

EVOLUCIJA I EKOLOGIJA VIRUSA BJESNOĆE

Vuković, Katja

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:475366>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Katja Vuković

EVOLUCIJA I EKOLOGIJA VIRUSA BJESNOĆE

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, 2023.

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Katja Vuković

EVOLUTION AND ECOLOGY OF RABIES VIRUS

BACHELOR THESIS

Zagreb, 2023

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Preddiplomski sveučilišni studij biologija na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dijane Škorić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Završni rad

Evolucija i ekologija virusa bjesnoće

Katja Vuković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virusi roda *Lyssavirus*, od kojih je najistaknutiji virus bjesnoće (eng. rabies virus, RABV), uzročnici su smrtonosne bolesti bjesnoće koju prenose isključivo sisavci. Bjesnoća zahvaća centralni živčani sustav te je varijabilnog vremena inkubacije. Rezervoarne domaćine predstavljaju šišmiši i karnivori među kojima se virus prenosi enzootski, no može doći i do epizootskog prijenosa virusa, tj. prelijevanja (eng. *spillover*) infekcije. U njoj, virus prelazi na novu vrstu koja postaje novi virusni domaćin. Prelazak na novu vrstu često je posljedica predadaptacije virusa te predstavlja veliku opasnost za ljude i potencijalno ugrožene životinje. Upravo zbog te osobine virusa, teško je odrediti njegovo podrijetlo te se mogu postaviti samo hipoteze. Osim biološke, rasprostranjivanje virusa usporavaju i geografske barijere, pogotovo kad je riječ o terestričkim sisavcima kao domaćinima. S druge strane, na rasprostranjivanje virusa među šišmišima najviše utječu sezonske promjene, te se zimi bilježi stagnacija rasprostranjivanja virusa zbog hibernacije. Teži se poboljšanju dijagnostike lyssavirusa kako bi se jasnije moglo odrediti o kojem se pripadniku virusnog roda radi, dobiti pouzdanije podatke o njihovoj rasprostranjenosti te u konačnici razviti najučinkovitije strategije suzbijanja ove bolesti.

Ključne riječi: RABV, rezervoarni domaćini, *spillover* infekcija, predadaptacija, geografske barijere, sezonske promjene

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: prof. dr. sc. Dijana Škorić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Evolution and ecology of rabies virus

Katja Vuković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Viruses of the genus *Lyssavirus*, the most prominent of which is rabies virus (RABV), are the causative agents of the deadly disease called rabies, which is transmittable exclusively to mammals. Rabies affects the central nervous system and has a variable incubation period. Reservoir hosts are bats and carnivores, among which the virus is transmitted enzootically, but there can also be epizootic transmission events, i.e. *spillover* infections, the transfer of the virus to a new species that becomes a new virus host. The transmission to a new host species is often the result of preadaptation of the virus and represents a great danger for humans and potentially endangered animals. Because of this feature of the virus, it is difficult to determine its origin, and only hypotheses can be put forward. In addition to biological barriers, virus transmission is also slowed down by geographical barriers, especially when it comes to terrestrial mammals as hosts. On the other hand, the spread of the virus among bats is most affected by seasonal changes, so that in the winter the virus spread stagnates due to bat hibernation. Efforts are being made to improve the diagnostics of lyssaviruses in order to determine their specific types, to obtain more reliable data on their distribution, and ultimately to develop the most effective strategies to control the disease.

Keywords: RABV, reservoir hosts, *spillover* infection, preadaptation, geographical barriers, seasonal changes

Thesis is deposited in the Central Biological Library.

Mentor: Prof. Dijana Škorić, Ph.D.

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. VIRUS BJESNOĆE | 2 |
| 2.1. Građa i ciklus virusa bjesnoće | 2 |
| 2.2. Ulazak virusa u organizam | 3 |
| 2.3. Tipovi bjesnoće i simptomi | 4 |
| 2.4. Sojevi virusa bjesnoće | 5 |
| 3. EVOLUCIJA VIRUSA BJESNOĆE | 7 |
| 3.1. Prilagodbe virusa bjesnoće | 7 |
| 3.2. Prijelaz virusa bjesnoće na domaćina druge vrste | 7 |
| 3.3. Mutacije virusa bjesnoće | 8 |
| 3.4. Podrijetlo RABV | 9 |
| 3.5. Izazovi u dijagnostici lyssavirusa | 10 |
| 4. EKOLOGIJA | 12 |
| 4.1 Prijenosnici virusa bjesnoće | 12 |
| 4.1.1. Karnivori | 12 |
| 4.1.2. Šišmiši | 13 |
| 4.2. Utjecaj sezonskih promjena na rasprostranjivanje lyssavirusa | 14 |
| 5. ZAKLJUČAK | 17 |
| 6. LITERATURA | 18 |
| 7. ŽIVOTOPIS | 20 |

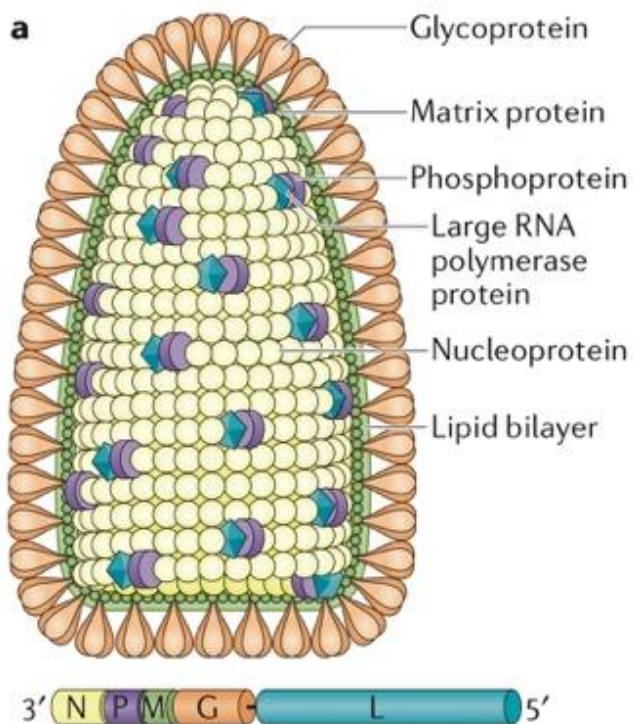
1. UVOD

Virus bjesnoće (eng. rabies virus) uzročnik je bolesti bjesnoće od koje, unatoč napretku medicine, umire 59 000 ljudi godišnje. Virusna vrsta *Rabies lyssavirus* (RABV) pripada rodu *Lyssavirus* i porodici *Rhabdoviridae* (Fisher i sur., 2019). To je najsmrtonosniji virus u ovoj porodici ukoliko se ne liječi prije pojave kliničkih simptoma jer je nakon pojave prvih simptoma smrt gotovo uvijek zajamčena. RABV se prenosi među sisavcima najčešće ugrizom zaražene životinje, a rjeđe je dovoljna i samo ogrebotina. Utječe na centralni živčani sustav gdje uzrokuje encefalitis (upalu mozga) te mnoge druge simptome. Simptomi se najčešće pojave 3-12 tjedana nakon unosa virusa u organizam, ovisno o mjestu ugriza životinje. To vrijeme nije strogo određeno te može varirati od samo par dana nakon infekcije do čak nekoliko mjeseci. Neki od simptoma su: temperatura, svrbež kod mjesta ugriza, halucinacije, anksioznost ili prevelika energičnost, problemi s gutanjem i disanjem te paraliza (CDC). Unatoč visokoj smrtnosti, ako se reagira na vrijeme, tretman protiv bjesnoće pokazuje izrazitu učinkovitost. Razvijeno je cjepivo kao opcija zaštite prije infekcije te post ekspanzijska profilaksa (PEP) kao tretman koji bi se trebao primiti na dan infekcije. Bez obzira na navedene metode zaštite, bjesnoća i u današnje doba izaziva probleme, najviše u zemljama u razvoju gdje psi nisu cijepljeni te su glavna karika u prenošenju ove bolesti. U razvijenijim državama psi ipak nisu tako česti prenositelji, već je izraženija silvatična bjesnoća. Kod nje su glavni prenositelji rakuni, lisice i tvorovi ili pak šišmiši (WHO).

2. VIRUS BJESNOĆE

2.1. Građa i ciklus virusa bjesnoće

RABV je relativno jednostavne građe. Svi pripadnici roda *Lyssavirus* imaju virione oblika metka dužine oko 200 nm i promjera oko 80 nm. Jednolančana RNA negativne orijentacije (-RNA) nije segmentirana i veličine je 12 kilobaza (kb). Genom kodira samo 5 proteina: nukleoprotein (N), fosfoprotein (P), protein ovojnice (M), glikoprotein (G) i RNA-polimerazu (L) (Fooks i sur., 2017). Proteini N, P i L omotavaju genomsku RNA i stvaraju RNP, tj. ribonukleotidnu česticu, odnosno srž viriona (Slika 1.). Protein M tvori matriks tj. sloj između RNP-a i lipidnog dvosloja koji nazivamo virusnom ovojnicom. U ovojnici je ugrađeno oko 400 trimernih šiljaka (peplomera, projekcija) koje čine trimeri glikoproteina G. Ovi šiljci su vrlo važni u početnom stadiju replikacije virusa, tj. pri ulasku u stanicu što je prvi korak virusnog ciklusa. Oni predstavljaju mjesto kontakta virusa s domaćinskom stanicom, tj. antireceptor. Vežu se na receptore na površini stanice te tako dolazi do adsorpcije na domaćinsku stanicu. Virusna čestica zatim u stanicu ulazi endocitozom. Formira se endosom te se membrana virusa spoji s membranom endosoma i sadržaj viriona se ispušta u citoplazmu. Ovaj proces možemo nazvati i skidanjem virusnog „omotača“ (engl. *uncoating*). Nakon toga dolazi do transkripcije negativne genomske RNA kako bi ciklus mogao nastaviti dalje, odnosno kako bi nastale virusne mRNA. Sljedeći korak je translacija svih pet virusnih proteina. Ovaj proces se odvija na slobodnim ribosomima koji se nalaze u citoplazmi. Jedino se sinteza proteina G odvija na grubom endoplazmatskom retikulumu, a kao i stanični proteini koji se glikoliziraju u Golgijevom tijelu. Preko pozitivnih RNA koje nastaju transkripcijom genoma virusa i kompetentne su mu, nastaje još veći broj negativnih RNA u sljedećem krugu transkripcije. Na te RNA se vezuju novosintetizirani proteini i tako stvaraju novi RNP-kompleksi. Sve zajedno okruže proteini M i na taj način se grade nove virusne čestice. Posljednji korak u virusnom ciklusu je izlazak novog virusa iz stanice pupanjem. Kompleks RNP-M odlazi do dijela stanične membrane koji sadrži glikoproteinske šiljke s kojima se povežu i izađu iz stanice.



Slika 1. Građa čestice virusa bjesnoće (RABV) i mapa njegovog genoma. Preuzeto iz Fooks i sur. (2017).

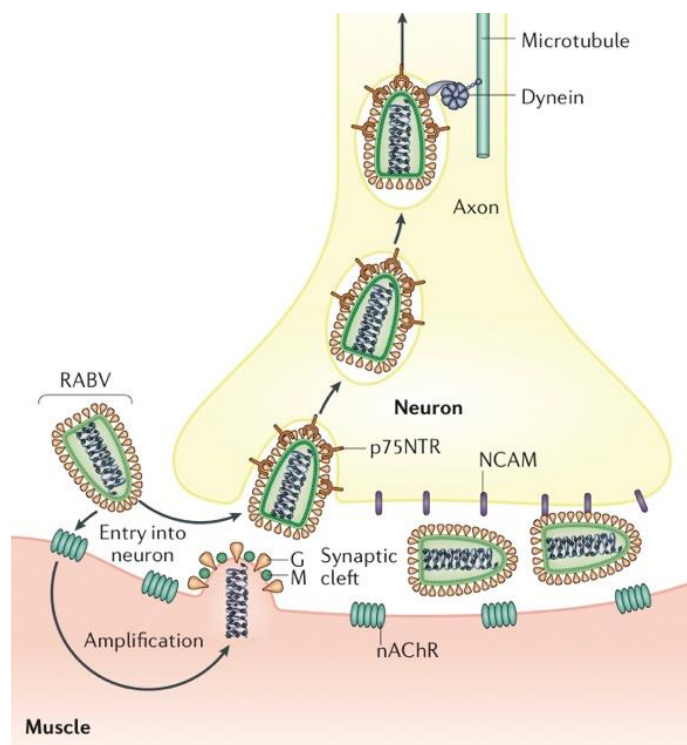
2.2. Ulazak virusa u organizam

Najčešće se RABV prenosi kroz narušenu kožnu barijeru, tj. ugrizom ili ogrebotinom zaražene životinje koja u svojoj slini sadrži virus. Neki od rjeđih puteva prijenosa su transplantacija organa te čak i putem aerosola, iako je vjerojatnost da virus dospije u organizam tim putem vrlo mala. Ako životinja pojede drugu zaraženu životinju, najvjerojatnije neće oboljeti od virusa jer ga enzimi u probavnom sustavu neutraliziraju.

Pri ulasku u organizam RABV prvo inficira stanice mišića na kojem se dogodila ozljeda pri ugrizu ili ogrebotini. U toj fazi se još ne pojavljuju simptomi bolesti i još se može liječiti postekspozicijskom profilaksom (PEP) te tako spasiti život zaražene osobe. Ako se ne reagira tako brzo, virus prelazi u periferne živce (prodromna faza) te putuje do središnjeg živčanog sustava (CNS). U toj fazi, smrt zaražene osobe gotovo je zajamčena. Virus također putuje i do žlijezda slinovnica te se tako prilikom ugrizamože prenijeti na sljedećeg domaćina (Fooks i sur., 2017).

Receptori za virus su: nikotinski acetilkolinski receptor (engl. *nicotinic acetylcholine* receptor, nAChR), neuronska adhezivna molekula (engl. *neuronal cell adhesion* molecule, NCAM) i

niskoafinitetni receptor za faktor rasta živaca (engl. *tumour necrosis factor receptor superfamily member 16*, p75NTR) (Fooks i sur., 2017). Oni sudjeluju i u prelasku virusa iz stanice mišića u stanicu perifernog živca (Slika 2.). Ulaskom u živčanu stanicu, virus se kreće retrogradnim aksonskim transportom pomoću dineina do tijela živčane stanice gdje će se replicirati te prenositi na druge živčane stanice trans-sinaptičkim putem.



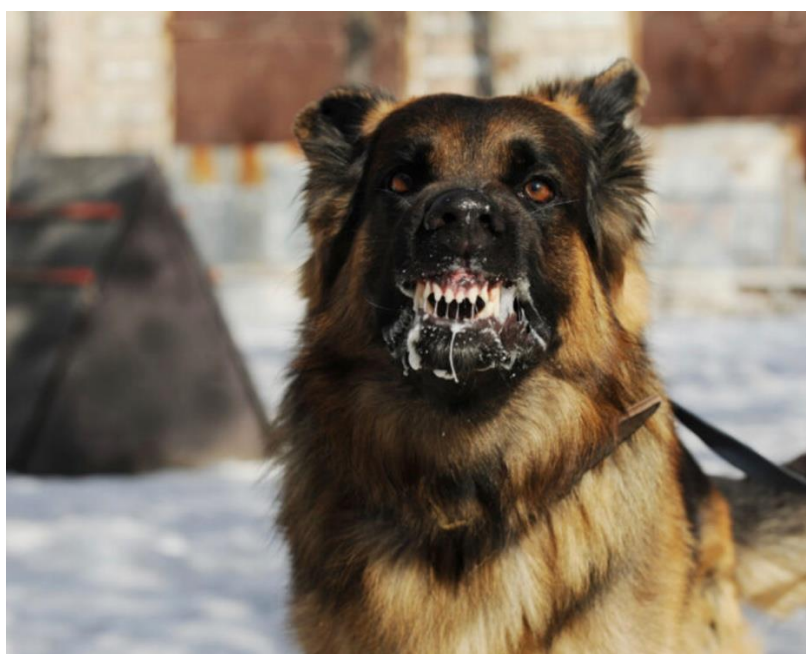
Slika 2. Prelazak RABV virusa sa stanice mišića u živčanu stanicu perifernog živčanog sustava preko receptora nAChR (acetilkolinski receptor), NCAM (neuronska adhezivna molekula) i niskoafinitetnog receptora za faktor rasta živaca (p75NTR) prerađeno iz Fooks i sur. (2017).

2.3. Tipovi bjesnoće i simptomi

Postoji takozvani furiozni i paralitički tip bjesnoće.

Furiozni je češći (pojavljuje se u 80% slučajeva zaraze bjesnoćom) te smrt zaražene jedinke nastupa prije. Paralitički tip bjesnoće uzrokuje 41% sporiju smrt, unatoč istom vremenu inkubacije (od dva tjedna do nekoliko mjeseci). Za ljude je karakteristično vrijeme inkubacije dva do tri mjeseca, dok u nekim ekstremnim slučajevima inkubacija može trajati čak do osam godina (Scott, Nel, 2021). No glavna je razlika u ponašanju zaraženih životinja, odnosno u simptomima. One koje imaju furiozni tip bolesti, agresivne su i hiperaktivne (Slika 3.), dok su one s paralitičkim

tipom bolesti letargične i ošamućene. Također, različiti sojevi RABV manifestiraju se kroz različite simptome, na primjer RABV sojevi koji zahvaćaju šišmiše na domaćinu se očituju simptomima kao što su drhtanje i nekontrolirano trzanje, dok sojevi koji zahvaćaju pse prouzročavaju karakteristične simptome hidrofobije. Ona se manifestira kao problemi s gutanjem (zbog čega nastaje pjena oko usta) te strah od vode, pa čak i aerofobije, tj. straha od zraka. Problem je u tome što su simptomi toliko slični nekim drugim bolestima (npr. cerebralnoj malariji) da u područjima u kojima su takve bolesti često prisutne, npr. u Africi, često dolazi do krive dijagnoze. U najkasnijem stadiju nakon encefalitisa dolazi do paralize, kome i smrti.



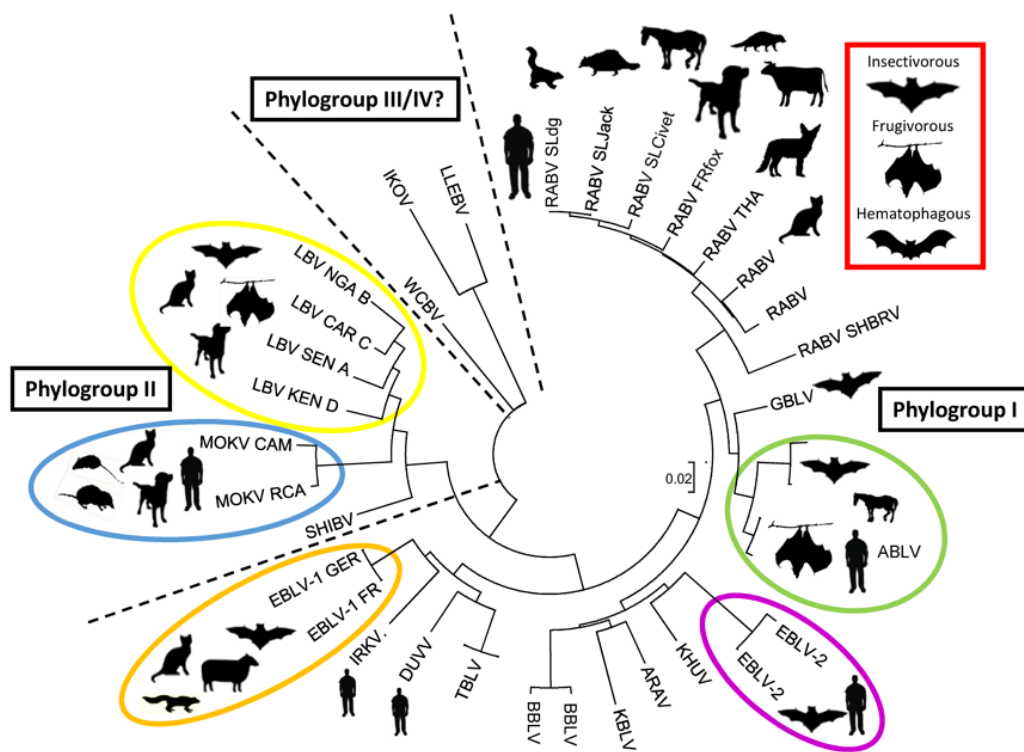
Slika 3. Pas zaražen furioznim tipom bjesnoće, preuzeto iz Schwarzman Animal Medical Center (https://www.google.hr/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.amcny.org%2Fpet_health_library%2Frabies-in-dogs%2F&psig=AOvVaw0NUts7n2qCG4xCVSjybrmD&ust=1684697142651000&source=images&cd=vfe&ved=0CA4QjRxqFwoTCNjzwofOhP8CFQAAAAAdAAAAABAE)

2.4. Sojevi virusa bjesnoće

RABV pripada rodu *Lyssavirus* koji ima 16 pripadnika (Banyard i Fooks, 2021). Sve vrste se mogu naći u šišmišima osim Mokola *lyssavirusa* (MOKV) i Ikoma *lyssavirusa* (IKOV). MOKV se većinom može naći kod glodavaca te je izoliran u više navrata dok je IKOV pronađen i izoliran

samo jednom iz afričke civetke (*Civetticus civetticus*). Još uvijek se otkrivaju novi pripadnici roda *Lyssavirus* te je nedavno pronađena nova vrsta Taiwan bat lyssavirus (TBLV) izoliran u dva navrata iz japanskog kućnog šišmiša (*Pipistrellus abramus*). Od svih pripadnika roda, najviše se zna o RABV jer je prisutan kod terestričkih karnivora i šišmiša Novog Svijeta. Ostali lyssavirusi su prisutni samo u Starom Svijetu te su puno manje istraženi, a za neke je pronađen samo jedan izolat. Čak ni najkorištenija fluorescencijska metoda za razlikovanje antigena (*fluorescent antibody test*, FAT) ne može razlikovati RABV od ostalih virusnih vrsta unutar roda, pa ni ostale lyssaviruse međusobno. Najčešće je potrebno provesti metodu RT-PCR i sekvenciranje kako bi se moglo utvrditi o kojem se točno pripadniku roda radi (Shiplej i sur., 2019).

Lyssavirusi su u Europi prvi put zabilježeni u Njemačkoj 1954. godine. Godinu nakon su izolirani iz šišmiša ranog večernjaka (*Nictalus noctula*) u bivšoj Jugoslaviji (Shiplej i sur., 2019).



Slika 4. Filogenetski odnosi svih pripadnika roda *Lyssavirus* sa prikazanim najčešćim prenositeljima, od kojih šišmiše dijelimo na: insektivorne (hrane se insektima), plodoždere (hrane se plodovima biljaka) i hematofagne (hrane se krvlju) (Shiplej i sur., 2019)

3. EVOLUCIJA VIRUSA BJESNOĆE

Iako je davno razvijeno cjepivo protiv bjesnoće, ta bolest još uvijek predstavlja problem u nekim zemljama. Dodatni problem predstavlja što je virus evoluirao tijekom vremena i rasprostranjivao u nova geografska područja. U Sjevernoj Americi se bjesnoća značajno suzbila, dok je u zapadnoj Europi, u kojoj je nekoć bila česta bjesnoća lisica, sada bolest potpuno iskorijenjena. S druge strane, u Južnoj Americi, evoluirali su čak novi sojevi virusa koji zahvaća šišmiše-vampire. Tako se povećava krug domaćina i vektora virusa te se proširuje zahvaćenost bjesnoćom, kako kod divljih, tako i kod domaćih životinja (najčešće pasa) što stvara velik rizik za ljude u tim područjima. Među šišmišima i karnivorima koji predstavljaju rezervoarne domaćine virusa bjesnoće, virus se rasprostranjuje enzootski što znači da je uvijek prisutan u nekoj mjeri među tom populacijom životinja (Slika 5.). Psi su glavni vektori RABV u Indiji, Africi i Aziji te zbog tog dolazi do velike smrtnosti od čak 59 000 ljudi godišnje (Fisher i sur., 2018).

3.1. Prilagodbe virusa bjesnoće

Virusne prilagodbe su raznolike i mnoge olakšavaju opstanak virusa. Virus bjesnoće izaziva povećanu agresiju kod životinje što dovodi do češćeg napada na drugu životinju i prijenosa virusa te se tako brže i lakše prenosi sa zaražene životinje na nove domaćine. Druga prilagodba je promjenjivo vrijeme inkubacije. Većinom je vrijeme inkubacije 1-3 mjeseca, ali se u prirodi to vrijeme može produljiti čak do 7 mjeseci. To znači da zaražena životinja ima više vremena zaraziti veći broj drugih životinja. Također, kod šišmiša koji hiberniraju, dolazi do sporije replikacije virusa te duže inkubacije. RABV ostaje tako u šišmišima sve do proljeća što znači da šišmiši nakon hibernacije ostanu živi i proširuju bolest dalje.

3.2. Prijelaz virusa bjesnoće na domaćina druge vrste

Tijekom dugog perioda vremena, RABV se može adaptirati na drugu vrstu kao svog novog domaćina. To su prelijevanja ili tzv. *spillover* infekcije, odnosno preskakanje barijere vrste. One predstavljaju velik javno-zdravstveni problem jer to znači da virus može zaraziti veći krug različitih domaćina i stvarati nove rezervoare. To je opasno za ljude, ali i za životinje koje bi virus mogao potencijalno uništiti. Takve infekcije su se dogodile kod pandžaša, kinkažua, kudu-antilopa, nosatih rakuna, mungosa i tvorova-jazavaca (Fisher i sur., 2018). Bjesnoća se pojavljuje kod svih sisavaca, no ipak treba doći do određenih mutacija virusa kako bi zaraza druge vrste bila moguća.

Tako se mogu objasniti i različiti simptomi pri zarazi različitih domaćina. Primjerice, ako se virus psećeg podrijetla ubrizga u rakuna, primijećeno je da rakuni pokazuju slabe kliničke simptome, većinom letargičnost koja završava smrću.

Ne zna se što točno dovodi do mutacija potrebnih da virus prijeđe s jedne na drugu vrstu ni kako bi se to moglo spriječiti. No u nekim slučajevima, prije prijelaza na novu vrstu, često je dolazilo do predadaptacije virusa. To bi moglo značiti da bi predadaptacija mogla predstavljati preduvjet za prijelaz virusa na nove vrste. Često se događaju i infekcije krajnjih domaćina (engl. *dead-end hosts*). Primjerice, RABV prijeđe sa životinje koja je izvorni i rezervoarni domaćin virusa u prirodi na čovjeka iz kojeg se virus ne može dalje prenositi na istovrsne ili druge životinjske domaćine. Čovjek stoga nije prenositelj virusa bjesnoće, osim u nekim vrlo rijetkim slučajevima, npr. transplantacijom organa zaražene osobe. Načine na koje virus cirkulira u pojedinim geografskim područjima je također teško ustanoviti zbog već spomenutih problema pri dijagnozi bolesti i detekciji virusa u slabije razvijenim državama.

3.3. Mutacije virusa bjesnoće

Skok RABV na novu domaćinsku vrstu se većinom događao među bliskim vrstama, što znači da sličnost organizama igra određenu ulogu u prelasku virusa na novog domaćina. Vjerojatno je zbog manjih fizioloških i imunskih prepreka proboj barijere vrste kod srodnih domaćina olakšan. Kod prijelaza na novu domaćinsku vrstu važnu ulogu igra purifikacijska selekcija RABV varijanti (negativna selekcija) dok je pozitivna selekcija zabilježena većinom samo na nekim aminokiselinama u ektodomeni glikoproteina. Međutim, pozitivna selekcija nedavno je zabilježena čak i na regijama nukleoproteina i RNA-polimeraze (Fisher i sur., 2019). Također, ustanovilo se da može doći do evolucije virusa u nekoliko neovisnih slučajeva ukoliko se virus introdukira u novu domaćinsku vrstu u više navrata. Takav primjer predstavlja prijelaz virusa u više navrata s domaćeg psa na tvora-jazavca u Aziji. Pri tome je došlo do paralelne supstitucije gena za nukleoprotein (N) i za RNA-polimerazu (L). Kod prijelaza s jedne na drugu vrstu američkih šišmiša došlo je i do 30 „skokova“ s jedne na drugu vrstu američkih šišmiša. Osim sličnosti između izvornog, tj. donorskog i novog, odnosno recipijentnog domaćina, genotipske značajke virusa isto igraju veliku ulogu u određivanju vjerojatnosti prelaska s vrste na vrstu. Pokazalo se kako karnivore lakše zahvaćaju oni sojevi RABV koji potječu izvorno iz šišmiša, a koji u glikoproteinu imaju aminokiselinu treonin na 242. poziciji (Fisher i sur., 2018).

3.4. Podrijetlo RABV

Podrijetlo RABV se i dalje ne može zasigurno odrediti, već je riječ pretežno o hipotezama. Najprihvaćenija je da je RABV najvjerojatnije podrijetlom od šišmiša Staroga Svijeta koji su mu bili prvi domaćini. Iz njih je evoluirao u niz varijanti od kojih su se neke mogle prenijeti na ostale sisavce i dalje rasprostraniti među tim novim domaćinima. Zanimljivo je da šišmiši Staroga Svijeta ne prenose RABV već ostale lyssaviruse, dok šišmiši Novoga Svijeta i ostali karnivori (i Novog i Staroga Svijeta) prenose isključivo RABV (Fisher i sur., 2018). Ta činjenica predstavlja problem u navedenoj hipotezi o podrijetlu RABV. Postavlja se pitanje kako su karnivori Staroga Svijeta dobili RABV ako kod šišmiša Staroga Svijeta nije prisutan. Postoji teorija da je RABV postojao otkad i šišmiši te da je bio u njima prisutan, odnosno da je dugo koevoluirao sa tim tipovima domaćina. Nakon toga se migrirajući po svijetu prenio na šišmiše Novoga Svijeta i karnivore nakon čega je izumro u šišmišima Staroga Svijeta.

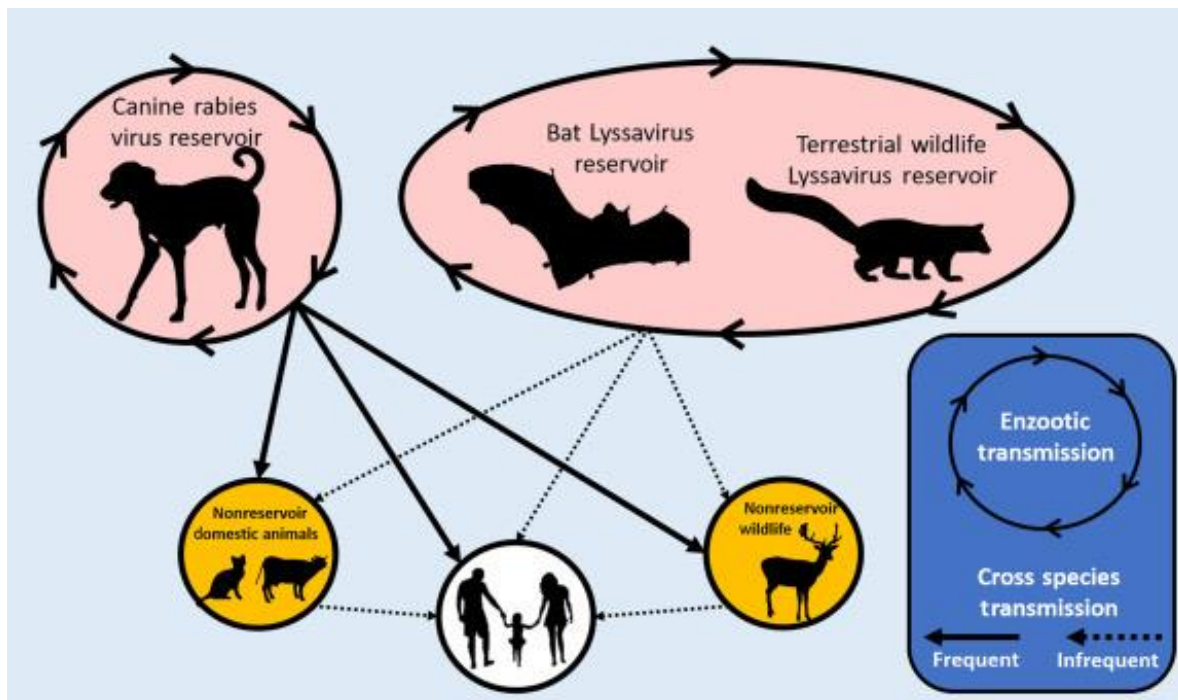
Druga hipoteza o porijeklu RABV je da je mutirao iz drugih lyssavirusa prelaskom sa šišmiša Staroga Svijeta na karnivore koji su ga onda prenijeli na šišmiše Novoga svijeta. To bi značilo da bi karnivori u jednom trenutku morali prenijeti virus na šišmiše, što je vrlo malo vjerojatno s obzirom da bi ugriz veće životinje najvjerojatnije zadao smrtnu ranu šišmišu.

Unatoč tome, teorija o monofiletskom podrijetlu RABV predlaže da bi bilo dovoljno da se taj događaj dogodio samo jednom. Uz to, jedan takav RABV genotip karnivornog podrijetla je izoliran iz šišmiša nađenog u Šri Lanki te predstavlja prvi dokaz da se prijenos virusa s karnivora na šišmiša zaista može dogoditi. Još jedan od dokaza je to da još uvijek dolazi do proširivanja kruga domaćina kod šišmiša Novoga Svijeta u Americi. To inače nije osobina drevnog virusa te podržava teoriju o naknadnoj evoluciji RABV. U antičkim zapisima se također spominju samo psi zaraženi bjesnoćom, dok nema zapisa o zaraženim šišmišima. Prvi zapisi o zaraženim šišmišima datiraju tek iz 16. stoljeća iz vremena kolonizacije Europe, dok su prvi zapisi u Sjevernoj Americi stari tek 100-njak godina. Na temelju rezultata provedenih istraživanja procjenjuje se da je starost najmlađeg zajedničkog pretka šišmiša Novoga Svijeta zaraženih RABV virusom oko 500 godina, tj. to se zbivalo u vrijeme europske kolonizacije Amerike. Unatoč tehnologiji sekvenciranja, analizama sekvenci i primjeni metode molekularnog sata, svejedno je vrlo teško odrediti kad se dogodio prijelaz s jedne na drugu vrstu domaćina, najviše zbog već spomenute prisutne purifikacijske selekcije te nedostatka sekvenci izumrlih evolucijskih linija virusa. U današnje doba

RABV se i dalje rasprostranjuje što je zabilježeno u Južnoj Americi, gdje je u zadnjih 10-ak godina pronađen velik broj novih varijanti RABV (Fisher i sur., 2018).

3.5. Izazovi u dijagnostici lyssavirusa

Izazov u dijagnostici lyssavirusa predstavlja ostali lyssavirusi zbog srodnosti s RABV. Većinom je u primjeni fluorescencijska metoda FAT u kojoj se koriste antitijela za nukleoprotein (N) čiji geni nisu toliko promjenjivi u genomu roda *Lyssavirus* te su kod nekih pripadnika identični, tj. homologni (Bourhy i sur., 1999). S druge strane, cjepivo protiv bjesnoće je dizajnirano za RABV jer funkcionira na temelju inaktiviranih virusnih čestica RABV. Učinkovito je samo za filogrupu I lyssavirusa jer su filogenetski i antigenski najbližiji RABV po genima koji kodiraju nukleoprotein (N) (Shiplely i sur., 2021). Pronašli su ih u Španjolskoj i Šri Lanki te se procjenjuje da još nisu otkrivene sve srodne vrste virusa ove filogrupe. To će biti moguće tek kada budu dostupne bolje dijagnostičke metode pomoću kojih će se moći razlikovati bjesnoća uzrokovana virusom bjesnoće i bjesnoća uzrokovana ostalim lyssavirusima. Zasad ih je vrlo teško razlikovati jer su simptomi gotovo identični te se u najviše slučajeva postavi pogrešna dijagnoza, često u siromašnijim zemljama koje nemaju resurse za detaljnu dijagnozu. Tako se otkrilo da je u Etiopiji 1% životinja zaraženih bjesnoćom, zapravo zaraženo bjesnoćom uzrokovanom srodnim Mokola virusom (MOKV) (Fisher i sur., 2018).



Slika 5. Enzootski prijenos virusa bjesnoće među rezervoarnim domaćinima iste vrste uz mogućnost epizootskog prijenosa, tj. prelaza virusa na novu vrstu (preuzeto iz Wallace i Blanton, 2020.).

4. EKOLOGIJA

Procjenjuje se da se svake godine područje sa životinjama zaraženima bjesnoćom koja je prouzročena RABV-om proširi za 10-40 km (Fisher i sur., 2018). Jedino što može spriječiti širenje bolesti su geografske barijere (npr. planine, rijeke, itd.), no samo kod terestričkih životinja kojima to predstavlja prepreku. Tako je na istoku Sjeverne Amerike, na primjer, širenje bjesnoće kod lisica donekle zaustavljeno zbog rijeka i planina na tim područjima te se bolest nije mogla širiti na zapad jer ni same lisice nisu mogle prijeći te geografske barijere (Fisher i sur., 2018).

4.1 Prijenosnici virusa bjesnoće

4.1.1. Karnivori

Glavni prijenosnici bjesnoće na ljude su oduvijek bili psi. Antički filozof Aristotel spomenuo je bjesnoću u svojem radu *Podrijetlo životinja* te iznio kako nakon ugriza bijesnog psa životinja postanu bijesne (Theodorides, 1986).

Osim pasa, i ostali karnivori mogu prenositi bjesnoću. Jedan od predstavnika karnivornih prijenosnika bjesnoće je i sivi vuk (*Canis lupus*). Glavne promjene u ponašanju sivih vukova su te da se prestaju bojati ljudi te je tako vjerojatnost napada i prijenosa virusa na čovjeka veća. Virus se kod vukova još uvijek javlja u obliku proboja barijere vrste u Aziji i na Bliskom Istoku. Za razliku od vukova, bijesne lisice rjeđe napadaju ljude te je napad na ljude u današnje vrijeme rijetko zabilježen. Lisice su bile puno češći prijenosnik u 20. stoljeću kad je u Europi bila prisutna epizootija bjesnoće na lisicama (*Vulpes vulpes*). Kako bi spriječili širenje bjesnoće lisica, znanstvenici su 70-ih godina smislili rješenje. Željeli su vakcinirati lisice na teško dokučivim područjima. Najučinkovitija metoda je bila razviti cjepivo koje se može unijeti oralno te ga sakriti u glavama kokoši koje su raznosili helikopterima i bacali u šume. Ova metoda se masovno koristila od 1979. do 1984. godine u Americi, a kasnije i u Europi (Yong, 2015). Na Aljasci, Grenlandu te u Kanadi i Rusiji je bila proširena bjesnoća među arktičkim lisicama (*Vulpes lagopus*). Tamo se bjesnoća također nazivala i „polarno ludilo“. Kod američkog smrdljivca (*Memphitis memphitis*) se bjesnoća najčešće pojavljuje zarazom od lisice. Isto tako, bjesnoća američkog rakuna (*Procyon lotor*) potječe od psa. U Americi je domaći pas (*Canis familiaris*), zajedno sa zlatnim čagljem (*Canis aureus*), jedan od prvih vektora i rezervoara bolesti, iako još nije određeno kod koga se pojavila prva. Kod mungosa su se pojavila dva tipa virusa bjesnoće. Jedan od ta dva tipa virusa je uzrokovao epidemiju u južnoj Africi gdje su 70% slučajeva silvatične bjesnoće uzrokovani

virusom na žutom mungosu (*Cynictis penicillata*), dok je drugi na Karibima. Tamo zahvaća vrstu mali indijski mungos (*Herpestes auropunctatus*) koji se uveo na Karibe kako bi smanjio populaciju štakora na plantažama šećerne repe. Bjesnoćom mogu biti zahvaćeni i kojoti (*Canis latrans*) kod kojih je bjesnoća bila zabilježena 40-ih godina prošlog stoljeća u Kanadi no epidemija je ubrzo suzbijena. No, 1990-ih je zabilježena u Teksasu te se nastavila širiti sjeverno diljem Sjeverne Amerike. Širenje se i dalje kontrolira oralnom vakcinacijom. Osim navedenih vrsta, zabilježena je zaraza i kod ostalih pripadnika porodica Canidae, Felidae, Mustelidae i Viverridae (Blancou, 1995). Čak je i zabilježena zaraza biljojeda koji se najčešće zaraze ugrizom psa. U Ujedinjenom Kraljevstvu bio je zaražen jelen lopatar (*Dama dama*) u dva navrata, dok je u Namibiji zabilježena zaraza bjesnoćom vrste kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) te je uginulo 50 000 jedinki.

4.1.2. Šišmiši

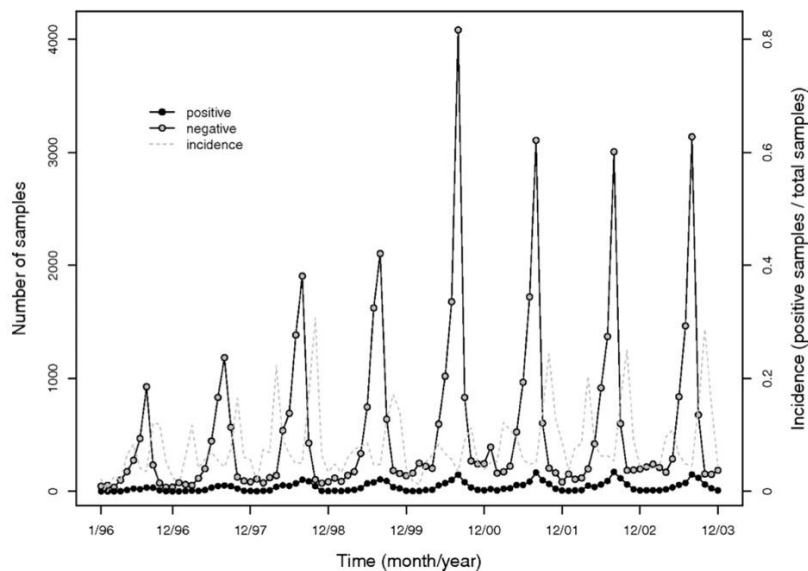
Bjesnoća kod šišmiša je najbolje proučavana bjesnoća kod divljih vrsta životinja. Prvi zabilježeni slučaj o „bijesnom“ šišmišu datira od 1511. godine. Kod šišmiša je specifično što se u špiljama virus može rasprostranjivati zrakom (putem aerosola) te tako zaraziti ostale šišmiše u istoj špilji jer oni tvore usko povezanu skupinu kao izrazito socijalne životinje. U Kanadi je prvi zabilježen slučaj bjesnoće šišmiša bio na vrsti veliki smeđi šišmiš (*Eptesicus fuscus*) 1957. godine, dok su u Južnoj Americi 1921. zabilježeni u Brazilu i 1931. u Trinidadu na plodoždernim šišmišima. U Americi su kasnije izolirani uzorci RABV iz šišmiša rodova *Lasiurus*, *Eptesicus*, *Myotis*, *Tadarida*, itd. koji su nastanjivali 30 država (Krebs i sur., 1996). U Europi je otkriven virus bjesnoće u šišmišima vrsta kasni noćnjak (*Eptesicus serotinus*) kod kojeg je zaraza ovim virusom najčešća, iako ponekad dođe do zaraze i drugih šišmiša iz rodova *Myotis* i *Pipistrellus*. I danas je virus prisutan u Europi, ali mu se rasprostranjenost značajno smanjila. U Africi je 1956. izoliran virus za koji se kasnije utvrdilo da se radi o LBV virusu (Lagos bat virus) koji je klasificiran kao serotip 2, genotip 2. Godine 1970., izoliran je novi soj virusa u južnoj Africi koji je klasificiran kao serotip 4, genotip 4, a radilo se o DUVV (Duvenhage lyssavirus). Iako se smatralo da u Oceaniji, Australiji, Novom Zelandu i Novoj Kaledoniji nema virusa bjesnoće, ipak je izoliran u Australiji 1996. godine iz dva šišmiša vrste crna leteća lisica (*Pteropus alecto*) (Slika 6.). Virus je klasificiran kao ABLV virus (*Australian bat lyssavirus*) (Fraser i sur., 1996).



Slika 6. Crna leteća lisica (*Pteropus alecto*) – prvi zabilježeni domaćin i prenositelj ABLV virusa (*Australian bat lyssavirus*) preuzeto iz <https://www.inaturalist.org/taxa/40913-Pteropus-alecto>.

4.2. Utjecaj sezonskih promjena na rasprostranjivanje lyssavirusa

Kako većina stvari u prirodi ovisi o promjeni temperature i godišnjih doba, tako i rasprostranjivanje lyssavirusa ovisi o godišnjem dobu, tj. sezonskim promjenama. Lako je uočljivo kako rasprostranjivanje virusa stagnira zimi. To je vrlo vjerojatno povezano sa hibernacijom šišmiša koji su česti vektori virusa bjesnoće, iako sezona ne utječe toliko na ostale sisavce koji prenose bjesnoću. Naime, pokazalo se da se BRV (bat rabies virus) u Sjevernoj Americi se najviše rasprostranjuje tijekom jeseni, ali i tijekom proljeća (Slika 7.). Nije objašnjeno kako funkcionira taj mehanizam kojim virus mijenja svoju aktivnost ovisno o sezonskim promjenama (George i sur., 2011).



Slika 7. Graf koji prikazuje količinu pozitivnih i negativnih uzoraka za BRV (bat rabies virus) testiranih na bjesnoću te učestalost pozitivnih uzoraka među šišmišima mjeren svaki mjesec od 1996. do 2003. godine (George i sur., 2011).

Ovo istraživanje je provedeno na velikom smeđem šišmišu (*Eptesicus fuscus*) koji predstavlja čestu vrstu šišmiša u Sjevernoj Americi (Slika 8.). Definirana su 3 perioda: period glavne transmisije, period hibernacije i period rane transmisije virusa (George i sur., 2011). Od kasnog proljeća do kasnog ljeta (krajem lipnja do sredine kolovoza) ženke osnivaju prave kolonije od par stotina jedinki na zgradama, što znači da imaju priliku često biti u blizini ljudi te im potencijalno prenijeti bjesnoću. To predstavlja period glavne transmisije jer te su temperature najpovoljnije za transmisiju virusa, rađanje mladih šišmiša te, zbog rastuće populacije u relativno malom prostoru, velik broj događaja prijenosa virusa među šišmišima. Nakon sredine kolovoza, šišmiši polako migriraju u područja više nadmorske visine gdje će hibernirati tijekom zime. Tada ulaze u period hibernacije koji može potrajati čak 6 mjeseci. U rano proljeće, šišmiši izlaze iz hibernacije što označava početak perioda rane transmisije kojeg obilježavaju ponovne migracije ženki i povratak u kolonije smještene blizu ljudi. Ovaj ciklus se ponavlja svake godine (George i sur., 2011).

Postoje 3 faktora koji utječu na razvijanje bolesti, a to su sezonski mortalitet, period inkubacije bjesnoće i fakultativna heterotermija te godišnji natalitet. Najviši mortalitet je zabilježen ljeti, a najmanji zimi. Period inkubacije najčešće traje dva do 25 tjedana, no može potrajati i više od godinu dana. Veliki smeđi šišmiši su fakultativni heterotermni organizmi, što znači da im se

temperatura u tijelu mijenja tijekom godine. Konstantna je preko proljeća i ljeta, no za vrijeme hibernacije se spusti što utječe na razvijanje infekcije virusa u šišmišu.



Slika 8. Veliki smeđi šišmiš (Eptesicus fuscus) na kojem je provedeno istraživanje, preuzeto iz https://www.inaturalist.org/guide_taxa/505598.

5. ZAKLJUČAK

Virus bjesnoće karakteriziraju brojne prilagodbe te zato vrlo lako dolazi do preskakanja barijere vrste, najčešće kao posljedica mutacija virusa čiji se uzroci još uvijek istražuju. Upravo zbog mogućnosti prelaska na drugu vrstu, nije moguće zasigurno odrediti podrijetlo RABV te se postavljaju samo hipoteze. Uz to, zbog velike međusobne srodnosti pripadnika roda *Lyssavirus*, teško ih je međusobno razlikovati te je potrebno koristiti metodu RT-PCR kako bi se odredilo o kojem se pripadniku roda *Lyssavirus* radi. Često se krivo dijagnosticiraju u zemljama kojima nedostaju resursi za pravilnu i temeljitu dijagnozu te se bjesnoća često poistovjećuje sa cerebralnom malarijom zbog vrlo sličnih simptoma. Virus bjesnoće lako evoluirao pa su zabilježeni čak i novi sojevi lyssavirusa u Južnoj Americi. Zbog te opasne osobine virusa, vrlo je važno doći do učinkovitog rješenja kako bi se suzbilo daljnje širenje bjesnoće. Već je razvijeno cjepivo te se obavezno cijepljenje kućnih ljubimaca provodi u većini razvijenih zemalja, no to i dalje nije slučaj u slabije razvijenim zemljama gdje su glavni vektori RABV upravo psi. Nadalje, razvijeno cjepivo nije jednako učinkovito u zaštiti od svih pripadnika roda *Lyssavirus*, već samo djeluje na pripadnike filogrupe I. Zbog toga se teži intenzivnijem istraživanju i dijagnosticiranju te razvijanju učinkovitih cjepiva za ostale pripadnike tog roda.

Trenutačno se bjesnoća drži kod kontrolom geografskim barijerama te je preporučljivo biti cijepljen protiv bjesnoće, naročito ukoliko se odlazi na područja u kojima obitavaju rezervoarni domaćini.

6. LITERATURA

1. Fisher C.R., Streicker D.G., & Schnell M.J. (2018). The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers. *Nature Reviews Microbiology*, 16(4): 241-255
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.786953/full>
2. Scott T.P., & Nel L.H. (2021). Lyssavirus and the Fatal Encephalitic Disease Rabies
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.786953/full>
3. Centers for Disease Control and Prevention (2020).
<https://www.cdc.gov/rabies/about.html> (pristupljeno 1. 8. 2023.)
4. Fooks A.R., Cliquet F., Finke S., Freuling C., Hemachudha T., Mani R.S., Muller T., Nadin-Davis S., Picard-Meyer E., Wilde H., & Banyard A.C. (2017). Rabies. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17091 <https://www.nature.com/articles/nrdp201791#citeas>
5. Gobierno de México (2018). <https://www.gob.mx/salud/en/articulos/rabies-an-ancient-disease> (pristupljeno 1. 8. 2023.)
6. Bourhy H., Kissi B., Audry L., Smreczak M., Sadkowska-Todys M., Kulonen K., Tordo N., Zmudzinski J.F., & Holmes E.C. (1999). Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *Journal of General Virology*, 80, 2545-2557
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10573146/>
7. Shipley R., Wright e., Seiden D., Wu G., Aegerter J., Fooks A.R., & Banyard A.C. (2019). Bats and Viruses: Emergence of Novel Lyssaviruses and Association of Bats with Viral Zoonoses in the EU. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4, 1: 31
<https://www.mdpi.com/2414-6366/4/1/31>
8. George D.B., Webb C.T., Farnsworth M.L., O'Shea T.J., Bowen R.A., Smith D.L., Stanley T.R., Ellison L.E., & Rupprecht C.E. (2011). Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25): 10208-10213
https://www.researchgate.net/publication/243055383_Host_and_viral_ecology_determine_bat_rabies_seasonality_and_maintenance
9. Blancou J. (1995). The evolution of rabies epidemiology in wildlife. *The Atlantic*, 1, 22
https://behavior.vetmed.ucdavis.edu/sites/g/files/dgvnsk491/files/inline-files/EVOLUTION_RABIES_EPIDEMIOLOGY_WILDLIFE.pdf

10. Yong E. (2015). That Time Europe Air-Dropped Vaccine-Loaded Chicken Heads to Bait Rabid Foxes. *The Atlantic* <https://www.theatlantic.com/science/archive/2015/12/that-time-europe-air-dropped-vaccine-loaded-chicken-heads-to-bait-rabid-foxes/417951/>
11. Shipley R., Wright E., Lean F.Z.X., Selden D., Horton D.L., & Fooks A.R. (2021). Assessing Rabies vaccine Protection against a Novel Lyssavirus, Kotalahti Bat Lyssavirus. *Viruses*, 13(5), 947 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8161192/>
12. Wallace, R.M., & Blanton J. (2020): *Emidemiology*. U: Fooks A.R., Jackson A.C. (ur.) Rabies, Fourth Edition. Academic Press, str. 103-142
13. iNaturalist <https://www.inaturalist.org/taxa/40913-Pteropus-alecto> (pristupljeno 1. 8. 2023.)
14. iNaturalist https://www.inaturalist.org/guide_taxa/505598 (pristupljeno 1. 8. 2023.)
15. Schwarzman Animal Medical Center https://www.amcny.org/pet_health_library/rabies-in-dogs/ (pristupljeno 1. 8. 2023.)

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10. travnja 2001. u Osijeku gdje sam pohađala Osnovnu školu Antuna Mihanovića (2008.-2016.). Potom sam upisala Klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Osijeku (2016.-2020.). Još od osnovne škole pokazivala sam veliko zanimanje za biologiju, te sam stoga odlučila upisati prijediplomski studij Biologija na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu u Zagrebu (2020.-2023.). Planiram upisati diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija, modul Fiziologija i imunobiologija, jer je to područje koje me najviše zanima. Na ovu temu Završnog rada sam se odlučila jer me fascinira bjesnoća kao bolest, ali i mehanizam i načini njezinog širenja te sam iskoristila ovu priliku za dublje istraživanje ove tematike. Slobodno vrijeme koristim za druženje s prijateljima, šetnje prirodom i gledanje omiljenih serija i filmova. Velika strast su mi putovanja jer volim upoznavati nove krajeve, različite narode i kulture.