildlife Diseases*, 2009, 45: 1158-1162.
74. Fiorello C, Noss A, Deem S, Maffei L, Dubovi E: Serosurvey of small carnivores in the Bolivian Chaco. *Journal of Wildlife Diseases*, 2007, 43: 551-557.
75. Fisher C, Gräf T, Ikuta N, Lehmann F, Passos D, Makiejczuk A, Silveira Jr M, Fonseca A, Canal C, Lunge V: Phylogenetic analysis of canine distemper virus in South America clade 1 reveals unique molecular signatures of the local epidemic. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, 41: 135-141.

76. Flacke G, Becker P, Cooper D, Szykman Gunther M, Robertson I et al.: An infectious disease and mortality survey in a population of free-ranging African wild dogs and sympatric domestic dogs. *International Journal of Biodiversity*, 2013, 2013: 1-9.
77. Foley JE, Swift P, Fleeer KA, Torres S, Girard YA, Johnson CK: Risk factors for exposure to feline pathogens in California mountain lions (*Puma concolor*). *Journal of Wildlife Diseases*, 2013, 49: 279-293.
78. Fowlkes BJ, Pardoll DM: Molecular and cellular events of T cell development. *Advances in Immunology*, 1989, 44: 207-264.
79. Frisk AL, Konig M, Moritz A, Baumgärtner W: Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37: 3634-3643.
80. Frölich K, Czupalla O, Haas L, Hentschke J, Dedek J, Fickel J: Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74: 283-292.
81. Furtado MM, de Ramos Filho JD, Scheffer KC, Coelho CJ, Cruz PS, Ikuta CY, Jacomo AT, Porfirio GE, Silveira L, Sollmann R, Torres NM, Ferreira Neto JS: Serosurvey for selected viral infections in free-ranging jaguars (*Panthera onca*) and domestic carnivores in Brazilian Cerrado, Pantanal, and Amazon. *Journal of Wildlife Diseases*, 2013, 49: 510-521.
82. Gaedke K, Zurbriggen A, Baumgärtner W: *In vivo* and *in vitro* detection of canine distemper virus nucleoprotein gene with digoxigenin-labelled RNA, double-stranded DNA probes and oligonucleotides by *in situ* hybridization. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B*, 1997, 44: 329-340.
83. Gaedke K, Zurbriggen A, Baumgärtner W: Lack of correlation between virus nucleoprotein and mRNA expression and the inflammatory response in demyelinating distemper encephalitis indicates a biphasic disease progress. *Eur Veterinary Pathology*, 1999, 5:9-20.
84. Garigliany M, Sarlet M, Franssen M, Desmecht D, Volpe R, Lesenfans C, Paternostre J, Linden A: Re-emergence of canine distemper in wildlife in Belgium. *Veterinary Record*, 2018, 182 (15): 439.
85. Garman RH: Histology of the central nervous system. *Toxicologic Pathology*, 2011, 39: 22-35.
86. Gavier-Widen D, Wells GAH, Simmons MM, Wilesmith WW, Ryan J: Histological observation on the brains of symptomless 7-year-old cattle. *Journal of Comparative Pathology*, 2001, 124: 52-59.
87. Gehrt SD, Kinsel MJ, Anchor C: Pathogen dynamics and morbidity of striped skunks in the absence of rabies. *Journal of Wildlife Diseases*, 2010, 46: 335-347.
88. Gerber JD, Marron AE: Cell-mediated immunity and age at vaccination associated with measles inoculation and protection of dogs against canine distemper. *American Journal of Veterinary Research*, 1976, 37: 133-138.
89. Gese EM, Karki SM, Klavetter ML, Schauster ER, Kitchen AM: Serologic survey for canine infectious diseases among sympatric swift foxes (*Vulpes velox*) and coyotes (*Canis latrans*) in southeastern Colorado. *Journal of Wildlife Diseases*, 2004, 40(4): 741-748.

90. Gese EM, Schultz RD, Johnson MR, Williams ES, Crabtree RL, Ruf RL: Serological survey for diseases in free-ranging coyotes (*Canis latrans*) in Yellowstone National Park, Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases*, 1997, 33: 47-56.
91. Giannitti F, Diab SS, Uzal FA, Fresneda K, Rossi D, Talmi-Frank D, Baneth G: Infection with a *Hepatozoon* sp. closely related to *Hepatozoon felis* in a wild Pampas gray fox (*Lycalopex Pseudalopex gymnocercus*) co-infected with canine distemper virus. *Veterinary Parasitology*, 2012, 186: 497-502.
92. Glaus T, Griot C, Richard A, Althaus U, Herrschkowitz N, Vandeveld M: Ultrastructural and biochemical findings in brain cell cultures infected with canine distemper virus. *Acta Neuropathologica*, 1990, 80: 59-67.
93. Gordon CH, Banyard AC, Hussein A, Laurenson MK, Malcolm JR, Marino J, Regassa F, Stewart AME, Fooks AR, Sillero-Zubiri C: Canine distemper in endangered Ethiopian wolves. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21: 824-831.
94. Gordon MT, Anderson DC, Sharpe PT: Canine distemper virus localized in bone cells of patients with Paget's disease. *Bone*, 1991, 12: 195-201.
95. Gordon MT, Mee AP, Anderson DC, Sharpe PT: Canine distemper virus transcripts sequenced from pagetic bone. *Bone and Mineral*, 1992, 19: 159-174.
96. Gowtage-Sequeira S, Banyard AC, Barrett T, Buczkowski H, Funk SM, Cleaveland S: Epidemiology, pathology and genetic analysis of canine distemper epidemic in Namibia. *Journal of Wildlife Diseases*, 2009, 45: 1008-1020.
97. Graber HU, Müller CF, Vandeveld M, Zurbriggen A: Restricted infection with canine distemper virus leads to down-regulation of myelin gene transcription in cultured oligodendrocytes. *Acta Neuropathologica*, 1995, 90: 312-318.
98. Graeber MB, Blakemore WF, Kreutzberg GW: Cellular pathology of the central nervous system. In: Graham DI, Lantos PL (eds.): *Greenfield's Neuropathology*. 7th ed. London, UK, Arnold, 2002, pp.123-192.
99. Green CE, Vandeveld M: Canine distemper. In: *Infectious diseases of the dog and cat*, 4th edition, 2012, Saunders Elsevier, St Louis, USA, pp 25-42.
100. Greene CE, Appel MJ: Canine distemper virus. In: *Infectious diseases of the dog and cat*, 2nd edition, 1998, Saunders Philadelphia, PA, USA, pp 1-22.
101. Greene CE, Appel MJ: Canine distemper virus. In: *Infectious diseases of the dog and cat*, 3rd edition, 2006, Saunders Elsevier, St Louis, USA, pp 25-41.
102. Greene CE, Appel MJ: Canine distemper. In: Greene C (ed.) *Clinical Microbiology Infections of Dog and Cat*. Philadelphia, PA: W B Saunders, 1984, pp. 386-405.
103. Greene CE, Appel MJ: Canine distemper. In: Greene C (ed.) *Infectious Diseases in Dog and Cat*. Philadelphia, PA: W B Saunders, 1990, pp. 226-241.
104. Griot C, Vandeveld M, Peterhans E, Stocker R: Selective degeneration of oligodendrocytes mediated by reactive oxygen species. *Free Radical Research Communications*, 1990, 14: 181-93.

105. Griot C, Vandeveld M, Schobesberger M, Zubriggen A: Canine distemper, a re-emerging morbillivirus with complex neuropathogenic mechanisms. *Animal Health Research Reviews*, 2003, 4: 1-10.
106. Gröne A, Doherr MG, Zubriggen A: Canine distemper virus infection of canine footpad epidermis. *Veterinary Dermatology*, 2004a, 15: 159-167.
107. Gröne A, Doherr MG, Zubriggen A: Up-regulation of cytokeratin expression in canine distemper virus-infected canine footpad epidermis. *Veterinary Dermatology*, 2004b, 15: 168-174.
108. Gröne A, Engelhardt P, Zurbriggen A: Canine distemper virus infection: proliferation of canine footpad keratinocytes. *Veterinary Pathology*, 2003b, 40: 574-578.
109. Gröne A, Frisk AL, Baumgärtner W: Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1998, 65: 11-27.
110. Gröne A, Gröters S, Koutinas A, Saridomichelakis M, Baumgärtner W: Non-cytocidal infection of keratinocytes by canine distemper virus in so-called hard pad disease of canine distemper. *Veterinary Microbiology*, 2003a, 96: 157-163.
111. Halbrooks RD, Swango LJ, Schurrenberger RP, Mitchell FE, Hill EP: Response of gray foxes to modified-live virus canine distemper vaccine. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1981, 179: 1170-1174.
112. Hamir AN, Fischer KA: Neuronal vacuolation in raccoons from Oregon. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1999, 11: 303-307.
113. Hamir AN, Summers BA, Rupprecht CE: Concurrent rabies and canine distemper encephalitis in a raccoon (*Procyon lotor*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1998, 10: 194-196.
114. Harder TC, Kenter M, Vos H, Siebelink K, Huisman W, van Amerongen G, Orvell C, Barrett T, Appel MJ, Osterhaus AD: Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *Journal of General Virology*, 1996, 77: 397-405.
115. Harder TC, Osterhaus AD: Canine distemper virus – A Morbillivirus in search of new hosts? *Trends in Microbiology*, 1997, 5(3): 120-124.
116. Hartley WJ: A post-vaccinal inclusion body encephalitis in dogs. *Veterinary Pathology*, 1974, 11: 301-313.
117. Hedrick PW, Lee RN, Buchanan C: Canine parvovirus enteritis, canine distemper, and major histocompatibility complex genetic variation in Mexican wolves. *Journal of Wildlife Diseases*, 2003, 39: 909-913.
118. Helfrich MH, Hobson RP, Grabowski PS, Zurbriggen A, Cosby SL, Dickson GR, Fraser WD, Ooi CG, Selby PL, Crisp AJ, Wallace RG, Kahn S, Ralston SH: A negative search for a paramyxoviral etiology of Paget's disease of bone: molecular, immunological, and ultra-structural studies in UK patients. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2000, 15: 2315-2329.
119. Hewicker M, Damsch S, Trautwein G: Detection of canine distemper viral antigen in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue of a fitch (*Mustela putorius*), using an immunoperoxidase technique. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 1990, 97: 85-87.

120. Heymann D: Rabies. In: Control of communicable diseases manual. 20th ed, Washington, DC, American Public Health Association, 2015, 497-508.
121. Higgins RJ, Krakowka SG, Metzler AE, Koestner A: Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. Sequential immunologic and morphologic findings. *Acta Neuropathologica*, 1982, 58: 1-8.
122. Ho CK, Babiuk LA: Immune mechanisms against canine distemper. III. Role of complement lysis in the immunity and persistent infection of canine distemper virus. *Immunology*, 1980, 39: 231-237.
123. Hvistendahl M: Captive pandas succumb to killer virus. *Science*, 2015, 347: 700-701.
124. Ikeda Y, Nakamura K, Miyazawa T, Chen MC, Kuo TF, Lin JA, Mikami T, Kai C, Takahashi E: Seroprevalence of canine distemper virus in cats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2011, 8: 641-644.
125. Kajita M, Katayama H, Murata T, Kai C, Hori M, Ozaki H: Canine distemper virus induces apoptosis through caspase-3 and -8 activation in Vero cells. *Journal of Veterinary Medicine B*, 2006, 53: 273-277.
126. Kameo Y, Nagao Y, Nishio Y, Shimoda H, Nakano H, Suzuki K, Une Y, Sato H, Shimojima M, Maeda K: Epizootic canine distemper virus infection among wild mammals. *Veterinary Microbiology*, 2012, 154: 222-229.
127. Kapil S, Allison RW, Johnston L, et al.: Canine distemper virus strains circulating among North American dogs. *Clinical Vaccine and Immunology*, 2008, 15(4): 707-712.
128. Kapil S, Yeary TJ: Canine distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife. *Veterinary Clinics: Small Animals*, 2011, 41: 1069-1086.
129. Karki SM: Effects of coyote removal on swift fox (*Vulpes velox*) population ecology in south-eastern Colorado. MS Thesis, Utah State University, Logan, Utah, 2003, 82 pp.
130. Kazacos KR, Thacker HL, Shivaprasad HL, Burger PP: Vaccination-induced distemper in kinkajous. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1981, 179: 1166-1169.
131. Kerdiles YM, Cherif B, Marie JC, Tremillon N, Blanquier B, Libeau G, Diallo A, Wild TF, Villiers MB, Horvat B: Immunomodulatory properties of morbillivirus nucleoproteins. *Viral Immunology*, 2006, 324-334.
132. Kim YH, Cho KW, Youn HY, Yoo HS, Han HR: Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *Journal of Veterinary Science*, 2001, 2: 59-63.
133. Kingsbury DW, Bratt MA, Choppin PW, Hanson RP, Hosaka Y, Ter Meulen V, Norrby E, Plowright W, Rott R, Wunner WH: Paramyxoviridae. *Intervirology*, 1978, 10: 137-152.
134. Kirk CM, Amstrup S, Swor R, Holcomb D, O'Hara TM: Morbillivirus and *Toxoplasma* exposure and association with hematological parameters for southern Beaufort Sea polar bears: potential response to infectious agents in sentinel species. *Ecohealth*, 2010, 7: 321-331.
135. Kissui BM, Packer C: Top-down population regulation of a top predator: lions in the Ngorongoro Crater. *Proc Biol Sci*, 2004, 271: 1867-1874.

136. Koutinas AF, Baumgärtner W, Tontis D, Polizopoulou Z, Saridomichelakis MN, Lekkas S: Histopathology and immunohistochemistry of canine distemper virus-induced footpad hyperkeratosis (hard pad disease) in dogs with natural canine distemper. *Veterinary Pathology*, 2004, 41: 2-9.
137. Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Baumgärtner W, Lekkas S, Kontos V: Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *Journal of Comparative Pathology*, 2002, 126: 47-56.
138. Krakowka S, Axthelm MK, Johnson GC: Canine distemper virus. In: Olsen RG, Krakowka S, Blakeslee JR (Eds.): *Comparative Pathobiology of Viral Diseases*, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, 1985, pp. 137-164.
139. Krakowka S, Cockerell G, Koestner A: Effects of canine distemper virus infection on lymphoid functions *in vitro* and *in vivo*. *Infection and Immunity*, 1975a, 11: 1069-1078.
140. Krakowka S, Cork LC, Winkelstein JA, Axthelm MK: Establishment of central nervous system infection by canine distemper virus: breach of the blood-brain barrier and facilitation by antiviral antibody. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1987a, 17: 471-482.
141. Krakowka S, Higgins RJ, Koestner A: Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *American Journal of Veterinary Research*, 1980, 41: 284-292.
142. Krakowka S, McCullough B, Koester A, Olsen R: Myelin-specific autoantibodies associated with central nervous system demyelination in canine distemper virus infection. *Infection and Immunity*, 1973, 8: 819-827.
143. Krakowka S, Olsen R, Confer A, Koestner A, McCullough B: Serologic response to canine distemper viral antigens in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. *Journal of Infectious Diseases*, 1975b, 132: 384-392.
144. Krakowka S, Ringler SS, Lewis M, Olsen RG, Axthelm MK: Immunosuppression by canine distemper virus: modulation of *in vitro* immunoglobulin synthesis, interleukin release and prostaglandin E2 production. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1987b, 15: 181-201.
145. Krakowka S: Canine distemper virus infectivity of various blood fractions for central nervous system vasculature. *Journal of Neuroimmunology*, 1989, 21: 75-80.
146. Krakowka S: Mechanisms of *in vitro* immunosuppression in canine distemper virus infection. *Journal of Clinical and Laboratory Immunology*, 1982, 8: 187-196.
147. Krinke GJ: Neuronal vacuolation. *Toxicologic Pathology*, 2011, 39: 1140.
148. Kumagai K, Yamaguchi R, Uchida K, Tateyama S: Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. *Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 2004, 66: 175-181.
149. Lamb RA, Kolakofsky D: Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (Eds.), *Fields of Virology*, 4th ed., vol 1, 2001, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, pp. 1305-1443.
150. Larson LJ, Schultz RD: Three-year duration of immunity in dogs vaccinated with a canarypox-vectored recombinant canine distemper virus vaccine. *Veterinary Therapeutics*, 2007, 8: 101-6.

151. Latha D, Geetha M, Ramadass P, Narayanan RB: Development of recombinant nucleocapsid protein based IgM-ELISA for the early detection of distemper infection in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007b, 119: 278-286.
152. Latha D, Geetha M, Ramadass P, Narayanan RB: Evaluation of ELISA based on the conserved and functional middle region of nucleocapsid protein to detect distemper infection in dogs. *Veterinary Microbiology*, 2007a, 120: 251-260.
153. Laurenson K, van Heerden J, Stander P, van Vuuren MJ: Seroepidemiological survey of sympatric domestic and wild dogs (*Lycaon pictus*) in Tsumkwe district, north-eastern Namibia. *Onderstepoort J Vet Res*, 1997, 64: 313-316.
154. Lee MS, Tsai KJ, Chen LH, et al.: The identification of frequent variations in the fusion protein of canine distemper virus. *Veterinary Journal*, 2010, 183: 184-190.
155. Lempp C, Jungwirth N, Grilo ML, Reckendorf A, Ulrich A, van Neer A, Bodewes R, Pfankuche VM, Bauer C, Osterhaus ADME, Baumgartner W, Siebert U: Pathological findings in the red fox (*Vulpes vulpes*), stone marten (*Martes foina*) and raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*), with special emphasis on infectious and zoonotic agents in Northern Germany. *PLoS ONE*, 2017, 12(4): e0175469.
156. Lempp C, Spitzbarth I, Puff C, Cana A, Kegler K, Techangamsuwan S, Baumgärtner W, Seehusen F: New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. *Viruses*, 2014, 6: 2571-2601.
157. Loots AK, Mitchell E, Dalton DL, Kotzé A, Venter EH: Advances in canine distemper virus pathogenesis research: a wildlife perspective. *Journal of General Virology*, 2017, 98: 311-321.
158. López-Peña M, Quiroga I, Vásquez S, Nieto JM: Detection of canine distemper viral antigen in foxes (*Vulpes vulpes*) in Northwestern Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 1994, 30(1): 95-98.
159. Mackenstedt U, Jenkins D, Roming T: The role of wildlife in the transmission of parasitic zoonoses in peri-urban and urban areas. *International Journal of Parasitology Parasites and Wildlife*, 2015, 4: 71-79.
160. Maeda H, Ozaki K, Takagi Y, Sawashima K, Narama I: Distemper skin lesions in a dog. *Zentralbl Veterinärmed A*, 1994, 41: 247-250.
161. Malovrh T, Hostnik P: Diagnostics procedures in rabies. *Veterinarski glasnik*, 2005, 59: 99-105.
162. Martella V, Bianchi A, Bertolotti I, Pedrotti L, Gugiatti A, Catella A, Cordioli P, Lucente MS, Elia G, Buonavoglia C: Canine distemper epizootic among red foxes, Italy, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16: 2007-2009.
163. Martella V, Bianchi A, Bertolotti I, Pedrotti L, Gugiatti A, Catella A, Cordioli P, Lucente MS, Elia G, Buonavoglia C: Canine distemper epizootic among red foxes, Italy, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16(12):2007-2009.
164. Martella V, Cirone F, Elia G, et al.: Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains in Italy. *Veterinary Microbiology*, 2006, 116:301-309.
165. Martella V, Elia G, Buonavoglia C: Canine distemper virus. *Veterinary Clinics North American Small Animal Practice*, 2008, 38: 787-797.

166. Martella V, Elia G, Lucente MS, Decaro N, Lorusso E, Banyai K, Blixenkron-Moller N, Lan NT, Yamaguchi R, Cirone F, Carmichael LE, Buonavoglia C: Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Veterinary Microbiology*, 2007, 122: 32-42.
167. Martella V, Pratelli A, Cirone F, Zizzo N, Decaro N, Tinelli A, Foti M, Buonavoglia C: Detection and genetic characterization of canine distemper virus (CDV) from free-ranging red foxes in Italy. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16:77-83.
168. Martinez-Gutierrez M, Ruiz-Saenz J: Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. *BMC Veterinary Research*, 2016, 12:78.
169. Martino PE, Montenegro JL, Preziosi JA, Venturini C, Bacigalupe D, Stanchi NO, Bautista EL: Serological survey of selected pathogens of free-ranging foxes in southern Argentina 1998-2001. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris)*, 2004, 23(3), 801-806.
170. McCarthy AJ, Shaw MA, Goodman SJ: Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proc Biol Sci*, 2007, 274: 3165-3174.
171. McCue PM, O'Farrell TP: Serological survey for selected diseases in the endangered San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*). *Journal of Wildlife Diseases*, 1988, 24: 274-281.
172. McCullough B, Krakowka S, Koestner A: Experimental canine distemper virus-induced demyelination. *Laboratory Investigation*, 1974a, 31: 216-222.
173. McCullough B, Krakowka S, Koestner A: Experimental canine distemper virus-induced lymphoid depletion. *American Journal of Pathology*, 1974b, 74: 155-170.
174. McFadden KW, Wade SE, Dubovi EJ, Gompper ME: A serological and fecal parasitologic survey of the critically endangered pygmy raccoon (*Procyon pygmaeus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 2005, 41: 615-617.
175. McGill IS, Wells GAH: Neuropathological findings in cattle with clinically suspect but histologically unconfirmed bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Journal of Comparative Pathology*, 1993, 108: 241-260.
176. Mee AP: Paramyxoviruses and Paget's disease: the affirmative view. *Bone*, 1999, 24: 19-21.
177. Megid J, de Souza VAF, Teixeira CR, Cortez A, Amorin RL, Heinemann MB, Cagnini DQ, Richtzenhain LJ: Canine distemper virus in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in Brasil: Case report and phylogenetic analysis. *Journal of Wildlife Diseases*, 2009, 45: 527-530.
178. Megid J, Teixeira CR, Amorin RL, Cortez A, Heinemann MB, de Paula Antunes JM, da Costa LF, Fornazari F, Cipriano JR, Cremasco A, Richtzenhain LJ: First identification of canine distemper virus in a hoary fox (*Lycalopex vetulus*): pathologic aspects and virus phylogeny. *Journal of Wildlife Diseases*, 2010, 46: 303-305.
179. Meli ML, Simmler P, Cattori V, Martínez F, Vargas A, Palomares F, López-Bao JV, Simón MA, López G, León-Vizcaino L, Hofmann-Lehmann R, Lutz H: Importance of canine distemper virus (CDV) infection in free-ranging Iberian lynxes (*Lynx pardinus*). *Veterinary Microbiology*, 2010, 146: 132-137.

180. Miele JA, Krakowka S: Antibody responses to virion polypeptides in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. *Infection and Immunity*, 1983, 41: 869-871.
181. Miller DS, Covell DF, McLean RG, Adrian WJ, Niezgodna M, Gustafson JM, Rongstad OJ, Schultz RD, Kirk LJ, Quan TJ: Serologic survey for selected infectious diseases agents in swift and kit foxes from western United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 2000, 36: 798-805.
182. Monne I, Fusaro A, Valastro V, Citterio C, Dalla Pozza M, Obber F, Trevisol K, Cova M, De Benedictis P, Bregoli M, Capua I, Cattoli G: A distinct CDV genotype causing a major epidemic in Alpine wildlife. *Veterinary Microbiology*, 2011, 150: 63-69.
183. Moritz A, Frisk AL, Baumgärtner W: The evaluation of diagnostic procedures for the detection of canine distemper virus infection. *European Journal of Companion Animal Practice*, 2000, 10: 37-47.
184. Moro L, de Sousa Martins A, de Moraes Alves C, de Araujo Santos FG, dos Santos Nunes JE, Carneiro RA, Carvalho R, Vasconcelos AC: Apoptosis in canine distemper. *Archives of Virology*, 2003a, 148: 153-164.
185. Moro L, Martins AS, Alves CM, Santos FG, Del Puerto HL, Vasconcelos AC: Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. *Journal of Veterinary Medicine B*, 2003b, 50: 221-225.
186. Müller A, Silva E, Santos N, Thompson G: Domestic dog origin of canine distemper virus in free-ranging wolves in Portugal as revealed by hemagglutinin gene characterization. *Journal of Wildlife Diseases*, 2011, 47: 725-729.
187. Müller CF, Fatzer RS, Beck K, Vandeveld M, Zurbriggen A: Studies on canine distemper virus persistence in the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 1995, 89: 438-445.
188. Müller T, Schlüter H, Kautzsch S: Zur Wechselwirkung von oraler Tollwutimmunisierung und Fuchspopulationsdynamik. *Tierärztl Umsch*, 1995, 50: 743-747 (in German).
189. Munson L, Terio KA, Kock R, Mlengya T, Roelke ME, Dubovi E, Summers B, Sinclair AR, Packer C: Climate extremes promote fatal co-infections during canine distemper epidemics in African lions. *PLoS One*, 2008, 3:e2545.
190. Mutinelli F, Vandeveld M, Griot C, Richard A: Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta Neuropathologica*, 1989, 77: 333-335.
191. Nagao Y, Nishio Y, Shiomoda H, Tamaru S, Shimojima M, Goto M, Une Y, Sato A, Ikebe Y, Maeda K: An outbreak of canine distemper virus in tigers (*Panthera tigris*): possible transmission from wild animals to zoo animals. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2012, 74: 699-705.
192. Nava AF, Cullen L, Sana DA, Nardi MS, Filho JD, Lima TF, Abreu KC, Ferreira F: First evidence of canine distemper in Brazilian free-ranging felids. *EcoHealth*, 2008, 5: 513-518.
193. Nessler A, Baumgärtner W, Gaedke K, Zurbriggen A: Abundant expression of viral nucleoprotein mRNA and restricted translation of the corresponding viral protein in inclusion body polyencephalitis of canine distemper. *Journal of Comparative Pathology*, 1997, 116: 291-301.
194. Nessler A, Baumgärtner W, Zurbriggen A, Örvell C: Restricted virus protein translation in canine distemper virus inclusion body polyencephalitis. *Veterinary Microbiology*, 1999, 69: 23-28.
195. Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF: Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochemical Research*, 1992, 17: 877-885.

196. Nouvellet P, Donnelly CA, De Nardi M, Rhodes CJ, De Benedictis P, Citterio C, Obber F, Lorenzetto M, Pozza MD, Cauchemez S, Cattoli G: Rabies and canine distemper virus epidemics in the red fox population of northern Italy (2006-2010). *PLoS One*, 2013, 8: e61588.
197. Ogawa Y, Eins S, Wolff JR: Oligodendrocytes in the pons and middle cerebellar peduncle of the cat: topographical relations to neurons and transverse axon bundles. *Cell and Tissue Research*, 1985, 240: 541-552.
198. Oglesbee M, Krakowka S: Cellular stress response induces selective intranuclear trafficking and accumulation of morbillivirus major core protein. *Laboratory Investigation*, 1993, 68: 109-117.
199. Okita M, Yanai T, Ochikubo F, Gemma T, Mori T, Maseki T, Yamanouchi K, Mikami T, Kai C: Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. *Journal of Comparative Pathology*, 1997, 116: 403-408.
200. Olson TL, Lindzey FG: Swift fox survival and production in southeastern Wyoming. *Journal of Mammalogy*, 2002, 83: 199-206.
201. Ooi CG, Walsh CA, Gallagher JA, Fraser WD: Absence of measles virus and canine distemper virus transcripts in long-term bone marrow cultures from patients with Paget's disease of bone. *Bone*, 2000, 27: 417-421.
202. Origi FC, Plattet P, Sattler U, Robert N, Casaubon J, Mavrot F, Pewsner M, Wu N, Giovannini S, Oevermann A, Stoffel MH, Gaschen V, Segner H, Ryser-Degiorgis MP: Emergence of canine distemper virus strains with modified molecular signature and enhanced neuronal tropism leading to high mortality in wild carnivores. *Veterinary Pathology*, 2012, 49: 913-929.
203. Orlando EA, Imbschweiler I, Gerhauser I, Baumgärtner W, Wewetzer K: *In vitro* characterization and preferential infection by canine distemper virus of glial precursors with Schwann cell characteristics from adult canine brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2008, 34: 621-637.
204. Örvell C: Structural polypeptides of canine distemper virus. *Archives of Virology*, 1980, 66: 193-206.
205. Pardo IDR: Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected North American dogs. Doctoral thesis, 2006, Graduate School of the University of Missouri-Columbia, Missouri, USA.
206. Pearce-Kelling S, Mitchell WJ, Summers BA, Apell MJ: Growth of canine distemper virus in cultured astrocytes: relationship to *in vivo* persistence and disease. *Microbial Pathogenesis*, 1990, 8: 71-82.
207. Pearce-Kelling S, Mitchell WJ, Summers BA, Apell MJ: Virulent and attenuated canine distemper virus infects multiple dog brain cell types *in vitro*. *Glia*, 1991, 4: 408-416.
208. Perpiñán D, Ramis A, Tomás A, Carpintero E, Bargalló F: Outbreak of canine distemper in domestic ferrets (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Record*, 2008, 163: 246-250.
209. Philippa JD, Leighton FA, Daoust PY, Nielsen O, Pagliarulo M, Schwantje H, Shury T, Van Herwijnen R, Martina BE, Kuiken T, Van de Bildt MW, Osterhaus AD: Antibodies to selected

- pathogens in free-ranging terrestrial carnivores and marine mammals in Canada. *Veterinary Record*, 2004, 155: 135-140.
210. Plumer L, Davison J, Saarma U: Rapid urbanization of red foxes in Estonia: distribution, behavior, attacks on domestic animals, and health-risks related to zoonotic diseases. *PLoS One*, 2014, 9: e115124.
211. Pope JP, Miller DL, Riley MC, Anis E, Wilkes RP: Characterization of a novel canine distemper virus causing disease in wildlife. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2016, 28(5): 506-513.
212. Prachayangprecha S, Schapendonk CM, Koopmans MP, Osterhaus AD, Schurch AC, Pas SD, van der Eijk AA, Poovorawan Y, Haagmans BL, Smits SL: Exploring the potential of next-generation sequencing in detection of respiratory viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52: 3722-3730.
213. Pratelli A: Canine distemper virus: the emergence of new variants. *Veterinary Journal*, 2011, 187: 290-291.
214. Pringle CR: Virus taxonomy at the XI International Congress of Virology, Sydney, Australia. *Arch. Virol*, 1999, 144: 2065-2070.
215. Raine CS: on the development of CNS lesions in natural canine distemper encephalomyelitis. *Journal of Neurological Science*, 1976, 30: 13-28.
216. Ralston SH, Digiovine FS, Gallacher SJ, Boyle IT, Duff GW: Failure to detect paramyxovirus sequences in Paget's disease of bone using the polymerase chain reaction. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1991, 11: 1243-1248.
217. Raw ME, Pearson GR, Brown PJ, Baumgärtner W: Canine distemper infection associated with acute nervous signs in dogs. *Veterinary Record*, 1992, 130: 291-293.
218. Rentería-Solís Z, Förster C, Aue A, Wittstatt U, Wibbelt G, König M: Canine distemper outbreak in raccoons suggests pathogen interspecies transmission amongst alien and native carnivores in urban areas from Germany. *Veterinary Microbiology*, 2014, 174: 50-59.
219. Rikula U, Nuotio L, Sihvonen L: Vaccine coverage, herd immunity and occurrence of canine distemper from 1990-1996 in Finland. *Vaccine*, 2007, 25: 7994-8.
220. Rima BK, Duffy N, Mitchell WJ, Summers BA, Appel MJ: Correlation between humoral immune responses and presence of virus in the CNS in dogs experimentally infected with canine distemper virus. *Archives of Virology*, 1991, 121: 1-8.
221. Rima BK, Wishaupt RG, Welsh MJ, Earle JA: The evolution of morbilliviruses: a comparison of nucleocapsid gene sequences including a porpoise morbillivirus. *Veterinary Microbiology*, 1995, 44: 127-134.
222. Ringler SS, Krakowka S: Effects of canine distemper virus on natural killer cell activity in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 1985, 46:1781-1786.
223. Roelke-Parker ME, Munson L, Packer C, Kock R, Cleaveland S, Carpenter M, O'Brien SJ, Pospischil A, Hofmann-Lehmann R, Lutz H, Mwamengele GL, Mgasia MN, Machange GA,

- Summers BA, Appel MJ: A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*), Nature, 1996, 379:441-445.
224. Rudd PA, Cattaneo R, von Messling V: Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. Journal of Virology, 2006, 80: 9361-9370.
225. Saito TB, Alfieri AA, Wosiacki SR, Negrao FJ, Morais HAS, Alfieri AF: Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. Research in Veterinary Science, 2006, 80: 116-119.
226. Salas V, Pizarro J, Navarro C: Phylogenetic analysis of canine distemper virus detected in Chile. International Journal of Current Research, 2018, 10: 72402-72407.
227. Santos N, Almendra C, Tavares L: Serologic survey for canine distemper virus and canine parvovirus un free-ranging wild carnivores from Portugal. Journal of Wildlife Diseases, 2009, 45: 221-226.
228. Sattler U, Khosravi M, Avila M, Pilo P, Langedijk JP, Ader-Ebert N, Alves LA, Plattet P, Origgi FC: Identification of amino acid substitutions with compensational effects in the attachment protein of canine distemper virus. Journal of Virology, 2014, 88: 8057-8064.
229. Sawatsky B, von Messling V: Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. Journal of Virology, 2010, 84: 2753-61.
230. Schatzberg Sj, Li Q, Porter BF, et al.: Broadly reactive pan-paramyxovirus reverse transcription polymerase chain reaction and sequence analysis for the detection of canine distemper virus in a case of canine meningoencephalitis of unknown etiology. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2009, 21:844-849.
231. Schneider-Schaulies S, Dittmer U: Silencing T cells or T-cell silencing: concepts in virus-induced immunosuppression. Journal of General Virology, 2006, 87: 1423-1438.
232. Schobesberger M, Summerfield A, Doherr MG, Zurbriggen A, Griot C: Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2005, 104: 33-44.
233. Schobesberger M, Zurbriggen A, Doherr MG, Weissenböck H, Vandeveld M, Lassmann H, Griot C: Demyelination precedes oligodendrocyte loss in canine distemper virus-induced encephalitis. Acta Neuropathologica, 2002, 103: 11-19.
234. Schobesberger M, Zurbriggen A, Summerfield A, Vandeveld M, Griot C: Oligodendroglial degeneration in distemper: apoptosis or necrosis? Acta Neuropathologica, 1999, 97: 279-287.
235. Schönbauer M, Kölbl S, Schönbauer-Längle A: Perinatale Staupeinfektion bei drei Eisbären (*Ursus maritimus*) und bei einem Brillenbären (*Tremarctos ornatus*). Verhandlungsbericht Int. Symp. Erkrankungen Zootiere, 1984, 26:131-136.
236. Schultz RD, Thiel B, Mukhtar E, et al.: Age and long-term protective immunity in dogs and cats. Journal of Comparative Pathology, 2010, 142:S102-108.
237. Schwab S, Herden C, Seeliger F, Papaioannou N, Psalla D, Polizopoulou Z, Baumgärtner W: Non-suppurative meningoencephalitis of unknown origin in cats and dogs: an immunohisto-chemical study. Journal of Comparative Pathology, 2007, 136: 96-110.

238. Scott DM, Berg MJ, Tolhurst BA, Chauvenet AL, Smith GC, Neaves K, et al: Changes in the distribution of red foxes (*Vulpes vulpes*) in urban areas in Great Britain: findings and limitations of a media-driven nationwide survey. *PLoS One*, 2014, 9: e99059.
239. Seehusen F, Orlando E, Wewetzer K, Baumgärtner E: Vimentin-positive astrocytes in canine distemper – a target for canine distemper virus especially in chronic lesions? *Acta Neuropathologica*, 2007, 114: 597-608.
240. Seimon TA, Miquelle DG, Chang TY: Canine distemper virus: an emerging disease in wild endangered. *MBio*, 2013, 4: e00410-00413.
241. Seki F, Ono N, Yamaguchi R, et al.: Efficient isolation of wild strains of canine distemper viruses in Vero cell expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *Journal of Virology*, 2003, 77(18): 9943-50.
242. Sekulin K, Hafner-Marx A, Kolodziejek J, Janik D, Schmidt P, Nowotny N: Emergence of canine distemper in Bavarian wildlife associated with a specific amino acid exchange in the haemagglutinin protein. *Veterinary Journal*, 2011, 187: 399-401.
243. Shamir M, Yakobson B, Baneth G, King R, Dar-Verker S, Markovics A, Aroch I: Antibodies to selected canine pathogens and infestation with intestinal helminths in golden jackals (*Canis aureus*) in Israel. *Veterinary Journal*, 2001, 162: 66-72.
244. Sheldon JD, Cushing AC, Wilkes RP, Anis E, Dubovi EJ: Serologic response to canine distemper vaccination in captive Linnaeus's two-toed sloth (*Choloepus didactylus*) after a fatal canine distemper virus outbreak. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2017, 48: 1250-1253.
245. Shin YS, Mori T, Okita M, Gemma T, Kai C, Mikami T: Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1995, 57: 439-445.
246. Sobrino R, Arnal MC, Luco DF, Gortázar C: Prevalence of antibodies against canine distemper virus and canine parvovirus among foxes and wolves from Spain. *Veterinary Microbiology*, 2008, 126: 251-256.
247. Stein V, Baumgärtner W, Kreienbrock L, Zurbriggen A, Vandeveld M, Tipold A: Canine microglial cells: stereotype in immunophenotype and specificity in function? *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 113: 277-287.
248. Stein V, Baumgärtner W, Tipold A: Differential expression of CD45 on canine microglial cells. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 2007, 54: 314-320.
249. Stephenson N, Higley JM, Sajecki JL, Chomel BB, Brown RN, Foley JE: Demographic characteristics and infectious diseases of American black bears in Humboldt County, California. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 2015, 15: 116-123.
250. Stimmelmayer R, Rotstein DS, Maboni G, Person BT, Sanchez S: Morbillivirus-associated lipid pneumonia in Arctic foxes. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2018, 1-4.
251. Summers BA, Appel MJ: Aspects of canine distemper virus and measles encephalomyelitis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 1994, 20: 525-534.

252. Summers BA, Appel MJ: Demyelination in canine distemper encephalomyelitis: an ultrastructural analysis. *Journal of Neurocytology*, 1987, 16: 871-881.
253. Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A: *Veterinary neuropathology*. Mosby, St Louis, Missouri, USA, 1995, pp. 1-110.
254. Summers BA, Greisen HA, Appel MJ: Canine distemper encephalomyelitis: variation with strain. *Journal of Comparative Pathology*, 1984, 94: 65-75.
255. Summers BA, Greisen HA, Appel MJ: Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. *Acta Neuropathologica*, 1979, 46: 1-10.
256. Sutor A, Schwarz S, Conraths FJ: The raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in Germany – an established neozoon as host and vector for parasites and other pathogens. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2011, 124: 457-464.
257. Svitek N, von Messling V: Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets. *Virology*, 2007, 362: 404-410.
258. Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y: Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *Journal of Virology*, 2001, 75(13): 5842-50.
259. Techangamsuwan S, Pratakipiriya W: Canine distemper virus. In: Munir M (ed.) *Mononegaviruses of Veterinary Importance*. Vol. 2: *Molecular Epidemiology and Control* 2016, CABI, p. 58-70.
260. Terio KA, Craft ME: Canine distemper virus (CDV) in another big cat: should CDV be renamed carnivore distemper virus? *mBio*, 2013, 4: e00702-e00713.
261. Thalwitzer S, Wachter B, Robert N, Wibbelt G, Müller T, Lonzer J, Meli ML, Bay G, Hofer H, Lutz H: Seroprevalences to viral pathogens in free-ranging and captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*) on Namibian Farmland. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010, 17: 232-238.
262. Timm SF, Munson L, Summers BA, Terio KA, Dubovi EJ, Rupprecht CE, Kapil S, Garcelon DK: A suspected canine distemper epidemic as the cause of a catastrophic decline in Santa Catalina Island foxes (*Urocyon littoralis catalinae*). *Journal of Wildlife Diseases*, 2009, 45: 333-343.
263. Tipold A, Jaggy A, Zurbriggen A, Vandeveld M: Neurological signs in canine distemper encephalomyelitis – a clinical study. *European Journal of Companion Animal Practice*, 1996, 6: 33-8.
264. Tipold A, Moore P, Zurbriggen A, Burgener I, Barben G, Vandeveld M: Early T cell response in the central nervous system in canine distemper virus infection. *Acta Neuropathologica*, 1999, 97: 45-56.
265. Tipold A, Vandeveld M, Jaggy A: Neurological manifestations of canine distemper infection. *Journal of Small Animal Practice*, 1992, 33: 466-470.
266. Trebbien R, Chriel M, Struve T, Hjulsgaard CK, Larsen G, Larsen LE: Wildlife reservoirs of canine distemper virus resulted in a major outbreak in Danish farmed mink (*Neovison vison*), *PloS One*, 2014, 9: e85598.
267. Tryland M, Balboni A, Killengreen ST, Mork T, Nielsen O, Yoccoz NG, Ims RA, Fuglei E: A screening for canine distemper virus, canine adenovirus and carnivore protoparvoviruses in Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) and red foxes (*Vulpes vulpes*) from Arctic and sub-Arctic regions of Norway. *Polar Research*, 2018, 37:1498678.

268. Uhart MM, Rago MV, Marull CA, Ferreyra Hdel V, Pereira JA: Exposure to selected pathogens in Geoffroy's cats and domestic carnivores from central Argentina. *Journal of Wildlife Diseases*, 2012, 48: 899-909.
269. van Moll T, Alldinger S, Baumgärtner W, Adami M: Distemper in wild carnivores: An epidemiological, histological and immunocytochemical study. *Veterinary Microbiology*, 1995, 44: 193-199.
270. Vandeveld M, Bichsel P, Cerruti-Sola S, Steck A, Kristensen F, Higgins RJ: Glial proteins in canine distemper virus-induced demyelination. A sequential immunocytochemical study. *Acta Neuropathologica*, 1983, 59: 269-276.
271. Vandeveld M, Fankhauser R, Kristensen F, Kristensen B: Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis. An immunohistological study. *Acta Neuropathologica*, 1981, 54: 31-41.
272. Vandeveld M, Higgins RJ, Oevermann A: *Veterinary Neuropathology: Essentials of Theory and Practice*. 1st ed, John Wiley & Sons, 2012.
273. Vandeveld M, Kristensen B: Observations on the distribution of canine distemper virus in the central nervous system of dogs with demyelinating encephalitis. *Acta Neuropathologica*, 1977, 40: 233-236.
274. Vandeveld M, Kristensen F, Kristensen B, Steck AJ, Kihm U: Immunological and pathological findings in demyelinating encephalitis associated with canine distemper virus infection. *Acta Neuropathologica*, 1982, 56: 1-8.
275. Vandeveld M, Zurbriggen A, Dumas M, Palmer D: Canine distemper virus does not infect oligodendrocytes *in vitro*. *Journal of the Neurological Sciences*, 1985a, 69: 133-137.
276. Vandeveld M, Zurbriggen A, Higgins RJ, Palmer D: Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta Neuropathologica*, 1985b, 67:211-218.
277. Vandeveld M, Zurbriggen A, Steck A, Bichsel P: Studies on the intrathecal humoral immune response in canine distemper encephalitis. *Journal of Neuroimmunology*, 1986, 11: 41-51.
278. Vandeveld M, Zurbriggen A: Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathologica*, 2005, 109: 56-68.
279. Vandeveld M, Zurbriggen A: The neurobiology of canine distemper virus infection. *Veterinary Microbiology*, 1995, 44: 271-280.
280. Vasković N: Karakteristike promena, distribucija antigena i ekspresija proinflamatornih citokina u mozgu lisica prirodno inficiranih virusom besnila. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, 2015, pp. 104-115.
281. Viana M, Cleaveland S, Matthiopoulos J, Hallidaz J, Packer C, Craft ME, Hampson K, Czupryna A, Dobson AP, Dubovi EJ, Ernest E, Fyumagwa R, Hoare R, Hopcraft JG, Horton DL, Kaare MT, Kanellos T, Lankester F, Mentzel C, Mlengeya T, Mzimiri I, Takahashi E, Willet B, Haydon DT, Lembo T: Dynamics of a morbillivirus at the domestic-wildlife interface: canine distemper virus in domestic dogs and lions. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 2015, 112: 1464-1469.

282. von Messling V, Harder T, Moennig V, Rautenberg P, Nolte I, Haas L: Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37: 1049-1056.
283. von Messling V, Milosevic D, Cattaneo R: Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2004, 14216-14221.
284. von Messling V, Springfield C, Devaux P, Cattaneo R: A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *Journal of Virology*, 2003, 77: 12579-12591.
285. von Messling V, Svitek N, Cattaneo R: Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by morbillivirus. *Journal of Virology*, 2006, 80: 6084-6092.
286. von Messling V, Zimmer G, Herrler G, et al.: The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *Journal of Virology*, 2001, 75:6418-27.
287. Wandeler P, Funk SM, Largiader CR, Gloor S, Breitenmoser U: The city-fox phenomenon: genetic consequences of a recent colonization of urban habitat. *Molecular Ecology*, 2003, 12: 647-656.
288. Watanabe Y, Miyata H, Sato H: Inactivation of laboratory animal RNA-viruses by physicochemical treatment. *Jikken Dobutsu*, 1989, 38: 305-11.
289. Welter J, Taylor J, Tartaglia J, et al.: Mucosal vaccination with recombinant poxvirus vaccines protects ferrets against symptomatic CDV infection. *Vaccine*, 1999, 17: 30-38.
290. Welter J, Taylor J, Tartaglia J, et al.: Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *Journal of Virology*, 2000, 74: 6358-67.
291. Whitney LF, Whitney GD: The distemper complex. 1999, Practical Science Publishing Company, Orange, CT.
292. Williams ES, Thorne ET, Appel MJ, Belitsky DW: Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases*, 1988, 24: 385-398.
293. Williams ES: Canine distemper. In: Williams ES, Barker IK (eds.) *Infectious diseases of wild mammals*, 3rd ed. Iowa State Press, Ames, IA, 2001, pp. 50-59.
294. Winters KA, Mathes LE, Krakowka S, Olsen RG: Immunoglobulin class responses to canine distemper virus in gnotobiotic dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1983, 5: 209-215.
295. Wisniewski H, Raine CS, Kay WJ: Observations on viral demyelinating encephalomyelitis, Canine distemper. *Laboratory Investigation*, 1972, 26: 589-599.
296. Wohlsein P, Deschl U, Baumgärtner W: Nonlesions, unusual cell types and postmortem artifacts in the central nervous system of domestic animals. *Veterinary Pathology*, 2012, 50: 122-143.
297. Wolf M, Cachin M, Vandevelde M, Tipold A, Dubey JP: The clinical diagnosis of protozoal myositis syndrome (*Neospora caninum*) of puppies. *Tierärztliche Praxis (in German)*, 1991, 19:302-306.

298. Woo GH, Jho YS, Bak EJ: canine distemper virus infection in fennec fox (*Vulpes zerda*). Journal of Veterinary Medical Science, 2010, 72: 1075-1079.
299. Woo P, Lau S, Wong B, Fan R, Wong A, Zhang A, Wu Y, Choi G, Li K, Hui J, Wang M, Zheng BJ, Chan K, Yuen KY: Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. PNAS, 2012, 14: 5435-5440.
300. Wright NG, Cornwell AJ, Thompson H, Lauder IM: Canine distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis. Veterinary Record, 1974, 94: 86-92.
301. Wünschmann A, Alldinger S, Kremmer E, Baumgärtner W: Identification of CD4+ and CD8+ cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1999, 67: 101-116.
302. Wünschmann A, Kremmer E, Baumgärtner W: Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2000, 73: 83-98.
303. Zipperle L, Langedijk JP, Örvell C, Vandevelde M, Zurbriggen A, Plattet P: Identification of key residues in virulent canine distemper virus hemagglutinin that control CD150/SLAM-binding activity. Journal of Virology, 2010, 84: 9618-24.
304. Zurbriggen A, Graber HU, Vandevelde M: Selective spread and reduced virus release leads to canine distemper virus persistence in the nervous system. Veterinary Microbiology, 1995a, 44: 281-288.
305. Zurbriggen A, Graber HU, Wagner A, Vandevelde M: Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. Journal of Virology, 1995b, 69: 1678-1686.
306. Zurbriggen A, Schmid I, Graber HU, Vandevelde M: Oligodendroglial pathology in canine distemper. Acta Neuropathologica, 1998, 95: 71-77.
307. Zurbriggen A, Vandevelde M, Bollo E: Demyelinating, non-demyelinating and attenuated canine distemper virus strains induce oligodendroglial cytolysis *in vitro*. Journal of the Neurological Sciences, 1987a, 79: 33-41.
308. Zurbriggen A, Vandevelde M, Dumas M, Griot C, Bollo E: Oligodendroglial pathology in canine distemper virus infection *in vitro*. Acta Neuropathologica, 1987b, 74: 366-373.
309. Zurbriggen A, Vandevelde M, Dumas M: Secondary degeneration of oligodendrocytes in canine distemper virus infection *in vitro*. Laboratory Investigation, 1986, 54: 424-431.
310. Zurbriggen A, Vandevelde M: Canine distemper virus-induced glial cell changes *in vitro*. Acta Neuropathologica, 1983, 62: 51-58.
311. Zurbriggen A, Yamawaki M, Vandevelde M: Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes. Laboratory Investigation, 1993, 68: 277-284.
312. <https://sites.google.com/site/pasterovzavodnovisad/home/epizootija-besnila>

БИОГРАФИЈА

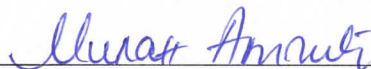
Милан Аничих је рођен 16. децембра 1985. у Новој Вароши, Србија. Основну школу и Гимназију завршио у Новој Вароши са одличним успехом. Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, уписао је 2004/2005. године. Дипломирао је 2011. године на Катедри за болести копитара, месоједа, живине и дивљачи, ФВМ у Београду, успешном одбраном дипломског рада под називом „Основни принципи дијагностике неопластичних обољења паса и мачака“. Током основних студија просечна оцена била му је 9,00. Током студија више пута био је добитник стипендија најбољим студентима које додељују Општина Нова Варош и Завичајна организација „Стара Рашка“. Као студент има објављена два рада.

Године 2013. уписао постдипломске докторске академске студије на Факултету ветеринарске медицине, Универзитет у Београду. Положио све испите са просечном оценом 9,93. Ужа научна област му је ветеринарска патологија и од 2014. до 2016. године волонтирао на Катедри за патолошку морфологију, ФВМ, када је изабран за асистента. Учествује у извођењу практичне наставе и практичних испита на предметима Општа патологија, Специјална патологија и Увод у ветеринарску лабораторијску праксу.

У 2018. провео месец дана на усавршавању на Универзитету ветеринарске медицине у Будимпешти, Мађарска. Добитник стипендије *Davis Thompson* фондације за 2018. годину. Поседује лиценцу за обављање ветеринарске делатности. Члан је „Друштва европских ветеринарских патолога“, „Српског ветеринарског друштва“, „Савеза за коњички спорт Србије за олимпијске и *FEI* дисциплине“ и „Антидопинг агенције Србије“.

Сам или у сарадњи са другим ауторима, Милан Аничих публиковао је или саопштио на научним скуповима у земљи и иностранству укупно 27 радова, од тога 3 рада у истакнутом међународном часопису (M22), 2 рада у међународном часопису (M23), 1 рад у часопису међународног значаја верификованог посебном одлуком (M24). У склопу континуиране едукације био је учесник на 11 курсева и научно-стручних скупова. Одлично говори и пише енглески језик.

Милан Аничих



Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Милан Р. Аничкић

број уписа 15/12

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Анализа морфолошких промена, експресије и дистрибуције вирусног антигена у мозгу лисица природно инфицираних вирусом штенећака"

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 04.06.2019. године

Милан Аничкић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Милан Р. Аничих
Број уписа	15/12
Студијски програм	Докторске академске студије
Наслов рада	"Анализа морфолошких промена, експресије и дистрибуције вирусног антигена у мозгу лисица природно инфицираних вирусом штенећака"
Ментор	др Дарко Маринковић

Потписани Милан Р. Аничих

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 04.06.2019. године

Милан Аничих

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Анализа морфолошких промена, експресије и дистрибуције вирусног антигена у мозгу лисица природно инфицираних вирусом штенећака"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

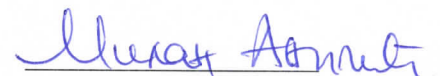
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 04.06.2019. године



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.