

EKOLOGIA FILOWIRUSÓW: WSPÓŁCZESNE POGLĄDY I DALSZY KIERUNKI BADAŃ

Prof. dr hab. JANUSZ T. PAWĘSKA

Jednostka Specjalnych Patogenów, Narodowy Instytut Chorób Zakaźnych, Johannesburg, Republika Południowej Afryki

Jedno z moich obecnych zainteresowań naukowo-badawczych dotyczy epidemiologii i ekologii wirusów wywołujących gorączki krwotoczne (g.k.) u ludzi i zwierząt oraz roli nietoperzy w utrzymaniu i przenoszeniu wirusów. Mój wykład poświęcony będzie omówieniu historii naturalnej filowirusów ze szczególnym uwzględnieniem badań nad ich ekologią, współczesnych poglądów dotyczących mechanizmów transmisji i utrzymania w naturze, dalszych perspektyw badawczych w tej dziedzinie, włączając zakażenia eksperymentalne ich potencjalnych „nosicieli-rezerwuarów”.

Mimo, że pierwszy filowirus (wirus Marburg) został rozpoznany ponad 40 lat temu, tajemnica otaczająca naturalne cykle transmisji tej grupy wirusów pozostaje nadal wielkim wyzwaniem dla świata nauki i przedmiotem wielu interesujących hipotez. Dotychczas wykryto tylko jeden gatunek wirusa Marburg i pięć gatunków wirusa Ebola. Filowirusy utrzymywane są w bliżej nieokreślonych rezerwuarach, najprawdopodobniej rzadko spotykanych w naturze i mających niewielki kontakt z ludźmi lub z trudnością przenoszą te wirusy na inne gatunki. Nietoperze są wiodącymi kandydatami na naturalnych rezerwuarów filowirusów, które mogłyby być przenoszone na ludzi bądź poprzez kontakt z pierwotnym rezerwuarem lub poprzez pośrednie zakażone zwierzęta, na które poluje człowiek.

Wirusy g.k. należą do czterech różnych RNA rodzin wirusowych (*Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Flaviviridae*), spośród których filowirusy stanowią śmiertelne zagrożenie dla człowieka. Wirusy g.k. mają zdolność szybkiego przenoszenia się pomiędzy ludźmi i na dużych obszarach geograficznych. W przypadku większości wirusowych g. k., czynna i bierna profilaktyka, jak również chemioterapia jest mało lub całkowicie niedostępna. Ponadto wiele z nich uważanych jest za potencjalną broń biologiczną, która stałaby się szczególnie niebezpieczna w rękach terrorystów. Z tych względów zaliczane są one do patogenów trzeciej lub czwartej klasy bezpieczeństwa. Praca z tymi wirusami wymaga specjalnych środków ostrożności, włączając m.in. użycie laboratoriów o najwyższym stopniu bezpieczeństwa i ochrony.



Prof. J. Pawęska (widoczny na zdjęciu w białym kombinezonie) i jego współpracownicy wykonujący testy w laboratorium czwartej klasy bezpieczeństwa (BSL4), Jednostka Specjalnych Patogenów Narodowy Instytut Chorób Zakaźnych, Johannesburg, RPA.

Sprężone, filtrowane powietrze dostarczane do szczelnie zamkniętych, specjalnie skonstruowanych kombinezonów ochronnych, utrzymuje je pod ciśnieniem dodatnim. Pomieszczenia BSL4 są natomiast utrzymywane pod ciśnieniem ujemnym i następuje w nich szybka i ciągła wymiana powietrza, co dodatkowo chroni operatorów przed ewentualną groźbą inhalacji aerozoli zakaźnych.



Prof. J. Paweska (po lewej) i Prof R. Swanepoel (po prawej) pobierający wycinki wątroby od pacjenta w BSL4. Pacjent był jednym z 4 osób zmarłych podczas wybuchu zachorowań na nieznaną wirusową gorączkę krwotoczną w jednym ze szpitali w Johannesburgu w 2008r. Badania laboratoryjne pobranego materiału doprowadziły do wykrycia nowego arenawirusa.

Wirus ten został zawleczony z Lusaki do Johannesburga (stąd nazwa wirusa Lujo) drogą medycznej ewakuacji powietrznej zakażonej pacjentki i wywołał 80% przypadków śmiertelnych u zakażonego personelu szpitalnego, włączając paramedyka udzielającego pomocy w samolocie.

Pierwsze odnotowane wybuchy zachorowań na g.k. miały miejsce w Niemczech (Marburg) i w byłej Jugosławii (Belgrad, obecnie Serbia) w 1967 r. wśród personelu laboratoryjnego pracującego z małpami zielonymi *Ceropithecus aethiops* sprowadzonymi z Ugandy. Zanotowano wówczas 25 zakażeń pierwotnych z siedmioma przypadkami śmiertelnymi i 6 zakażeń wtórnych z jednym przypadkiem śmiertelnym. Infekcje pierwotne dotyczyły personelu laboratoryjnego pracującego bezpośrednio z małpami, ich krwią lub tkankami. Wtórne infekcje wystąpiły u 2 lekarzy, jednej pielęgniarki, jednej osoby pomagającej przy sekcji małp i żony lekarza weterynarii. Wszystkie wtórne przypadki miały bezpośredni kontakt z przypadkami pierwotnymi, zwykle z krwią pacjentów. Lekarze zostali zakażeni drogą przypadkowych nakłuć skóry podczas pobierania krwi. Wkrótce wykazano, że zakażenie doświadczalne *C. aethiops* prowadzi nieuchronnie do śmierci tych zwierząt co prawdopodobnie wyklucza ten gatunek jako naturalny rezerwuuar wirusa Marburg. Źródło zakażenia *C. aethiops* będących powodem wybuchu g.k. w 1967 r. nie został ustalony. Wydaje się, że był nim bardzo rzadki lub ekologicznie niezwiązany gatunek, który w naturalnym środowisku bytowania małp zielonych miał z nimi tylko wyjątkowy i przypadkowy kontakt. Warto nadmienić, że chociaż *C. aethiops* są w zasadzie wegeterianami, odnotowano spożywanie przez nie małych gryzoni, insektów i pająków.

Od 1967 r. do 1998 r., zakażenia wirusem Marburg były rozpoznane tylko w czterech odosobnionych sytuacjach, w których przypadki wskaźnikowe przypuszczalnie zostały zakażone z naturalnego źródła. Pierwsze z tych sporadycznych zdarzeń miało miejsce w 1975 r. w Republice Południowej Afryki (RPA) u 20-letniego australijskiego studenta, który po gwałtownym wystąpieniu ostrych objawów chorobowych w Zimbabwie, został przetransportowany do szpitala w Johannesburgu, gdzie zmarł 4 dni później. Mimo ścisłej izolacji i wprowadzenia rygorystycznej szpitalnej kontroli, zarówno jego towarzyszką podróży i pielęgniarką opiekującą się nim uległy zakażeniu. Po intensywnym leczeniu wspomagającym obie kobiety powróciły do zdrowia. Retrospektywna analiza wydarzeń wykazała, że pacjent zakażony wirusem Marburg w 1975 r. i jego towarzyszką podróży często spali na dworze, bądź korzystali z pomieszczeń noclegowych, w których gnieździły się nietoperze. Na uwagę zasługuje również fakt, że zmarły pacjent był boleśnie ukąszony w pachwinę podczas odpoczynku na skraju drogi, 6 dni przed wystąpieniem pierwszych objawów chorobowych. Inspekcja miejsca gdzie doszło do ukąszenia australijskiego studenta w rok później wykazała obecność jadowitych pająków, których skutek ukąszenia pokrywałyby się ze zmianami obserwowanymi u pacjenta. Intensywne próby izolacji wirusa ze złapanych lokalnie stawonogów i pająków były ujemne. Objawy u pacjenta sugerowały zatrucie jadem skorpiona, pszczoły, pająka, mrówki, osy lub krocionoga. Udział niekrwiożernych stawonogów w wirusowej transmisji byłby raczej czymś wyjątkowym, lecz mogłoby to wyjaśniać niezwykle rzadkość zakażeń ludzi i małp wirusem Marburg.

Dwa inne sporadyczne przypadki g.k. Marburg wystąpiły w pobliżu Góry Elgon, w Keni, w 1980 r. i 1987 r. około 100 km od jeziora Kyoga w Ugandzie - źródło zakażonych wirusem małp zielonych importowanych do Europy w 1967 r. W dniu 8 stycznia 1980 r. u 56-letniego inżyniera francuskiego, zatrudnionego w Zach. Prowincji Keni, wystąpiła nagła gorączka, ból głowy, biegunka i wymioty. Jego historia podróży obejmowała wizytę w Jaskini Kitum. Mimo intensywnego leczenia w szpitalu w Nairobi, zmarł on 15 stycznia. U lekarza udzielającego pomocy rozwinęły się podobne objawy chorobowe 9 dni później, jednak wyzdrowiał. W połowie sierpnia 1987 r. 15-letni Duńczyk, który przebywał w Kenii przez jeden miesiąc został przyjęty do szpitala z historią 3-dniowej gorączki, bólem głowy, wymiotami i biegunką – 9 dni przed wystąpieniem objawów chorobowych odwiedził on Jaskinię Kitum. Mimo intensywnego leczenia wspomagającego zmarł w 11 dniu choroby. Chociaż w obu przypadkach jaskinia była potencjalnym źródłem zakażenia wirusem Marburg, ewentualnego źródła zakażenia nie udało się zidentyfikować. U pawianów i małp zielonych umieszczonych w klatkach i utrzymywanych w Jaskini Kitum przez okres wielu miesięcy w 1980 r. nie doszło do wykrywalnego zakażenia wirusem Marburg. Nie wykazano obecności wirusa w żadnym ze złapanych w jaskini i jej bliskiej okolicy nietoperzy, stawonogów, małych gryzoni, ptaków i innych zwierząt. U żadnej z osób zamieszkujących od dawna w pobliżu jaskini nie wykryto swoistych przeciwciał. Brak zakażenia kropelkowego u małp przetrzymywanych w Jaskini Kitum może być wynikiem ograniczonej replikacji wirusa w obrębie szczególnych tkanek, brakiem wysiewania się wirusa z wydaliniami nietoperzy lub małą liczbą gatunków nietoperzy lub innych potencjalnych rezerwuarów zaangażowanych w utrzymaniu wirusa. Negatywne wyniki izolacji mogą także odzwierciedlać lokalizację wirusa w tkankach, które nie zostały pobrane do badań.

Przełomowe znaczenie w wykryciu potencjalnych rezerwuarów filowirusów miały badania w kopalni złota Goroubwa usytuowanej we wiosce Durba w półn.-wsch. części Konga (DRC- Republika Demokratyczna Konga) w 1999 r., które wskazują na rolę nietoperzy jako potencjalne źródło zakażeń wirusem Marburg. Spośród wielu różnych gatunków nietoperzy, gryzoni, owadów i gadów, które złapano w tej kopalni, w tkankach dwóch gatunków nietoperzy owadożernych, *Miniopterus inflatus* i *Rhinolophus eloquens* oraz w tkankach nietoperza roślinożernego *Rousettus aegyptiacus* stwierdzono obecność RNA genu białka 35 (VP35) wirusa Marburg.

Swoiste przeciwciała wykazano u *Rh. eloquens* i *R. aegyptiacus*. U *R. aegyptiacus* odsetek zakażeń był najwyższy. Gatunek ten reprezentował także największą liczbę nietoperzy w kopalni. Omawiając znaczenie wyników tych badań, należy podkreślić, że analizowane próbki pobrano w okresie trwania czynnego wybuchu choroby g.k. Marburg wśród górników kopalni złota i ich rodzin w okresie od października 1998 r. do września 2000 r. Zakażeniu uległo 154 osób, z których 83% zmarło. Większość zakażonych górników pracowało w podziemiach kopalni Gorumbwa gdzie odnotowano pierwsze przypadki choroby z następowym rozprzestrzenieniem zakażenia wśród członków rodzin górników i w mniejszym stopniu u pracowników służby zdrowia. Analiza filogetetyczna genu VP35 wirusa wykazała obecność identycznych sekwencji nukleotydowych u nietoperzy i ludzi. Otrzymane wyniki wskazują kopalnię Gorumbwa jako źródło zakażenia ludzi wirusem Marburg, czego kolejnym pośrednim dowodem jest fakt wygaśnięcia choroby wkrótce po zalaniu kopalni.



Nietoperze roślinożerne z gatunku *Rousettus aegyptiacus* zamieszkujące kopalnię złota Gorumbwa w półn.-wsch. części DRC. Nietoperze te były najprawdopodobniej źródłem zakażenia wirusem gorączki krwotocznej Marburg podczas wybuchu tej choroby w latach 1998-2000 pośród górników nielegalnie wydobywających złoto. Widoczne na zdjęciu „gwiazdy” to oczy tysięcy nietoperzy.



Sekcje nietoperzy złapanych w kopalni złota Gorumbwa w półn.-wsch. części DRC. Badacze pobierający krew i różne tkanki nietoperzy są wyposażeni w specjalne ubiory bezpieczeństwa włączając urządzenie do filtracji powietrza.

W dniu 21 Marca 2005 r. został potwierdzony wybuch g.k. Marburg w półn. Angoli, na oddziale pediatrycznym Szpitala Rejonowego w Prowincji Uige. Historia objawów chorobowych, wskazuje, że pierwsze przypadki zachorowań wystąpiły już w paźdz. 2004 r. Z 380 przypadków zachorowań, 334 było śmiertelnych (88%). Źródło pochodzenia wirusa i ustalenie pierwszych przypadków zachorowań nie zostało zidentyfikowane. Obserwacje własne wskazują na aktywność nietoperzy owocożernych w okolicy szpitala. Ponadto odnotowano w szpitalu bardzo niską higienę, sprzęt do pobierania krwi, który był zabrudzony krwią można było znaleźć porzucony w trawie jeszcze 6 tyg. po wybuchu choroby. Ten sam wariant genetyczny wirusa był odpowiedzialny za wszystkie przypadki chorobowe i najprawdopodobniej pochodził z jednego źródła. Wielu pacjentów przed przybyciem do szpitala było leczonych przez tradycyjnych ozdrowicieli, włączając stosowanie doodbytniczych preparatów, sporządzonych z lokalnych materiałów roślinnych i zwierzęcych i iniekcje leków z użyciem tej samej igły. Brak zaufania lokalnych mieszkańców w skuteczność służb lekarskich i bardzo niski poziom higieniczny i techniczny szpitala utrudniały szybką izolację osób chorych/zakażonych jak również monitorowanie większej liczby kontaktów. Tradycyjne zwyczaje pochówku zmarłych (tulenie, przygotowanie osoby zmarłej do pogrzebu) przyczyniały się do rozprzestrzenienia wirusa wśród rodzin osób zmarłych. U większości zakażonych pacjentów wystąpiły ostre objawy krwotoczne: silne krwotoki z nosa, uszu, pochwy, krwawa biegunka i wymioty. Niestabilność polityczna w Kongo uniemożliwiła podjęcie jakichkolwiek badań ekologicznych mających na celu ustalenie źródła pochodzenia zakażenia wirusowego.

W lipcu i we wrześniu 2007 r., górnicy wydobywający złoto i ołów w Jaskini Kitum w zach. Ugandzie ulegli zakażeniu wirusem Marburg. Warto nadmienić, że w latach trzydziestych jaskinia ta była głównym źródłem wydobywania ołowiu w Ugandzie. W roku 1979 kopalnia została zamknięta i ponownie otwarta w styczniu 2007 r. W jaskini gnieździło się ponad 100. 000 owocożernych nietoperzy z gatunku *R. aegyptiacus*. Wirusa Marburg

wyizolowano z krwi dwóch górników, jak również po raz pierwszy z tkanek zdrowych nietoperzy złapanych w tej jaskini w sierpniu 2007 i w kwietniu 2008. Wprawdzie izolaty wyosobnione od górników i nietoperzy były genetycznie blisko pokrewne, reprezentowały one odległe linie genetyczne wirusa Marburg.

10 lipca 2007 r. zakażenie wirusem Marburg potwierdzono u Holenderki, pacjentki, która zmarła dzień później w pomieszczeniu izolacyjnym przy Centrum Medycznym Uniwersytetu Leiden. Pacjentka podróżowała w okresie od 5 do 28 czerwca po Ugandzie, włączając wizytę 19 czerwca do Jaskini Python położonej w lesie Maramagambo w zach. części tego kraju. Jaskinia ta znana jest z licznej kolonii nietoperzy *R. aegyptiacus*. Wprawdzie w Holandii nie doszło do zakażeń wtórnych, zidentyfikowano 66 kontakty o wysokim i 64 kontakty o niskim ryzyku zakażenia, które poddano obserwacji przez 21 dni.

Wybuchy gorączki krotoczej Ebola

Wirus Ebola został poraz pierwszy zidentyfikowany w zach. zwrotnikowej prowincji Sudanu (Ebola Sudan) i w pobliskim rejonie Zairu (obecnie DRC – Ebola Zair) w 1976 r. po dużych wybuchach choroby w Yambuku (półn. Kongo) i Nzara (poł. Sudan). W okresie od czerwca do listopada 1976 r. 284 osoby uległy zakażeniu wirusem Ebola w Sudanie, 151 z nich zmarło. W DRC miało miejsce 318 przypadków zachorowań, w tym 280 śmiertelnych. W chwili przyjazdu na miejsce wybuchów choroby międzynarodowych grup badawczych i medycznych choroba właściwie wygasła, co uniemożliwiło podjęcie stosownych badań epidemiologicznych i ekologicznych. Rekonstrukcja wydarzeń i wywiady z osobami, które przeżyły chorobę wykazała, że głównym sposobem rozprzestrzenienia wirusa było używanie niesterylnych igieł i strzykawek oraz brak odpowiednich przepisów dot. kontroli zakażeń w warunkach szpitalnych. Skutkiem tego był wysoki odsetek zakażeń i zgonów pracowników służby zdrowia. Sytuacja ta doprowadziła do zamknięcia szpitala, co wyeliminowało główne źródło rozprzestrzeniania zakażenia. Izolowany przypadek g.k. Ebola wystąpił w Kongo w 1977 r. Kolejny wybuch choroby notowano w Sudanie w 1979 r. – 33 przypadki, w tym 22 śmiertelne. Po pierwszym wystąpieniu g.k. Ebola w Afryce w latach 1976–1979 nie notowano zakażeń tym wirusem aż do 1994 r.

Trzeci podtyp wirusa Ebola, Ebola Reston, został wyizolowany w 1989 r. z małp *Macacca fascicularis* w okresie ich kwarantanny w laboratorium Reston, Virginia, a importowanych do USA z Filipin w 1989 r. Kolejne wybuchy choroby wystąpiły u małp importowanych w 1990 r. w USA (Reston, Virginia and Alice, Texas), i w 1992 r. we Włoszech (Sienna), i ponownie w 1996r. w USA (Alice, Texas). Wykazano, że źródłem wszystkich wybuchów zachorowań było to samo przedsiębiorstwo eksportowe zlokalizowane w pobliżu Manila na Filipinach. Podczas tych wybuchów choroby 4 osoby zostały bezobjawowo zakażone. Źródła zakażenia kolonii małp nie udało się utalić. Próby podjęcia badań w terenie, gdzie złapano małpy były niemożliwe, z uwagi na niestabilną sytuację polityczną w tym kraju. Czwarty podtyp wirusa Ebola został wyosobniony na Wybrzeżu Kości Słoniowej (podtyp Ebola Wybrzeża Kości Słoniowej) z jednego przypadku g.k. u ludzi i u kilku szympanсів w listop. 1994 r.

Kolejny duży wybuch choroby wywołany Ebola-Zair odnotowano w Kikwit w Kongo w 1995 r. – 315 przypadków zachorowań, w tym 250 śmiertelnych. W Gabonie, występowanie g.k. Ebola zostało udokumentowane po raz pierwszy w 1994 r. następnie w latach 1995–1996. W 2000 r. pojawienie się g.k. Ebola odnotowano w Gulu w półn. Ugandzie. W okresie od września 2000 r. do stycznia 2001 r., podtypem Sudan uległo zakażeniu 425 osób, z których 224 zmarły. Dotychczas jest to największy z wybuchów choroby g.k. Ebola. Od października do grudnia 2003 r. kilka wybuchów g.k. wywołanej wirusem Ebola-Zair wystąpiło w Gabonie i w Kongo. W 2004 r. miał miejsce kolejny wybuch g.k. Ebola w Sudanie.

Niezwykle doniosłym osiągnięciem w tej fascynującej, lecz niezwykle trudnej do realizacji sferze badań była nasza pierwsza na świecie publikacja w czasopiśmie *Nature* donosząca o wykryciu przeciwciał przeciw wirusowi Ebola-Zaire oraz kwasu nukleinowego (RNA) tego wirusa w wątrobie i śledzionie 3 gatunków nietoperzy roślinożernych (*Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti*, *Myonycteris torquata*) złapanych w latach 2002–2003 w Gabonie i w Republice Konga.

Związane z tym tematem są także nasze badania nad występowaniem przeciwciał przeciw wirusowi Ebola-Zaire u pigmejów zamieszkujących półn.-wsch. część DRC. Wykazano u nich wysoki odsetek dodatnich wyników serologicznych bez objawów klinicznych choroby. Uczestnicy tych badań, stanowiący pół-koczowniczą populację lasu tropikalnego w rejonie Watsa związani byli z działalnością, klasyfikowaną jako czynnik ryzyka zakażenia filowirusami, m.in. polowanie, obróbkę dziczyzny, wchodzenie do jaskiń oraz kontakt z gryzoniami, nietoperzami i małpami. Uzyskane wyniki sugerują możliwość krążenia w naturze mniej zjadliwych szczepów wirusa Ebola lub istnienie u ludzi genetycznego podłoża podatności na zakażenie tym wirusem.



Przygotowanie laboratorium polowego do sekcji zwierząt w pobliżu wioski Ekata w pół.-wsch. części Gabonu gdzie notowano śmiertelne przypadki zachorowań na gorączkę krotoczną Ebola u ludzi i zwierząt w 2002 r.



Sekcja nietoperza złapanego w Gabonie w 2002 r. U trzech gatunków nietoperzy roślinożernych stwierdzono obecność materiału genetycznego oraz przeciwciała przeciw wirusowi Ebola.

W okresie od maja do listopada 2007 r. z 260 przypadków zakażenia wirusem Ebola w Luebo w Zachodniej Prowincji Kasai w Kongo, 186 pacjentów zmarło. Pierwszy podejrzany osobnik zakupił świeżo zabitego nietoperza, (najprawdopodobniej *Hypsignathus monstrosus*) do konsumpcji, co stało się źródłem śmiertelnego zakażenia dla członków jego rodziny. Nasza ekspedycja naukowa do Luebo w maju 2011 r., potwierdziła obecność gatunków nietoperzy, które zajmują wysokie miejsce na liście potencjalnych rezerwuarów filowirusów. Piąty podtyp wirusa Ebola, Bundibugyo, wyizolowano z przypadków g.k. u ludzi, które notowano w listopadzie 2007 r. w prowincji o tej samej nazwie w zach. Ugandzie.

Naturalne rezerwuary filowirusów i ich transmisja

Jedną z hipotez zakłada, że filowirusy są wirusami stawonogów lub roślin. U pośrednich gospodarzy wirus pochodziłby od niekrwiożernych owadów drogą ich spożycia bądź w wyniku ukąszenia. Paradoksalny wydaje się pogląd, że wirus Ebola, który wywołuje chorobę o wysokiej śmiertelności, jest może być szeroko rozpowszechniony w Afryce. Postuluje się, że jest on reprezentowany przez krzyżowo-reaktywne, enzootypne, niechorobotwórcze odmiany o różnych cyklach życiowych lub przekształca się w chorobotwórcze warianty drogą mutacji. Przypuszcza się, że filowirusy mogą trwale lub chronicznie zakażać naturalne rezerwuary. Małe człokształtne mogą być źródłem zakażenia dla człowieka. Najprawdopodobniej nie są one jednak naturalnymi rezerwuarami filowirusów biorąc pod uwagę silną chorobotwórczość tych wirusów dla afrykańskich małp, makaków, szympanсів i goryli. U małp nie wykazano dowodów, wskazujących na zakażenie chroniczne, czy też latentne. Wirus Marburg był jednak izolowany z immunologicznie uprzewilowanych miejsc i wydzielin od 1–3 m-cy po zakażeniu. Wprawdzie podczas wybuchu g.k. Ebola w Kikwit nie wykazano przypadków późnej transmisji wirusa na osoby mające kontakt z ozdrowieńcami, stwierdzano obecność RNA wirusa Ebola w nasieniu i wydzielinie pochwy, utrzymującą się do czterech m-cy po zakażeniu. Badania immunohistochemiczne wykazały także obecność wirusa w jądrze jednego ze zmarłych pacjentów. W warunkach domowych ważną rolę w przenoszeniu wirusa ma bliski kontakt i ekspozycja na płyny ustrojowe, szczególnie dotyczy to osób opiekujących się zmarłymi, u których wykazano największy odsetek wtórnych transmisji. Dotykanie zwłok podczas pochówku stanowi wysokie ryzyko na zakażenie w związku z wysoką koncentracją wirusa Ebola w skórze.

Badania eksperymentalne wykazały możliwość szerzenia się zakażeń filowirusami drogą powietrzną. Podczas epizootii Ebola-Reston w warunkach kwarantanny małp obserwowano przenoszenie się wirusa w obrębie tych samych i oddzielnych pomieszczeń gdzie przetrzymywano zwierzęta. Stwierdzono wysokie koncentracje wirusa w wydzielinie nosa i gardła oraz jego obecność w pęcherzykach płucnych. Wirusy Ebola w warunkach klinicznych nie są efektywnie przenoszone przez aerozole zakaźne wytwarzane przez pacjentów.

Liczba pacjentów, która nie miała bezpośredniego i bliskiego kontaktu ze znanymi przypadkami chorobowymi jest marginalna. Wyniki badań przeprowadzonych u małp wskazują na możliwość infekcji drogą zakażenia worka spojówkowego i jamy ustnej. Notowano wzrost ryzyka zakażenia podczas kontaktu z pacjentami w późnej fazie choroby, co wskazuje na istnienie podwyższonego poziomu koncentracji wirusa w wydalinach w miarę rozwoju choroby. Ekspozycja śluzówek, kontaminacja gardła podczas połykania, drobne uszkodzenia skóry, czy infekcja drogą połykania materiału zakaźnego mogą sprzyjać transmisji wirusa.

Z wyjątkiem szczegółowych badań przeprowadzonych w RPA po wystąpieniu przypadków g.k. Marburg w 1975 r., wysiłki zmierzające do określenia ekologii i naturalnej historii filowirusów były do 1995 r. bardzo ograniczone a podejmowane miały zwykle miejsce na wiele miesięcy po wybuchu choroby. W czasie wybuchu g.k. Ebola-Zair w Kongo w 1976 r. złapano ponad 800 pluskiew i 147 ssaków, głównie małych gryzoni – wszystkie były ujemne w testach na obecność wirusa Ebola. W czasie wybuchu Ebola-Sudan w 1976 r. magazyn w Nzara, w którym przechowywano wełnę i gdzie spoczywały kolonie nietoperzy był podejrzewany jako potencjalne źródło wirusa. Żadna ze zbadanych tylko 100 prób od 501 kręgowców złapanych w tym miejscu nie była dodatnia na obecność wirusa Ebola. Również wszystkie badane próbki (surowica, skóra, wtroba, nerki, gruczoły ślinowe, jądra sledziona) od 1224 zwierząt reprezentujących 117 gatunków, włączając 267 naczelnych, 463 nietoperzy i ponad 500 gryzoni, upolowanych w okresie od czerwca do lipca 1979 r. w Kongo i w marcu 1980 r. w Kamerunie były wirusologicznie i serologicznie ujemne. Podczas pierwszych znanych wybuchów g.k. Ebola w DRC i Sudanie w 1976 r. większość przypadków choroby była wynikiem transmisji wirusa między ludźmi. Badania ekologiczne były podjęte dopiero po wielu miesiącach od czasu odnotowania pierwszych zachorowań. Nie ma pewności, czy zgromadzony materiał stanowi wiarygodną reprezentację tych wydarzeń, które istniały w czasie i miejscu pierwotnej ekspozycji na wirusa Ebola.

Zarejestrowanym przypadkiem wybuchu g.k. Ebola w DRC w 1995 r. był 42-letni mężczyzna zajmujący się produkcją węgla drzewnego i zamieszkujący w Kikwit. Podróżował on często na rowerze z Kikwit przez sawannę do miejsca w lasie, gdzie był eksponowany na rośliny i zwierzęta żyjące na koronach drzew, w ziemi, w norach i jamach itp. Miał on małe gospodarstwo w pobliżu lasu, blisko strumienia. Biorąc pod uwagę ogromną różnorodność gatunków zwierząt tropiku, za pomocą siatek rozwieszonych w kilku różnych biotypach w rejonie Kikwit, w obrębie miasta oraz wzdłuż trasy jego podróży z domu do lasu i gospodarstwa (ok 15 km w jedną stronę) kolekcjonowano owady i zwierzęta. W okresie od czerwca do sierpnia 1995 r. (sezon suszy, wybuch choroby rozpoczął się w styczniu – okres deszczowy) złapano 34 985 stawonogów (komary, pluskwy, kleszcze, mszyce, muchy), z tego zbioru zbadano wirusologicznie 27 843 próbek. Wirusa Ebola nie wykazano w żadnej z badanych próbek. W tych samych miejscach złapano 3066 kręgowców, włączając 2663 ssaków, 265 ptaków, 129 gadów i płazów. Wszystkie gatunki okazały się w badaniach wirusologicznych i serologicznych ujemne.

Rezerwuarem filowirusów może okazać się bardzo rzadki gatunek, sporadycznie kontaktujący się z wtórnymi gospodarzami, a jeżeli nawet dochodzi do kontaktu, to wirus nie jest z łatwością przenoszony. Różnorodność biologiczna w obszarach gdzie zachodzi transmisja filowirusów jest ogromna, a zaangażowane gatunki najprawdopodobniej reprezentują tylko nieznaczną frakcję biotypu i są trudne do schwytania. Kręgowce zaangażowane w transmisję mogą nie wytwarzać wykrywalnej lub długo utrzymującej się dpowiedzi immunologicznej. Dodatkowo wyniki badań serologicznych niekoniecznie wskazują na to czy zakażone gatunki są pierwotnymi, pośrednimi czy przypadkowymi gospodarzami w cyklu transmisyjnym wirusa. Filowirusy mogą reprezentować różnorodny zbiór wariantów o różnych cyklach transmisji. Zjadliwe szczepy mogą nie utrzymywać się na stałe w lokalnych rezerwuarach, lecz wywoływać tylko przemieszczające się epizootcje, które powracają po długim okresie czasu do jednej z lokacji. Jest również możliwe, że chorobotwórcze szczepy filowirusów nie mają ustalonego cyklu transmisji, a pojawiają się od czasu do czasu w drodze mutacji enzootypycznych odmian.

Chociaż wydaje się to mało prawdopodobne, nie można całkowicie wykluczyć możliwości pierwotnej transmisji filowirusów przez stawonogi. Wykazano, że komary z rodzaju *Culex* i *Aedes* nie namnażają wirusa Ebola Reston, ale komary z rodzaju *Aedes* utrzymują wirusa Marburg przez okres 3 tyg., co wskazuje na to, że niektóre stawonogi eksponowane na tego wirusa mogą być przejściowymi lub stałymi przenosicielami zakażenia. Wiele potencjalnych nosicieli z grupy owadów krwiożernych (np. muchy, komary, kleszcze, pchły, roztocza pasożytnicze na nietoperzach) nie było badanych drogą eksperymentalnego zakażenia. Jest również możliwe, że transmisja do naczelnych lub innych pośrednich gospodarzy zachodzi za pośrednictwem spożywania owadów niekrwiożernych. Wrażliwość insektów używanych przez ludzi lub zwierzęta jako źródła pokarmu (np. termity, mole, larwy owadów) na zakażenie filowirusami również nie była dotychczas badana.

Ekologia wirusa Marburg

Kontakt pomiędzy wrażliwymi małpami i ludźmi a naturalnym rezerwuarem wirusa Marburg stanowi niezwykle rzadkie wydarzenie. Wskazuje na to bardzo niska liczba notowanych wybuchów choroby i niski odsetek wykrywalnych swoistych przeciwciał. Chociaż rozmieszczenie filowirusów jest podobne, te jednak wirus Marburg występuje w bardziej suchych obszarach sawanny połud. Afryki. Zakażenia wirusem Marburg ludzi było często związane z przebywaniem w jaskiniach lub kopalniach (1980, 1982, 1998–2000, 2007). Znane są jednak także przypadki tej choroby bez historii przybywania ludzi w tych szczególnych środowiskach. Sugeruje to, że występowanie ewentualnego źródła zakażenia w środowisku jaskiń czy kopalń nie jest stałe, lecz przemijające. Nietoperze spędzają ponad połowę swojego życia w spoczynku, ukrywając się szczególnie w jaskiniach i szczelinach skalnych. Kontakt z zakażonym nietoperzem, jego zwłokami, wydzielinami i wydaliniami lub pasożytami zewnętrznymi może zachodzić w czasie odwiedzin tych miejsc. W nocy nietoperze przemieszczają się z łatwością do kilku km od miejsca spoczynku. U nietoperzy występuje ogromna różnorodność sposobów odżywiania się. Większość gatunków jest owadożerna, ale istnieją także gatunki drapieżne, rybożerne, owocożerne, a trzy połud.-afrykańskie gatunki wampirów przystosowały się do odżywiania krwią ptaków i ssaków. Nietoperze owadożerne głównie odżywiają się komarami, ohotkami, motylami, chruścikami i innymi owadami latającymi nocą, preferując owady odbywające rójkę nad wodą. Ofiary chwytają w locie lub zbierają z powierzchni roślin, obok owadów latających nocą chwytają także pająki oraz owady nielatające, np. chrząszcze z rodziny biegaczowatych. Polują także w pobliżu koron drzew lub krzewów. Wiele gatunków jak np. *Rousettus* występuje w dużych skupieniach, inne pojedynczo lub w małych grupach.

Koncepcja najprostszego mechanizmu przenoszenia filowirusów do ludzi zakłada, że są one utrzymywane w naturze przez nietoperze, u których mogłyby się rozprzestrzeniać w wyniku ugryzienia, bezpośredniego kontaktu, transmisji seksualnej lub przez swoiste dla nich pasożyty zewnętrzne. Filowirus miałby wówczas być przenoszony na ludzi lub małpy albo poprzez kontakt z nietoperzami lub poprzez kontakt z pośrednim zwierzęciem zakażonym przez nietoperze. Przykładem może być tutaj zakażenie zielonych małp w Ugandzie, które po sprowadzeniu do Europy stały się źródłem zakażenia ludzi. Bardziej złożony cykl transmisji zakłada, że filowirusy są wirusami owadów (lub roślin), z których przenoszą się na kręgowce, włączając nietoperze i inne owadożerne gatunki albo w trakcie pobierania pokarmu lub poprzez ukłucie czy ugryzienie. Ta bardziej kompleksowa hipoteza cyklu transmisji jest postulowana na podstawie epidemiologicznych wydarzeń dotyczących przypadku g.k. Marburg w 1975 r. w RPA. Niektóre z gatunków nietoperzy, których dystrybucja odpowiada rozprzestrzenianiu się choroby Marburg odżywiają się poruszającymi się po ziemi stawonogami jak żuki, karaluchy, koniki polne, skorpiony i pająki.

Możliwe, że zarówno nietoperze czy inne owadożerne kręgowce nie są pierwotnymi rezerwuarami, ale ulegają infekcji przez odżywianie się zakażonymi owadami. Taki scenariusz wyjaśniałby zakażenie drogą ukłucia lub ugryzienia w przypadku choroby Marburg opisaną w 1975 r. Czy jest możliwe, że filowirusy są pierwotnie wirusami owadów transmitowanymi do owadożernych kręgowców, odżywiających się nimi? Jeśli pokarm stanowiłby jakiś niezwykły komponent ich diety, mogłoby to wyjaśniać rzadkość notowanych cykli transmisyjnych. Wtórne cykle transmisyjne mogłyby zachodzić pomiędzy kręgowcami (np. nietoperzami), lecz byłoby to również wyjątkowe zdarzenie, szczególnie w przypadku gatunków nietoperzy żyjących samotnie. Narażenie człowieka na zakażenie mogłoby zachodzić podczas kontaktu z zakażonym owadem lub pośrednim predatorem. W rozważaniach na temat ekologii wirusa Marburg należy również uwzględnić gryzonie. Laboratoryjne gryzonie, jak świnki morskie i chomiki są wrażliwe na zakażenie tym wirusem.

Ekologia wirusa Ebola

Ekologia wirusa Ebola jest bardziej złożona niż wirusa Marburg, głównie z uwagi na występowania pięciu podtypów tego wirusa i na różnice w ich geograficznej dystrybucji. Chociaż cykle transmisji podtypów wirusa Ebola mogą być ogólnie podobne, ich specyficzne gatunki rezerwuuarowe najprawdopodobniej różnią się w zależności od obszaru występowania. Przypadki zachorowań ludzi są związane tylko z zakażeniem podtypem Zair, Sudan, Wybrzeża Kości Słoniowej, Bundibugo w zach. i centr. Afryce. Ekologia wirusa Ebola jest ściśle związana z ekosystemem lasu deszczowego, chociaż przypadki chorobowe u ludzi miały miejsce także na terenach lasów i sawanny w Sudanie i Ugandzie. Występowanie odmiennego serotypu wirusa Ebola na Filipinach ma ważne implikacje dla ekologii filowirusów. Sugeruje bowiem, że w pewnym czasie ich ewolucji mogły być one przenoszone przez migrujące ptaki. Mechanizm transmisji wirusa Ebola-Reston nie został dotychczas poznany. Z kilku miejsc, w których małpy były utrzymywane i rozmnażane przed wysyłką do USA

lub Europy, w okresie 7 lat tylko jedno z nich dotknięte było zakażeniem tym wirusem. Być może wirus Ebola-Reston został sztucznie wprowadzony na Filipiny z Afryki np. drogą nielegalnego transportu małp lub ich mięsa. Wyniki zakażeń doświadczalnych przeprowadzonych na małpach wykazały, że afrykańskie podtypy wirusa Ebola są bardziej zjadliwe niż podtyp azjatycki oraz na to, że wirus Ebola Zair jest bardziej chorobotwórczy niż wirus Ebola Sudan. Obserwowane różnice w chorobotwórczości podtypów wirusa Ebola sugerują istnienie wariantów wirusa o odmiennych właściwościach chorobotwórczych. W przeciwieństwie do wirusa Marburg, który wywołuje sporadyczne infekcje, odsetek występowania przeciwciał anti-Ebola w niektórych populacjach ludzi w centr. Afryce może przekraczać 30%. Sugeruje to, że zakażenie tym wirusem jest dość powszechne i wywoływane jest przez szczepy wirusa o niskiej zjadliwości.

Z punktu widzenia postulowanej ekologii enzoptycznych wirusów Ebola interesujące są wyniki badań serologicznych, które wykazały znacząco wyższy odsetek przeciwciał anti-Ebola u myśliwych niż u farmerów w centr. Afryce. Występowanie przeciwciał anti-Ebola jest zgodne z ryzykiem ekspozycji na wirus, który może mieć miejsce podczas polowania, dotykania i obróbki dziczyzny. Do niedawna, preferencje myśliwych i kłusowników nie były uwzględnione w grupach zwierząt złapanych do badań. Do najbardziej cenionego mięsa z buszu w półn.-wsch. części Gabonu należą koczodany, szympanse, goryle, dzikie świnię, antylopy duiker, łuskowce, jeżozwierze, cywety. Zmiany w demografii, zachowaniu się ludzi, głód, powszechna bieda i co się z tym wiąże ujemny wpływ na populacje zwierząt dzikich wynikający ze wzrastającej eksploatacji nowych terenów lasu tropikalnego w poszukiwaniu żywności, przygotowaniem terenu do uprawy manioku i kukurydzy. Prowadzi to także do spożywania szerszego wachlarza gatunków zwierząt, włączając mniejsze gatunki i ryzyko kontaktu z rezerwuarami filowirusów, bądź zakażonymi przez nie dzikimi zwierzętami. Wprowadzenie nieselektywnych pułapek umożliwia łapanie zwierząt wcześniej niespotykanych. Nocne polowania z użyciem światła i broni palnej sprzyja możliwości kontaktu ze zwierzętami aktywnymi tylko nocą. Wzrasta praktyka używania siatek do łapania nietoperzy na konsumpcję, które w różnych formach kulinarnych można nabyć na jarmarkach żywności w centr. Afryce. Praktyki łowieckie, sposób przyrządzania i spożywanie szerszego asortymentu dziczyzny mogą sprzyjać zwiększonemu kontaktowi ludzi zarówno z enzoptycznymi, jak i zjadliwymi odmianami wirusa Ebola.

Zakażenia ludzi wynikające z ekspozycji na dzikie, zakażone szympanse lub goryle, które zabito celem zdobycia mięsa (Gabon 1996) lub poddanych badaniom pośmiertnym z powodu choroby (Wybrzeże Kości Słoniowej 1994) dostarczyły dalszych informacji co do źródła wirusa Ebola. Po wprowadzeniu wirusa do populacji szympansów jest on najprawdopodobniej transmitowany podczas ścisłych bezpośrednich kontaktów socjalnych między tymi zwierzętami np. podczas obrządków pielęgnacyjnych, zabaw lub stosunków seksualnych. Jedną z hipotez zakłada, że szympanse zakażają się podczas dotykania lub spożywania upolowanej zdobyczy, podobnie jak ludzie polując na szympanse lub inne dzikie zwierzęta. Szympanse są wszystkożerne i ich sposób przemieszczania się od poziomu ziemi do ponad 20 m wysokości lasu umożliwia dostarcenie do pierwotnego źródła zakażenia w naturze. Szympanse polują na różnorodne owady (termity, mrówki, chrząszcze, mole, pszczoły, gąsienice), jaszczurki, ptaki (tkacze, inne gniazdownce i ich jaja), wiewiórki, dzikie świnię, antylopy, małpy wąskonosy (madryle, pawiany, koczodany). Mimo stałej obserwacji populacji szympansów przez człowieka, do 2000 r. znane były tylko trzy przypadki zakażeń wirusem Ebola u tych zwierząt. Sugerowało to, że szympanse mają bardzo sporadyczny kontakt ze zjadliwymi szczepami wirusa Ebola, prawdopodobnie wskutek ekologicznej bariery jaka normalnie istnieje pomiędzy szympansami a rezerwuarem wirusa w środowisku tropiku. W latach 2000–2003 doszło do dramatycznej redukcji liczby goryli, szympasów i antylop w Gabonie i Republice Konga. Chociaż tylko ograniczona liczba padłych zwierząt została przebadana, otrzymane wyniki sugerują, że drastyczna depopulacja tych zwierząt była spowodowana zakażeniem wirusem Ebola.

Na uwagę zasługują wyniki badań różnych gatunków nietoperzy złapanych w latach 2003–2008 w Gabonie, które sugerują, że egipski nietoperz owocozerny (*Rousettus aegyptiacus*) może być zaangażowany w naturalnej transmisji zarówno wirusów Marburg i Ebola. Intrygujące są także wyniki niedawnych badań serologicznych, które wskazują na szerokie rozpowszechnienie zakażeń wirusem Ebola w populacji psów w Gabonie. Specyficzne przeciwciała wykazano nie tylko u psów w endemicznych obszarach choroby tego kraju, lecz także poza dotychczasowym zasięgiem występowania, mianowicie w jednych z największych miast Gabonu położonych na wybrzeżu atlantyckim, m.in. w stolicy Gabonu, Libreville. Bezobjawowe zakażenia psów wynikają najprawdopodobniej ze spożywania zakażonych padłych lub zabitych przez lokalnych myśliwych dzikich zwierząt.

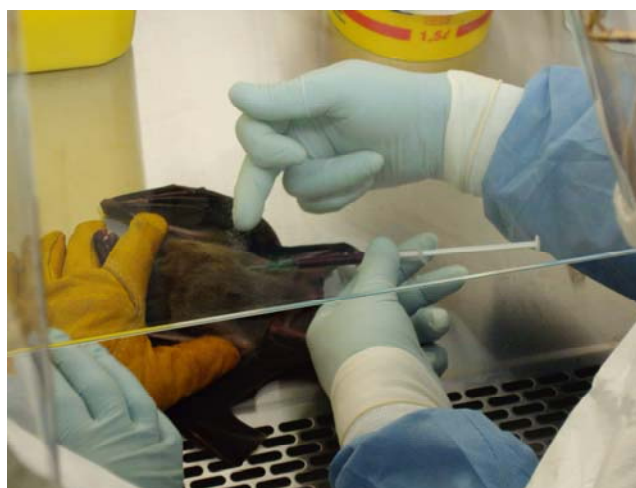
Zakażenia doświadczalne nietoperzy

Ze względu na bardzo kosztowne, często ryzykowne i nie zawsze możliwe badania ekologii filowirusów w terenie, zakażenia eksperymentalne potencjalnych rezerwuarów byłyby pomocne w zrozumieniu i ustaleniu swoistych mechanizmów przetrwania i rozprzestrzeniania się tych wirusów w naturze. Lista potencjalnych gatunków nietoperzy podejrzanych o transmisję filowirusów jest długa, stąd zakażenia doświadczalne podjęte będą z użyciem wyselekcjonowanych gatunków. Ich celem będzie określenie natury zakażenia, mechanizmów utrzymania i rozsiewu filowirusów w populacji nietoperzy. Czy dochodzi u nich do zakażenia, które samo wygasa, czy ma ono przebieg ostry, przewlekły czy śmiertelny? Czy wytwarzają trwałą odpowiedź immunologiczną? Czy wirus rozsiewany jest przez ślinę, kał, mocz lub nasienie? Jak długo filowirusy przeżywają w środowisku zabrudzonym przez ich wydaliny i wydzieliny, obecne np. na owocach mango, bananach, pigwach itd. Jak długo przeżywa w mięsie nietoperzy? To niektóre z pytań wymagające odpowiedzi. Nietoperze są także zainfekowane przez szeroki wachlarz swoistych pasożytów zewnętrznych, z nich, niektóre są osobliwymi owadami kłująco-ssącymi. Zakażenia eksperymentalne pasożytów zewnętrznych ssących krew nietoperzy mogłyby więc być także pomocne w wykryciu mechanizmów transmisji filowirusów u tych gatunków zwierząt.

Zespół którym obecnie kieruję z powodzeniem ustalił laboratoryjną kolonię *Rousettus aegyptiacus*. Po osiągnięciu odpowiedniej liczby, struktury wiekowej, płciowej i stanu fizjologicznego kolonia ta użyta będzie do eksperymentalnych zakażeń wirusami Marburg i Ebola. Planowane jest założenie nowych, wyselekcjonowanych koloni nietoperzy owocożernych i owadożernych jak również ustalenie pierwotnych linii komórkowych różnych gatunków nietoperzy do zakażeń doświadczalnych. Zakażenia eksperymentalne będą również prowadzone z użyciem pasożytów zewnętrznych nietoperzy. Zostaną także podjęte długoterminowe badania serologiczne wyselekcjonowanych populacji ludzi i zwierząt w obszarach endemicznych filowirusów celem ustalenia dynamiki i źródeł pierwotnych zakażeń.



Laboratoryjna kolonia egipskiego nietoperza roślinożernego (*Rousettus aegyptiacus*). Jednostka Specjalnych Patogenów Narodowy Instytut Chorób Zakaźnych, Johannesburg, RPA.



Pobieranie krwi do badań serologicznych od zakażonego doświadczalnie wirusem SARS CoV *Rousettus aegyptiacus* w warunkach laboratorium trzeciej klasy bezpieczeństwa (BSL3). Jednostka Specjalnych Patogenów. Narodowy Instytut Chorób Zakaźnych, Johannesburg, RPA