

Wirus Ebola Reston u zwierząt i człowieka

Zdzisław Gliński

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Epidemie gorączki krwotocznej Ebola, które cechują się śmiertelnością od 25 do 90%, ponownie zwróciły uwagę na dwa gatunki wirusa Ebola: Ebola Reston (RESTV) i Ebola Taï Forest. Choroba Ebola najczęściej występuje w krajach tropikalnych, ale odnotowano również przypadki zachorowań w Europie, Azji i Ameryce Północnej. Pomimo że ryzyko zakażenia wirusem Ebola jest bardzo małe, chyba że miał miejsce bezpośredni kontakt z płynami ustrojowymi żywej lub martwej osoby zakażonej bądź żywego lub martwego zakażonego zwierzęcia, to przy braku skutecznego leczenia tylko rygorystyczne przestrzeganie zaleceń sanitarnych pozwala ograniczyć zasięg epidemii (1). Na terenach epidemicznych choroby można się też zakażać przez bezpośredni kontakt z krwią i płynami ustrojowymi żywych lub martwych małp, antylopy i nietoperzy (2). RESTV to jedyny z 5 gatunków wirusa Ebola, który jest chorobotwórczy dla makaków jawańskich (*Macaca fascicularis*) i świń, zaś u ludzi wywołuje jedynie, jak dotychczas, w ogromnej liczbie przypadków, zakażenia bezobjawowe (3, 4). Jednak nie wiadomo, jaki będzie przebieg zakażenia u dzieci i osób starszych oraz u pacjentów z niedoborami immunologicznymi. Koczkodany zielone (*Cercopithecus aethiops*) zakażone dootrzewnowo chorują, a część ginie. Istnieje też duże prawdopodobieństwo transmisji RESTV ze świni na człowieka, a także możliwość uzjadliwiania wirusa przez pasaża na świnia. Nie można też wykluczyć wystąpienia takich zmian w genomie RESTV, że w ich

następstwie wirus przekroczy barierę międzygatunkową pomiędzy małpami, świniami lub nietoperzami a innymi gatunkami zwierząt i nabędzie zdolności do szerzenia się w tych nowych populacjach.

Epidemiologia

Wirus Reston wyizolowano po raz pierwszy w 1990 r. w miejscowości Reston w USA od makaków jako nowy szczep wirusa Ebola i zaliczono do rzędu *Mononegovirales*, rodziny *Filoviridae*. Małpy sprowadzono z Filipin w 1989 r., przy czym u 4 osób z personelu opiekującego się małpami stwierdzono obecność przeciwciał dla szczepu Zair wirusa Ebola. Nikt jednak nie zachorował (5). Późniejsze badania ustaliły, że przyczyną zakażenia nie był szczep Zair, ale RESTV. W grudniu 2008 r. stwierdzono, że zachorowania na farmie świń w Manili wywołał RESTV, w 2009 r. okazało się, że jedna z osób personelu obsługi farmy została zakażona. Potwierdzono więc po raz pierwszy możliwość transmisji RESTV ze świni na człowieka obsługującego fermę świń. U 6 osób z obsługi wystąpiła serokonwersja przy braku jakichkolwiek objawów choroby. W 2008 r. wyosobniono RESTV w Chinach od świń chorych na zespół rozrodco-oddechowy (PRRS; 6). Przeciwciała dla RESTV oraz innych filowirusów występują ponadto u różnych gatunków nietoperzy roślinożernych w Chinach i Bangladeszu (7). Dotychczas znane są szczepy wirusa: Reston 08-A, Reston 08-C, Reston 08-E, Reston-89 i Reston-96.

Ebola Reston virus in animals and humans

Gliński Z., Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

This article aims at the presentation of an emerging viral pathogen. Viruses of the genus *Ebolavirus* (Filoviridae), cause severe haemorrhagic fever outbreaks in humans in Africa with a mortality rate ranging from 25% to more than 90%. Ebola Reston virus (REBOV), was first reported in 1989 from several quarantine facilities in Reston, USA, where wild-caught crab-eating monkeys (*Macaca fascicularis*), imported from the Philippines became ill and some of them died. In October 2008, for the first time REBOV infection was confirmed in the Philippines, in swine farms with increased pigs mortality. It has been established that people occupationally exposed seroconverted during the first outbreak in monkeys, but remained asymptomatic. REBOV is highly transmissible by exposure to droplets of body fluids and tissues from infected animals. Replication of virus in internal organs and viral shedding from the nasopharynx was documented in the absence of clinical signs in the infected pigs.

Keywords: Ebola Reston virus, pig, monkey, humans.

Charakterystyka RESTV

Wirus Ebola Reston, podobnie jak pozostałe cztery wirusy z rodzaju *Ebola* (*Filoviridae*): Bundibugyo (BDBV), Sudan (SUDV), Taï Forest (TAFV) i Zaire ebolavirus (EBOV) ma genom o długości ~19 kb. Materiałem genetycznym wirusa jest jednoniciowy RNA o polaryzacji ujemnej (ssRNA⁻) zwinięty wokół białek NP, VP30, VP35 i L otoczony zewnętrzną otoczką wyposażoną w 10 nm glikoproteinowe wypustki (GP). Pomędzy kapsydem a otoczką są zlokalizowane białka wirusa VP40 i VP24 (8). Siedem genów koduje struktury wirusa Ebola. Gen NP koduje nukleoproteinę, VP35 – kompleks proteinowy polimerazy, VP40 – białko matrix, sGP – małą niestrukturalną wydzielniczą

glikoproteinę, GP – strukturalną glikoproteinę, VP3 – czynnik aktywacji transkrypcji, VP24 – białko związane z błoną, natomiast L koduje polimerazę RNA zależną (9). Wirus replikuje się w hodowli makrofagów i komórek Vero E6 (10). W środowisku naturalnym w 18°C, w zależności od wielkości stężenia początkowego, w materiale wysuszonym lub wilgotnym nie traci żywotności przez kilka dni. Ulega degradacji po kilku godzinach pod wpływem UV, promieni gamma, 1% formaldehydu lub rozpuszczalników organicznych (11).

Chorobotwórczość dla zwierząt

Część małp *Macaca fascicularis* i małp zielonych zakażonych dootrzewnowo przez RESTV pada w ciągu miesiąca, część przeżywa zakażenie i cechuje się wysokim mianem przeciwciał, które utrzymują się przez 2 lata. W tym okresie nie stwierdzono obecności kopii RESTV w organizmie seropozytywnych małp. Chorobotwórczość dla zwierząt laboratoryjnych zbadano na myszach (BALB/c i STAT1^{-/-}), świnkach morskich i chomikach syryjskich zakażonych dootrzewnowo dawką 10⁵ cząsteczek wirusa, szczepu Pensylwania i Reston 08-A. Chociaż wirus replikował się w organizmie chomików, świnek morskich i myszy STAT1^{-/-}, to chorowały jedynie myszy, przy czym szczep Pensylwania cechował się większą chorobotwórczością od pozostałych szczepów (12). Efektem zakażenia *M. fascicularis* i *C. aethiops* była ostra wiremia, zaś metodą izolacji oraz testem PCR stwierdzono obecność wirusa w surowicach i w tkankach w pierwszych 15 dniach po zakażeniu. Większość małp przeżyła zakażenie i wyzdrowiała po miesiącu. Pomimo że nie wykazano w ich organizmie kopii RESTV, to stwierdzono wysokie miano przeciwciał w okresie 2 lat po zakażeniu. Znane są przypadki, w których śmiertelność u małp dochodziła do 80%. Chorobę cechowała utrata łaknienia, obrzęk powiek, łzotok, wyciek z nozdrzy, kaszel i obrzęk śledziony. Rzadziej występowała gorączka, wybroczyny podskórne, krwawienie z nosa lub krwawa biegunka. U niektórych zwierząt, które padły, po zakażeniu nie występowały żadne objawy chorobowe.

Wirus intensywnie replikuje się w makrofagach tkankowych, fibroblastach, makrofagach i monocytach krwi obwodowej, rzadziej w śródbłonku naczyń krwionośnych, hepatocytach, komórkach kory nadnerczy i nabłonku kanalików nerkowych. Rzadko replikuje się w nabłonku błon śluzowych, nabłonku jelit, eozynofiliach i komórkach plazmatycznych, natomiast nie stwierdzono replikacji RESTV w limfocytach, w przeciwieństwie do wirusa Zair Ebola. Wirus był obecny w pęcherzykach płucnych i błonie podstawnej kanalików

nerkowych. Następstwem zakażenia wirusowego fibroblastów śródmiąższowych i makrofagów są uszkodzenia tkanki łącznej. Ogniskowa martwica narządowa jest skutkiem niedokrwienia spowodowanego przez złogi włókniaka i zakrzepy spowodowane przez płytki krwi (13).

Stosując technikę qPCR i metody diagnostyki serologicznej (ELISA, Western blot), zidentyfikowano zakażenie przez RESTV u 21 gatunków nietoperzy na Filipinach. RNA wirusa występował w wymazach z gardła, odbytu, dróg rodnych i w moczu nietoperzy roślinożernych z rodzaju podkaszaniec (*Miniopterus*). Kopie RNA wirusa występowały w wątrobie i śledzionie, czasem we krwi. W surowicach występowały przeciwciała dla wirusa. Izolaty wirusa od nietoperzy różniły się jednym nukleotydem w RNA od izolatów pochodzących od świń (14, 15). Podobnie jak nietoperze roślinożerne w Afryce, które są naturalnym rezerwuarem wirusów Ebola i Marburg (16). Istnieje też pogląd, że nietoperze roślinożerne z gatunku rudawiec sundajski (*Rousettus amplexicaudatus*) na Filipinach stanowią rezerwuara RESTV (17).

Świnie są wrażliwe na zakażenie eksperymentalne oraz na zakażenie naturalne RESTV. Izolaty RESTV pochodzące z płuc i węzłów chłonnych świń z trzech hodowli wykazywały około 4% różnic w nukleotydach w porównaniu do izolatów pochodzących od małp, co może świadczyć o możliwości zakażenia świń i małp z tego samego źródła (18). Prosięta w wieku 5 tygodni zakażone dawką 10⁶ TCID₅₀ wirusa podskórnie lub drogą doustno-donosową nie chorowały pomimo replikacji wirusa w narządach wewnętrznych oraz wysiewu z wydzieliną z jamy nosowo-gardłowej. W zakażeniach naturalnych chorowały zwierzęta w różnym wieku. Obraz chorobowy był różny. Występowała gorączka, kaszel, zmiany skórne.

Zakażone bezobjawowo oraz chore zwierzęta mogą stanowić istotne źródło zakażenia (19). Jednak w zakażeniach naturalnych świń zarówno na Filipinach, jak i w Chinach izolowano RESTV z przypadków zespołu rozrodczo-oddechowego. Można przypuszczać, że zakażenie przez RESTV jest czynnikiem usposabiającym oraz czynnikiem zaostrzającym przebieg zespołu rozrodczo-oddechowego (PRRS; 6, 20). Około 80% świń na farmach, na których występował PRRS, było seropozytywnych w stosunku do RESTV, natomiast świnię z farm wolnych od PRRS były seronegatywne w stosunku do RESTV. Antygen RESTV stwierdzano w tkance limfatycznej i węzłach chłonnych przy nieznacznych zmianach nekrotycznych oraz w komórkach zapalnych i złogach martwych komórek w przestrzeniach międzypęcherzykowych płuc. W teście ELISA

IgG i teście immunofluorescencji 70% surowic świń była seropozytywna w kierunku RESTV (21).

Chorobotwórczość RESTV dla człowieka

Istnieją przekonujące dowody na zakażność RESTV dla człowieka. Najważniejsze pochodzą z lat 1989–1990 z USA i dotyczą serokonwersji u człowieka, który zakaził się przez ranę podczas sekcji padłej małpy. Wiremia występowała od 9 do 11 dnia po zakażeniu, a serokonwersja pojawiła się 14 dnia (22). Kolejne dane pochodzą z 2009 r. z Filipin od personelu dwóch farm świń zakażonych przez RESTV i personelu rzeźni, w których ubijano zakażone świnię (23). U 6 z 147 osób występowały przeciwciała dla RESTV w klasie IgM lub IgG. Dwa procent handlarzy małpami z Włoch, Filipin i USA były seropozytywne w stosunku do RESTV, przeciwciała występowały w klasie IgG.

Uwzględniając dużą plastyczność filowirusów, przekroczenie przez RESTV bariery międzygatunkowej małpa → człowiek, świnia → człowiek oraz istnienie możliwości wielokrotnych pasażów wirusa przez wrażliwe zwierzęta lub ludzi, można ocenić w przyszłości realizację kilku groźnych scenariuszy. Nawet niewielkie zmiany w genomie RESTV, których następstwem jest zmiana składu jednego białka wirusa, VP24, mogą pociągać za sobą zmianę zjadliwości wirusa dla człowieka. Eksperti WHO uznali w 2009 r. RESTV za potencjalnie patogenny dla człowieka. Podobnie jak cztery znane gatunki wirusa Ebola, RESTV może powodować gorączkę krwotoczną (22). Pasaże oraz możliwość ścisłej adaptacji i selekcji wirusa w kierunku zwiększonej zjadliwości dla świń może przyczynić się do masowych zachorowań i upadków świń. Chociaż nie stwierdzono transmisji wirusa z nietoperzy na człowieka, tej możliwości nie można jednak obecnie wykluczyć, a tym samym nietoperz może stać się jednym z ważnych źródeł zakażenia człowieka (24). W innym scenariuszu RESTV może przekroczyć barierę małpa – zwierzęta domowe, czego skutkiem mogą być zarówno zakażenia bezobjawowe, jak i jawna choroba. Zakażenie ludzi oraz wrażliwych zwierząt w stanie immunosupresji może wpływać na zmianę wielu cech RESTV, takich jak tropizm, zjadliwość i rozsiewalność.

Rozpoznanie zakażeń wirusem RESTV

Najlepsze wyniki w diagnostyce RESTV uzyskuje się w teście cELISA, immunobloting oraz w RT-PCR. Do izolacji wirusa zaleca się najczęściej linię komórkową Vero, ale izolaty od świń dają zmiany cytopatyczne dopiero po 2–3 pasażu. W badaniu

w mikroskopie elektronowym charakteryzacyjne wiriony wirusów Ebola występują w dużych ilościach w wątrobie, śledzionie, płucach, węzłach chłonnych i skórze. Wirus traci zakaźność w martwej tkance po 2–4 dniach.

Uwzględniając fakt, że nadal istnieją wiele niejasności odnośnie do gatunków zwierząt nosicieli wirusów gorączek krwotocznych oraz sposobów transmisji tych wirusów ze zwierząt na ludzi, co odnosi się też do gatunków wirusa Ebola, służby medyczne i weterynaryjne opracowały różne rygory i metody chroniące przed biohazardem. RESTV zalicza się do 4 grupy zagrożenia biologicznego, a więc do czynników powodujących śmiertelne choroby człowieka, dla których nie zdołano opracować szczepionki. Nadal zwraca się uwagę na możliwość zakażenia tym wirusem większej ilości gatunków zwierząt oraz na możliwość szerzenia się zakażenia w populacji zwierząt i transmisji wirusa ze zwierząt na człowieka, a także na szerzenie się zakażenia w populacji ludzkiej, gdzie ważną rolę odegra transmisja człowiek → człowiek.

Piśmiennictwo

- Center for Food Security and Public Health: Ebola and Marburg virus infections http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/viral_hemorrhagic_fever_filovirus.pdf.
- Bausch D.G., Towner J.S., Dowell S.E., Kaducu F., Lukwiya M., Sanches A., Nichol S.T., Książek T.G., Rollin P.E.: Assessment of the risk of Ebola virus transmission from body fluids nad fomites. *J. Infect. Dis.* 2007, **196**, 142–147.
- Morikawa S., Saijo M., Kurane I.: Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2007, **30**, 391–398.
- Miranda M.E., Miranda N.L.: Reston ebolavirus in humans and Animals in Philippines: a review. *J. Infect. Dis.* 2011, suppl. **3**, 757–760.
- Hayes C.G., Burans J.P., Książek T.G., Del Rosario R.A., Miranda M.E., Manaloto C.R., Barrientos A.B., Robles C.G., Dayrit M.M., Peters C.J.: Outbreak of fatal illness among captive macaques in the Philippines caused by an Ebola-related filovirus. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1992, **46**, 664–671.
- Pan Y., Zhang W., Cui L., Hua X., Wang M., Zeng Q.: Reston virus in domestic pigs in China. *Arch. Virol.* 2014, **159**, 1129–1132.
- Yuan J., Zhang Y., Li J., Zhang Y., Wang L.F., Shi Z.: Serological evidence of ebolavirus infection in bats. *China Virol. J.* 2012, **9**, 236–243.
- Lee J.E., Saphire E.O.: Ebola virus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future Virol.* 2009, **4**, 621–635.
- WHO: Ebola virus disease. *Fact Sheet* 2016, 206, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/>
- Stroher U., West E., Bugany H., Klenk H.D., Schnittler H.J., Feldman H.: Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses. *J. Virol.* 2001, **75**, 11025–11033.
- Bray M.: Defense against filoviruses used as biological weapons. *Antiviral Res.* 2003, **57**, 53–60.
- De Wit E., Munster V.J., Metwally S.A., Feldmann H.: Assessment of rodents as animal models for Reston ebolavirus. *J. Infect. Dis.* 2011, **204**, suppl 3, 968–972.
- Geisbert T.W., Jahrling P.B., Hanes M.A., Zack P.M.: Association of Ebola-related Reston virus particles and antigen with tissue lesions of monkeys imported to the United States. *J. Comp. Pathol.* 1992, **106**, 137–152.
- Olival KJ, Hayman DT. Filoviruses in bats: current knowledge and future directions. *Viruses* 2014, **6**, 1759–1788.
- Jayme S.I., Field H.E., de Jong C., Olival K.J., Marsh G., Tagtag A.M., Hughes T., Bucad A.C., Barr J., Azul R.R., Rates L.M., Foord A., Yu M., Cruz M.S., Santos I.J., Lim T.M.S., Benigno C.C., Epstein J.H., Wang L.F., Daszak P., Newman S.H.: Molecular evidence of Ebola Reston virus infection in Philippine bats. *Virology J.* 2015, **12**, 107–113.
- Pourrut X., Souris M., Towner J.S., Rollin P.E., Nichol S.T., Gonzalez J.P., Leroy E.: Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus*. *BMC Infect Dis.* 2009, **9**, 159–163.
- Taniguchi S., Watanabe S., Masangkay J.S., Omatsu T., Ikegami T., Aviola P., Ueda N., Iha K., Fujii H., Ishii Y., Mizutani T., Fukushi S., Saiji M., Kurane I., Kyuwa S., Akashi H., Yoshikawa Y., Morikawa S.: Reston Ebolavirus Antibodies in Bats, the Philippines. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, **17**, 1559–1560.
- Berrette R.W., Metwally S.A., Rowland J.M., Xu L., Zaki S.R., Nichol S.T., Rollin P.E., Towner J.S., Shieh W.J., Batten B., Sealy T.K., Carillo C., Moran K.E., Brach A.A., Mayer G.A., Catbagan D.P., Lautner E.A., Książek T.G., White W.R., McIntosh M.T.: Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus. *Science* 2009, **325**, 204–206.
- Marsh G.A., Haining J., Robinson R., Foord A., Yamada M., Barr J.A., Payne J., White J., Yu M., Bingham J., Rollin P.E., Nichol S.T., Wang Lin-Fa., Middleton D.: Ebola Reston virus infection of pigs: clinical significance and transmission potential. *J. Infect. Dis.* 2011, **204**, suppl 3, 804–809.
- Morikawa S. A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Vet Res.* 2012, **8**, 82–87.
- Sayama Y., Demetria C., Saito M., Azul R.R., Taniguchi S., Fukushi S., Yoshikawa T., Iizuka I., Mizutani T., Kurane I., Malbas Jr. F.E., Lupisan S., Catbagan D.P., Animas S.B., Morales R.G., Lopez E.L., Dazo K.R., Cruz M.S., Olveda R., Saijo M., Oshitani H., Morikawa H.: A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Vet. Res.* 2012, **8**, 82–89.
- WHO: WHO experts consultation on Ebola Reston pathogenicity in humans. *Epidemic Pandemic Alert Resp.* 2009, **2**, 1–22.
- WHO: Ebola Reston in pigs and humans, Philippines. *Wkly Epidemiol Rec.* 2009, **84**, 49–50.
- Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hasnan A., Yaba P., Déléat A., Paweska J.T., Gonzalez J.P., Swanepoel R.: Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 2005, **438**, 575–576.
- Lee J.E., Saphire E.O.: Ebola virus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future Virol.* 2009, **4**, 621–635.
- FAO: FAO/OIE/WHO investigate Ebola Reston virus in pigs. <http://www.pigprogress.net/Home/General/2009/1/FAO/OIE/WHO-investigate-Ebola-Reston-virus-in-pigs-PP002476W/> 2009.