

Włodzimierz Gut, Katarzyna Pancer

FILOWIRUSY – WYBRANE PROBLEMY NA TLE EPIDEMII WYWOŁANEJ WIRUSEM EBOLA

Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

STRESZCZENIE

Gorączka krwotoczna Ebola (EVD) jest odzwierzęcą chorobą o wysokiej zjadliwości u ludzi. Największa spośród odnotowanych epidemii EVD trwa obecnie w Afryce Zachodniej, wykraczając zarówno poza dotychczasową liczbę przypadków i, jak i poza oczekiwany wcześniej obszar geograficzny. W przedstawionej pracy omówiono wybrane aspekty biologii i ekologii wirusów Ebola istotne zarówno dla procesów pierwotnego zakażenia człowieka, jak i rozwoju epidemii w populacji. Szczególną uwagę zwrócono na elementy istotne zarówno dla prowadzenia diagnostyki zakażeń, jak i na bezpieczeństwo wykonywanych badań.

Słowa kluczowe: wirus Ebola, struktura i zmienność wirusa, krążenie EBOV w środowisku, transmisja zakażeń, inaktywacja wirusa Ebola i materiału klinicznego, diagnostyka

CHARAKTERYSTYKA FILOVIRIDAE

Epidemia wywołana wirusem Ebola spowodowała intensyfikację badań nad biologią całej rodziny *Filoviridae* ujawniając szereg interesujących cech biologicznych tej grupy systematycznej. Rodzina *Filoviridae* należy do rzędu *Mononegavirales* obejmującego wirusy charakteryzujące się nitkowatą strukturą nukleoproteiny oraz genomem, który stanowi niesegmentowane oraz ujemnie spolaryzowane RNA. Do tego rzędu zalicza się także trzy inne rodziny: *Rhabdoviridae* (np. wirus wścieklizny), *Paramyxoviridae* (np. RSV, wirus odry itp.) i *Bornaviridae* (np. *Avian bornavirus*). Filowirusy charakteryzują się wyjątkową w stosunku do innych wirusów morfologią. Przy użyciu mikroskopii elektronowej, często obserwuje się nitkowate cząsteczki mające długość do ok. 14 000 nm przy stałej średnicy przekroju ok. 80 nm. Inne wirusy zaliczane do *Mononegavirales* wykazują różne cechy morfologiczne, zarówno postać sferyczną, jak i krótką nitkowatą. Wszystkie wirusy należące do tego rzędu charakteryzują się podobną strukturą genomu, ss(-)RNA, gdzie po początkowym rejonie niekodującym, jako pierwszy występuje gen białka nukleoproteiny (NP), a genem końcowym jest gen dużego białka o charakterze RNA zależnej polimerazy RNA (L) (1).

Aktualnie do filowirusów zaliczane są trzy rodzaje: *Ebolavirus*, *Marburgvirus* oraz *Cuevavirus*. Do rodzaju

Ebolavirus (EBOV) zalicza się 5 gatunków - *Zair ebolavirus* (ZEBOV), *Sudan ebolavirus* (SEBOV/SUDV¹), *Cote d'Ivoire ebolavirus* (CIEBOV) od 2009r. nazywany *Tai Forest ebolavirus* (TEBOV/TAFV), *Bundibugyo ebolavirus* (BEBOV/BDBV) oraz *Reston ebolavirus* (REBOV/RESTV). Natomiast pozostałe rodzaje filowirusów reprezentowane są przez pojedyncze gatunki: rodzaj *Marburgvirus* - przez *Marburg marburgvirus* (MARV), a rodzaj *Cuevavirus* przez gatunek - *Lloviu Cuevavirus* (LLUV) (1).

Dla wszystkich tych wirusów naturalnymi gospodarzami są nietoperze, u których zakażenie ma łagodny lub bezobjawowy charakter. W przypadku rodzaju Ebola gospodarzami są gatunki owocożernych nietoperzy: *Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti*, *Rousettus aegyptiacus* oraz *Myonycteris torquata*. Gospodarzem wirusa Marburg są nietoperze *Rhinolophus eloquens* i *Miniopterus inflatus*, a gospodarzem Lloviu jest europejski nietoperz *Miniopterus schreibersii* (2).

Cechą charakterystyczną gospodarzy jest posiadanie wbudowanego w genom fragmentu cDNA przepisane z RNA genomu filowirusa. Jest to najczęściej zapis fragmentu homologicznego do białka matrix (VP35) lub białka nukleoproteiny (NP). Na podstawie występowania w genomie zwierząt fragmentów genów

1 W literaturze stosowane są różne skróty, obecnie nie ma zaleceń, które z nich są obowiązujące, w tekście podano dwa najczęściej używane

pochodzących z filowirusów ocenia się, że ta rodzina istnieje od co najmniej 50 milionów lat (3).

BUDOWA WIRUSA EBOLA

Genom filowirusów stanowi jednoniciowe ujemnie spolaryzowane RNA o długości około 19 000 nukleotydów. Na podstawie genomu kodowane jest osiem głównych mRNA, z których 7 koduje strukturalne białka wirusa: nukleoproteinę (NP), białko VP35 (kofaktor polimerazy), VP40 (białko matriks), glikoproteinę (GP), aktywator transkrypcji - VP30, drugie białko o charakterze matriks - VP24 i RNA-zależną polimerazę RNA(L) oraz jedno białko niestrukturalne (sGP) (Fig. 1) (4).

Oślonkę wirusa Ebola stanowi błona lipidowa pochodząca z błony komórkowej gospodarza w której umieszczone są swoiste białka wirusowe: VP40, VP24 – od strony wewnętrznej, oraz skierowana na zewnątrz białko glikoproteiny. Białka matriks VP40 i VP24 są jednocześnie łącznikiem pomiędzy rybonukleoproteiną a wewnętrzną powierzchnią osłonki lipidowej wirusa i uczestniczą w procesach formowania wirionu i pączkowaniu wirusa. Jednocześnie od białek matriks zależy zdolność namnażania się wirusa w komórkach określonych gospodarzy czyli tzw. specyficzność gatunkowa. Białka te odgrywają kluczową rolę w zjadliwości wirusów Ebola i Marburg hamując syntezę interferonu I oraz II typu (5-8).

Glikoproteiny GP1 i GP2 powstają w wyniku enzymatycznego trawienia prekursora-wirusowej glikoproteiny GP (9). Glikoproteiny odpowiedzialne są za wiązanie się wirusa z docelowymi komórkami gospodarza (preferencja śródbłonna i monocytów przez GP1), wnikanie do tych komórek oraz uszkodzanie komórek śródbłonna, a także uszkodzanie komórek i cytotoksyczność w komórkach naczyń krwionośnych. Glikoproteina jest również odpowiedzialna za zjawiska immunosupresji (*in vitro*). EBOV różni się od MARV i od innych filowirusów produkcją dużych ilości niestrukturalnej glikoproteiny (sGP), białka powstałego z pierwotnego produktu genu glikoproteiny (10). Ostatnio opublikowane prace wskazują, że białko to aktywuje niezakażone komórki dendrytyczne i powoduje wydzielanie cytokin pro- i przeciwzapalnych przez makrofagi (TNF α , IL1 β , IL6, IL8, IL12p40 i IL1-RA, IL10). Niektórzy autorzy wskazują, że białko sGP ma także działanie cytotoksyczne (9).

W procesie replikacji biorą udział kompleks polimerazy, czyli polimeraza oraz kofaktor polimerazy VP35, razem z nukleoproteiną. W procesie transkrypcji niezbędne jest także białko VP30 (2).

ZMIENNOŚĆ WIRUSA EBOLA

Biorąc pod uwagę fakt, że wirusy Ebola są wirusami RNA, a polimeraza RNA zależna od RNA nie wykazuje funkcji naprawczych w trakcie procesu transkrypcji, to spodziewana liczba zmian w genomie potomnych może wynosić nawet 10^{-4} /nukleotyd/rok. Szybkość mutacji obliczona dla EBOV wynosi $0,8 \times 10^{-3}$ na nukleotyd/na rok (11).

Na podstawie analizy sekwencji glikoproteiny wykazano prawdopodobne pochodzenie ZEBOV odpowiedzialnych za epidemie w Zachodniej Afryce w 2014 r. od pojedynczej linii rozwojowej tego wirusa z 2004 roku. Jednocześnie zaobserwowano znamienne wyższą częstość mutacji u wirusów badanych w 2014 roku w stosunku do badanych we wcześniejszych okresach. Również rozkład częstości zmian w 2014 roku był bardziej zbliżony do normalnego, podczas gdy u wirusów pochodzących z wcześniejszych badań rozrzut był wyjątkowo mały. Autorzy sugerują, że zmiana wynika z charakteru epidemii – epidemie „leśne” przebiegające w niewielkich i dość spokrewnionych populacjach charakteryzowałyby się mniejszą zmiennością wirusa (11). Należy także zwrócić uwagę na pewną różnicę w metodologii badań. W trakcie epidemii w 2014 roku sekwencjonowano genom wirusa bezpośrednio z materiału od chorych, a więc wirusy namnożone w różnych typach komórek chorego. Wcześniejsze badania prowadzono z wirusami wcześniej izolowanymi w liniach komórkowych (Vero) i tym samym poddanych pewnej formie preselekcji wystrzajającej krzywą rozkładu częstości mutacji.

KRAŻENIE WIRUSA W ZAKAŻONYM ORGANIZMIE I PATOGENEZA

Po wniknięciu do zakażanego organizmu pierwotnymi komórkami docelowymi dla filowirusów są monocyty, makrofagi i komórki dendrytyczne (12,13). Wewnątrz tych komórek wirus ulega namnożeniu, a równocześnie jest transportowany do innych obszarów zakażanego organizmu. W zakażonym organizmie wirus namnaża się w licznych typach komórek obejmujących poza wymienionymi wcześniej komórki śródbłonna, fibroblasty, hepatocyty, komórki kory nadnerczy, oraz kilka rodzajów komórek nabłonkowych (12). Autorzy sugerują, że wirusowa niestrukturalna glikoproteina jest jednym z głównych czynników uszkodzających naczynia oraz komórki śródbłonna, a jej poziom stanowi wyznacznik ich uszkodzenia (13).

W trakcie zakażenia filowirusy powodują rozległe zmiany patologiczne. Zmiany krwotoczne obejmują zarówno wybroczyny na skórze i błonach śluzowych,

jak i narządach wewnętrznych w połączeniu z dużymi wylewami do jam ciała. Wieloogniskowe zmiany martwicze występują w wątrobie, śledzionie, nerkach, jądrach i jajnikach. Zmiany w wątrobie obejmują martwicę oraz apoptozę komórek wątroby, stłuszczenie, a także rozrost komórek Kupffera. Obserwowane w tych komórkach eozynofilne wtręty cytoplazmatyczne są agregatami nukleoproteiny wirusa. W płucach obserwuje się krwawe wybroczyny i rozproszone ogniska uszkodzeń (14). W pierwszej fazie zakażenia u chorych stwierdza się leukopenię z limfopenią, a następnie leukocytozę i małopłytkowość. Z uszkodzeniem wątroby połączone jest zwiększenie w surowicy stężenia aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej. Pod koniec pierwszego tygodnia wskutek uszkodzenia nerek pojawia się skąpomocz oraz zwiększenie stężenia kreatyniny i mocznika we krwi. U chorych występują objawy rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego. Zmiany krwotoczne mogą być związane z zmniejszonym stężeniem czynników krzepnięcia i innych białek osocza z powodu martwicy wątroby i komórek kory nadnerczy. Ponieważ nadnercza odgrywają ważną rolę w kontroli ciśnienia krwi, upośledzenie czynności tego narządu prowadzi do niedociśnienia i utraty sodu, co stwierdzane jest we wszystkich objawowych zakażeniach tym wirusem (13,14).

ZACHOROWANIE WYWOŁANE WIRUSEM EBOLA

Przebieg kliniczny zakażenia wirusami Ebola różni się w zależności od gatunku wirusa. Ogólnie, gorączka krwotoczna Ebola następuje po okresie inkubacji 2-21 dni (średnio 4 - 10) i charakteryzuje się gorączką, dreszczami, złym samopoczuciem i bólami mięśni. W krótkim czasie występują kolejne objawy wielonarządowe, w tym ze strony układu pokarmowego (brak łaknienia, nudności, wymioty, bóle brzucha, biegunka), oddechowego (ból w klatce piersiowej, duszność, kaszel, wydzielina z nosa), naczyniowego (hipotensja) oraz objawów neurologicznych (ból głowy, splątanie, śpiączka). W końcowej fazie choroby obserwuje się krwawienia z jam ciała, wybroczyny, czy niekontrolowany wyciek z miejsc nakłucia żył oraz krwawienia wewnętrzne. Często towarzyszy im wysypka i gwałtowna utrata wagi. Objawy te występują w 5-7 dniu od zakażenia. U części osób w kolejnych dniach występują objawy szoku, drgawki, ciężkie zaburzenia metaboliczne i krzepnięcia krwi prowadzące do zgonu. U osób, które wyzdrowiały wykazano, że objawy z okresu 5-7 dnia stopniowo ustępują. Uważa się, że przeżycie powyżej 10 dnia od wystąpienia pierwszych objawów jest dla tych chorych wskaźnikiem pozytywnego rokowania (12,14).

W dotychczasowych ogniskach zakażeń filowirusami obserwowano średnio 78% umieralność dla wirusa Ebola Zair i 53% dla wirusa Ebola Sudan. Jedyna osoba zakażona wirusem CIEBOV przeżyła. Najniższą umieralność stwierdzono w ognisku zakażeń wirusem Ebola Bundibugyo w 2007r. i wynosiła ona 25% (15). Chociaż choroba Marburg jest uważana za charakteryzującą się niższą umieralnością, to średnio 82% chorych zakażonych wirusem Marburg umiera. Warto jednak zauważyć, że odsetek zachorowań zakończonych zgonem zależy od regionu i poziomu opieki medycznej. W Europie i Stanach Zjednoczonych jedynie 24% chorych z MGBV umierało, podczas gdy wśród chorych w Demokratycznej Republice Konga i w Angoli odsetek zgonów wynosił odpowiednio 83% i 90% (14,15).

ROLA HUMORALNEJ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ W PROCESIE ZAKAŻENIA FILOWIRUSAMI

Prowadzące do śmierci chorego zakażenie EBOV jest związane z działaniem wirusa ograniczającym naturalną odpowiedź na zakażenie i doprowadzeniem do niekontrolowanego uwalniania mediatorów zapalnych i chemokin w późnym stadium choroby. Proces ten koreluje z silną apoptozą limfocytów T i B, mimo że nie zostały one zakażone. Przeżycie i powrót do zdrowia chorych zakażonych EBOV jest związany z wytworzeniem swoistej neutralizującej wirusa odpowiedzi w klasie G immunoglobulin (IgG), których poziom u osób, które zmarły jest ponad 100-krotnie niższy lub niewykrywalny (16). Przeciwciała IgG inne niż neutralizujące, są często wykrywane testem ELISA lub podobnym, natomiast IgG neutralizujące – wyłącznie testem neutralizacji. Tylko w surowicach ozdrowieńców występowały przeciwciała neutralizujące skierowane przeciw glikoproteinie powierzchniowej (GP) wirusa. Natomiast IgG skierowane przeciw niestrukturalnej glikoproteinie (sGP), nie mają cech przeciwciała neutralizującego i są wykrywane wyłącznie testem ELISA. Jednocześnie, wykrywane testem ELISA przeciwciała IgG u osób, które nigdy nie miały klinicznych objawów zakażenia wirusem Ebola, skierowane były głównie przeciw białku VP40 (16).

Uważa się, że produkcja dużych ilości niestrukturalnej, tzw. rozpuszczalnej formy glikoproteiny (sGP) w trakcie zakażenia stanowi dodatkowy element ochrony wirusa przed eliminacją przez układ odpornościowy gospodarza. Białko to zgodne jest w ponad 90% z glikoproteiną osłonki wirusa i jest silnym induktorem odpowiedzi humoralnej, jednak powstające przeciwciała nie neutralizują wirusa Ebola. W procesie ko-immunizacji sGP i GP zwierząt doświadczalnych obserwowano przesunięcie profilu odpowiedzi humo-

ralnej w stronę przeciwną nieposiadających zdolności neutralizacyjnych (17).

SZERZENIE SIĘ ZAKAŻEŃ A EKOLOGIA WIRUSA

Jak zaznaczono wcześniej, naturalnymi gospodarzami filowirusów są nietoperze. Człowiek oraz małpy naczelne, podobnie jak leśne afrykańskie antylopy, stanowią przypadkowych gospodarzy, u których obserwuje się wysoką śmiertelność zakażonych osobników. W przypadkach epidemii leśnych, zarówno dochodzenia epidemiologiczne, jak i analizy materiału genetycznego wirusów wykazały istotną rolę tych zwierząt, jako głównego źródła pierwotnych zakażeń człowieka (18). Po przekroczeniu bariery międzygatunkowej między zwierzętami i człowiekiem, choroba rozprzestrzenia się między ludźmi poprzez bezpośredni kontakt fizyczny. Jednak już w trakcie epidemii w 1976 roku zaobserwowano, że ok. 5% chorych w Sudanie nie miało bezpośredniego kontaktu fizycznego z chorym na Ebola ani z ciałami zarażonych zwierząt. W trakcie epidemii „miejskiej” w Kikwicie (1995r. Demokratyczna Republika Kongo dawniej Zair) odsetek takich przypadków sięgał 17,4%. Te obserwacje sugerowały możliwość innej niż bezpośredni kontakt rodzajów transmisji wirusa (droga kropelkowa lub kontakt z zakażonym zwierzęciem z innych gatunków niż naczelne i antylopy leśne). Ponieważ kontakt z filowirusami mają także inne zwierzęta, w tym domowe i hodowlane, szczególną uwagę zwrócono na psy. W afrykańskich wioskach psy nie są specjalnie karmione i zjadają zarówno martwe zwierzęta znalezione w pobliżu wioski, jak i narządy wewnętrzne i odpady ze zwierząt upolowanych przez mieszkańców. Pomimo braku udokumentowania zakażeń filowirusami u psów, ich zachowanie i sposób żywienia mógł sugerować ich udział w szerzeniu zakażeń. *Allela* i wsp. (18) przeprowadzili badania obecności przeciwciał IgG reagujących z antygenami wirusa Ebola w 3 populacjach psów. Populacje te zostały dobrane pod względem występowania zakażeń wirusem Ebola u ludzi na terenach, na których przebywały te zwierzęta. Grupę odniesienia stanowiły psy (ponad 100) z terenu Francji. Uzyskano spektakularny wynik w postaci liniowego gradientu seroprewalencji od Francji (2% psów, które miały kontakt z filowirusami), poprzez ok. 9% w afrykańskim mieście, w którym nie zdiagnozowano ani jednego zachorowania EVD wśród ludzi, poprzez ponad 15% w Mekambo (miejscowości, w której obserwowano pojedyncze zachorowania) do ok. 25% psów z wioski, gdzie wystąpiła epidemia Ebola wśród ludzi (18). Wyniki te sugerują, że badania poziomu przeciwciał przeciw wirusom Ebola u psów odzwierciedlają aktywność wirusa Ebola i mogą być

wskaźnikiem stopnia zagrożenia zakażeniami tym wirusem u ludzi.

Zespół *Olson* i wsp. przeprowadzili staranną analizę dostępnych danych nt. zakażeń filowirusami u zwierząt przed 2012 r. (19). W analizie uwzględniano nie tylko metodę badania (wykrycie wirusa czy badanie seroprewalencji, ale i charakter przedmiotu badania (żywe zwierzęta czy znalezione zwłoki). Łącznie przeanalizowano informacje o 13 440 zwierzętach należących do 158 gatunków, w tym 1 214 schwytanych żywych osobników oraz 19 znalezionych zwłok (10 różnych gatunków zwierząt). W grupie żywych zwierząt najczęściej badano nietoperze i gryznie. Stwierdzono, że w grupie żywych zwierząt u 0,2% (13/5309) badanych wykryto genom wirusa EBOV. Natomiast przeciwciała dla tego wirusa wykryto u 2,2% badanych zwierząt (180/8050 badanych). W przypadku badań martwych zwierząt większość stanowiły zwłoki naczelnych. W okresach epidemii u ludzi obecność wirusa Ebola stwierdzano u ponad 32% badanych zwłok małp. W aspekcie zagrożenia zakażeniami wirusem Ebola za pośrednictwem psów należy zauważyć, że o ile przeciwciała wykryto u 24,1% badanych zwierząt, to u żadnego żywego psa nie wykryto zakażenia, a padłe psy również nie były zakażone. Natomiast wśród badanych małp naczelnych ani przeciwciał ani wirusa nie wykrywano u żywych osobników, natomiast aż 51,5% padłych zwierząt zakażonych było EBOV (19).

Takie dane wskazują na brak objawowego i prowadzącego do zgonu zakażenia wirusem Ebola u psów. Stwierdza się jedynie dość częste w okresach epidemii zakażenia bezobjawowe tych zwierząt. Brak jest informacji o roli innych zwierząt niż nietoperze, u których zakażenie przyjmuje formę bezobjawową, w transmisji zakażeń do ludzi. Specyficzna droga szerzenia się choroby, czyli kontakt z wydalaminami i wydzielinami chorych, nie pozwala jednak na jednoznaczne określenie ich roli w zakażeniach u ludzi. Jednocześnie brak takich obserwacji w trakcie dotychczasowych epidemii sugeruje, że rola bezobjawowo chorujących zwierząt w procesie szerzenia się zakażeń u ludzi jest istotna w zakażeniu pierwszego przypadku (przypadek 0) i znikoma albo wręcz nieistotna w dalszym rozwoju epidemii.

W trakcie epidemii w Afryce Zachodniej w 2014 r. (a właściwie w Hiszpanii) pojawił się problem transmisji zakażenia do zwierząt domowych, będących w otoczeniu człowieka i zagrożenia dalszą transmisją od tych zwierząt do człowieka. Dotychczasowe badania wykazały możliwość zakażenia wirusem Ebola także świń. W 2008 roku zaobserwowano na Filipinach zakażenia wirusem REBOV u świń oraz wykryto przeciwciała u ludzi mających kontakt z tymi zwierzętami. Należy jednak zauważyć, że u świń dominowały objawy zakażenia układu oddechowego (nietypowy przebieg zakażenia), co wskazuje na możliwość zakażenia po-

przez skażony aerozol. Tą drogą doszło do pierwszego wykrytego zakażenia REBOV ludzi od małych importowanych do USA z Filipin (12). Ponadto, opisywane zjawisko dotyczyło wirusa niepatogennego dla człowieka, a przeciwiała stwierdzano u osób będących w bliskim kontakcie ze zwierzętami.

WRAŻLIWOŚĆ WIRUSA EBOLA

Badania ostatnich lat wskazują, że drogi transmisji wirusa Ebola przez aerozol nie można wykluczyć. Okazało się bowiem, że w wyniku wysuszenia materiału klinicznego (krew, wydaliny, płyny ustrojowe) zawierającego wirusa Ebola, białka surowicy i elementy komórkowe działają ochronnie i powodują znaczny wzrost oporności ok. 3-5% wirusa na warunki fizykochemiczne środowiska, takie jak promieniowanie UV, promieniowanie gamma, temperatura, dezynfektanty na bazie chloru itp. Może wówczas powstać aerozol zawierający zakaźne cząstki wirusa (20,21). Działanie ochronne białek surowicy i elementów morfotycznych krwi wykazano także w badaniach z użyciem podłoża płynnych - zakaźne cząstki wirusa wykrywane były po ponad miesiącu. Temperatura jest istotnym czynnikiem wpływającym na wirusa Ebola. W temperaturze +4°C obserwuje się istotne wydłużenie czasu przetrwania wirusa, natomiast ogrzewanie w 60°C przez co najmniej 30 minut całkowicie inaktywuje wirusa Ebola (22).

Mimo, że wirus Ebola jest wirusem osłonkowym, to wskazane jest stosowanie preparatów dezynfekcyjnych o aktywności wirusobójczej także wobec wirusów bezosłonkowych i wykazujących wyższy poziom oporności niż wirusy osłonkowe zgodnie z PN-EN 14476:2013-12 (23). Ponadto preparaty te powinny zawierać, obok substancji wirusobójczych, także detergenty, tak aby usunąć wszelkie możliwe zanieczyszczenia, które mogą działać ochronnie na wirusa Ebola (22).

DIAGNOSTYKA EVD

Objawy w przebiegu zakażenia wirusem Ebola, szczególnie w pierwszym etapie zachorowania mogą przypominać wiele innych zakażeń, w tym malarię, dur brzuszny, gorączki krwotoczne wywołane przez inne wirusy np. lassavirus. Konieczne jest więc potwierdzenie czynnika etiologicznego zachorowania. Do celów mikrobiologicznego diagnozowania zakażeń wirusem Ebola stosuje się techniki biologii molekularnej (PCR z etapem odwrotnej transkrypcji), poszukuje się antygeny (szybkimi testami lub ELISA), lub przeciwiała klasy IgM i IgG (Tab.I) (24,25). Jednak, jak już wcześniej wspomniano, przeciwiała tzw. neutralizujące wykrywane są wyłącznie za pomocą testu neutralizacji (ba-

dania w laboratorium klasy 4). Natomiast w badaniach z zastosowaniem ogólnie dostępnych technik ELISA itp., wykrywane są przede wszystkim IgM oraz IgG inne niż neutralizujące (13,25).

Podobnie jak w innych zachorowanych, stosowane metody powinny być dostosowane do etapu zakażenia. Najwcześniej (od ok. 2-3 dnia) wykrywa się obecność genomu wirusa (PCR), a u niektórych chorych także IgM. Począwszy od 4 dnia można poszukiwać antygeny wirusa. Począwszy od 10 dnia wskazane jest poszukiwanie IgG. Biorąc pod uwagę, że większość chorych umiera w ok. 10 dniu choroby, oznaczanie IgG stosuje się głównie w badaniach retrospektywnych.

W przeciwieństwie do wielu innych czynników wirusowych, obecność EBOV stwierdza się u chorego dopiero po wystąpieniu pierwszych objawów. Ponadto obecność wirusa stwierdza się w większości płynów ustrojowych do ok. 20 dni od daty zachorowania, ale w kale – do ok. 4 tygodnia, w materiale pobranym z pochwy – do 9 tygodnia, natomiast w nasieniu – aż do 13 tygodnia (8).

Próbki materiału pobranego od chorych, u których podejrzewa się zakażenie wirusem Ebola należy traktować jako wysoce zakaźne. Badania w laboratorium klasy 2 mogą być prowadzone wyłącznie po etapie unieczyszczenia zakaźności próbki. Do czasu inaktywacji próbkę należy traktować jako potencjalnie bardzo niebezpieczny materiał i stosować odpowiednie zabezpieczenia (26). Dotyczy to zarówno badań tzw. analitycznych (liczba białych krwinek, poziom cukru, elektrolitów itp.), jak i mikrobiologicznych (Tab.I). Przyjmuje się, że liczbę badań diagnostycznych u chorego z podejrzeniem EVD należy ograniczyć do minimum.

UKIERUNKOWANA TERAPIA I SZCZEPIENIA

Obecnie dopuszczono do stosowania u chorych z EVD preparaty immunologiczne, w tym surowice ozdrowieńców oraz warunkowo - ZMapp. ZMapp jest to preparat zawierający 3 różne humanizowane monoklonalne przeciwiała dla GP wirusa Ebola. Ponadto prowadzone są badania nad zastosowaniem preparatu (Tekmira) wykorzystującego interferujące działanie krótkich łańcuchów RNA (tzw. interferujące RNA; iRNA). Innym preparatem, który może znaleźć zastosowanie w przyszłości jest Favipiravir – czyli inhibitor polimerazy RNA zależnej od RNA (8,12).

Innymi preparatami, które są obecnie na etapie I/II fazy badań klinicznych są szczepionki. Najbardziej zaawansowane są obecnie prace nad dwiema szczepionkami: zawierającą adenowirusa szympansa z wstawionym genem wirusa Ebola (ChAd3-ZEBOV)

oraz nad szczepionką zawierającą atenuowanego wirusa Vesicular Stomatitis z wstawionym genem EBOV (rVSV-ZEBOV). W badaniach na zwierzętach stwierdzono ich skuteczność oraz brak toksyczności (12,27). Ponadto trwają także prace nad innymi szczepionkami, które dopiero w 2015 roku prawdopodobnie zostaną dopuszczone do I fazy badań klinicznych. Są to: rosyjski preparat zawierający rekombinowanego wirusa grypy i Ebola oraz propozycja stosowania do dwuetapowego

szczepienia - dwóch różnych szczepionek nazwanych Ad26-EBOV oraz MVA-EBOV (firmy Johnson&Johnson oraz Bavarian Nordic) (27).

Otrzymano: 27.01.2015 r.

Zaakceptowano do publikacji: 10.02.2015 r.

Adres do korespondencji:

Włodzimierz Gut

Zakład Wirusologii NIZP-PZH

Chocimska 24, 00-791 Warszawa