

Wirus EBOLA jako potencjalne wyzwanie dla krwiodawstwa, krwiolecznictwa i zdrowia publicznego

Ebola virus — a potential challenge for blood donation, blood product therapy and public health

Katarzyna Tkaczuk¹, Ryszard Pogłód², Piotr Grabarczyk¹

¹Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

²Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Streszczenie

Wirus Ebola (EBOV) jest znanym od czterech dekad czynnikiem zakaźnym wywołującym epidemie gorączki krwotocznej Ebola (EVD, Ebola virus disease) w krajach Afryki Środkowej. W latach 2014–2016 EBOV wywołał ogromny niepokój z powodu rozprzestrzenienia się na nowe tereny — kraje Afryki Zachodniej, powodując największą w historii epidemię EVD. Od grudnia 2013 roku do marca 2016 roku odnotowano ponad 28 tysięcy potwierdzonych, prawdopodobnych i możliwych przypadków EVD, głównie w Liberii, Sierra Leone i Gwinei, w tym ponad 11 tysięcy przypadków zgonów. Kilka przypadków zakażenia EBOV miało również miejsce w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej oraz w Europie — zakażeniu uległy osoby sprawujące opiekę nad pacjentami zakażonymi w Afryce.

Wirus stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego w krajach, w których wywołuje ogniska choroby. Podczas epidemii w Afryce Zachodniej wzrosło ryzyko przeniesienia EBOV poprzez substancje pochodzenia ludzkiego (SoHO, substances of human origin). Przekłada się to również na zwiększone ryzyko zaistnienia takich sytuacji poza kontynentem afrykańskim. Można je ograniczyć poprzez stosowanie odpowiednich procedur, na przykład kwalifikacji dawców i bezpieczeństwa biologicznego laboratoriów.

W pracy zwrócono uwagę na sposoby transmisji wirusa EBOV, przebieg kliniczny zakażenia, diagnostykę i leczenie, szczególnie z zastosowaniem składników krwi, sytuację epidemiologiczną oraz sposoby zapobiegania zakażeniom i kontrolę epidemii. Szczegółowo omówiono ocenę ryzyka przeniesienia wirusa Ebola przez SoHO oraz prawdopodobieństwo wykorzystania EBOV jako broni biologicznej. Przedstawiono również zalecenia dotyczące bezpieczeństwa biologicznego medycznych laboratoriów diagnostycznych.

Słowa kluczowe: wirus Ebola, gorączka krwotoczna Ebola, dawcy krwi, bezpieczeństwo przetoczeń, substancje pochodzenia ludzkiego (SoHO)

J. Transf. Med. 2017; 10: 149–165

Summary

Ebola virus (EBOV) is a known infectious agent of Ebola virus disease (EVD) in the Central African countries for four decades. In the years 2014–2016, the EBOV caused tremendous

anxiety as it spread to new territories — West African countries, causing the largest ever EVD epidemic. Between December 2013 and March 2016, more than 28,000 confirmed, probable and possible EVD cases were reported in Liberia, Sierra Leone and Guinea, including over 11,000 deaths. Several cases of EBOV infection have also occurred in the United States of America and in Europe — those who took care of infected people in Africa also became infected. The virus poses a serious threat to public health in countries where there is an outbreak of disease. During the epidemic in West Africa, the risk of the EBOV transmission through substances of human origin (SoHO) increased. This also implies an increased risk of such situations outside the African continent. It can be reduced by using appropriate procedures such as donor qualifications and laboratory biosafety.

The work highlighted EBOV transmission methods, clinical course of infection, diagnosis and treatment, especially with blood components, epidemiological situation and ways of preventing infection and control of epidemic. The assessment of the risk of transmission of the Ebola virus by SoHO and the probability of using EBOV as a biological weapon are discussed in detail. There are also recommendations on the biosafety of medical diagnostic laboratories.

Key words: Ebola virus, Ebola haemorrhagic fever, blood donor, safety of transfusions, substances of human origin (SoHO)

J. Transf. Med. 2017; 10: 149–165

Wstęp

Wirus Ebola (EBOV, *Ebola virus*) znany jest od 30 lat zeszłego stulecia i dotychczas stanowił lokalny problem w Afryce. Przebieg aktualnej epidemii w Afryce Zachodniej, która zaczęła się rozprzestrzeniać w 2013 roku, uzmysłowił światowej opinii publicznej, że zakażenie tym wirusem może się stać problemem globalnym. Wśród ponad 11 tysięcy ofiar śmiertelnych epidemii są również mieszkańcy Europy i Stanów Zjednoczonych. Większość ofiar zakażyła się w Afryce, niosąc pomoc medyczną osobom zakażonym, jednak w niektórych przypadkach do przeniesienia infekcji dochodziło już poza Afryką, nawet w ośrodkach, które teoretycznie powinny dysponować wiedzą i środkami służącymi uniknięciu zakażenia [1].

Stosując odpowiednie środki zapobiegawcze, można skutecznie ograniczyć ryzyko przeniesienia zakażenia, jednak łatwość, z jaką materiał biologiczny może się stać zagrożeniem dla zdrowia publicznego, stanowiła główną przesłankę dla umieszczenia wirusa Ebola na liście patogenów o potencjalnym charakterze bioterrorystycznym [2].

Czy epidemie wirusa Ebola stanowią istotne zagrożenie dla krwiodawstwa i krwiolecznictwa? Przeniesienie zakażenia wirusem przez transfuzję krwi i jej składników nie zostało udokumentowane. Ponadto wirus, która potencjalnie może zostać przeniesiona przez transfuzję, towarzyszą objawy kliniczne, w związku z tym przestrzeganie odpowiednich zasad kwalifikacji dawców pozwala

skutecznie ograniczyć ryzyko zakażenia przez przetoczenia krwi i jej składników [3].

Dyskutując znaczenie wirusa Ebola w krwiodawstwie, podkreśla się znaczenie organizacji krwiodawstwa w okresie epidemii, gdyż EBOV, jak każdy wirus wywołujący gorączkę krwotoczną, może być odpowiedzialny za nasilone krwawienia i anemizację chorych, wobec czego zakażeni pacjenci będą wymagać transfuzji. Krew takich potencjalnych biorców krwi trafia do laboratoriów banków krwi, na przykład na badanie grup krwi, morfologię itp., i jak wiele innych materiałów biologicznych, jako potencjalne źródło zakażenia, stanowi istotne zagrożenie dla personelu. W związku z tym dostrzega się potrzebę ochrony osób wykonujących tego typu analizy, mimo że nie mają one charakteru procedur z zakresu diagnostyki czynników zakaźnych. Takie wyzwanie organizacyjne staje przede wszystkim przed afrykańskimi ośrodkami zajmującymi się doбором krwi dla zakażonych pacjentów, ale także należy je brać pod uwagę w przypadku pracowników laboratoriów w krajach, do których trafiają osoby zakażone.

Podkreśla się także znaczenie krwiodawstwa w leczeniu osób zakażonych, ponieważ obecnie opiera się ono między innymi na przetaczaniu krwi lub osocza od ozdrowieńców. Stwarza to dodatkowe trudności w Afryce, gdzie między innymi rozwija się proceder nielegalnego handlu tego typu osoczem, często niepodlegającym jakimkolwiek badaniom wirusologicznym, przyczyniając się do nowych zakażeń, na przykład wirusem zapalenia

wątroby typu B (HBV), typu C (HCV) i wirusem HIV [4, 5].

Wirus Ebola

Wirus Ebola obejmuje 5 różnych gatunków: *Zaire ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Bundibugyo ebola virus*, *Tai Forest ebolavirus* i *Reston ebolavirus*. Zostały one sklasyfikowane do rodziny *Filoviridae*, rodzaju *Ebolavirus*. Ebolawirusy: *Zair*, *Sudan*, *Bundibugyo* i *Tai Forest* występują w Afryce i powodują poważną chorobę u ludzi. *Reston ebolavirus* obecny jest na Filipinach i powoduje u ludzi tylko bezobjawowe zakażenie.

Wirus Ebola powoduje ostrą, poważną chorobę, która nieleczona często prowadzi do śmierci. Gorączkę krwotoczną Ebola (EVD, *Ebola virus disease*) po raz pierwszy opisano w 1976 roku, w trakcie dwóch występujących jednocześnie epidemii — w Sudanie i Demokratycznej Republice Konga (dawniej Zair). Epidemia w drugim z wymienionych krajów pojawiła się w wiosce niedaleko rzeki Ebola, od której wirus wziął swoją nazwę [6].

Rezerwuuar

Wirusy Ebola zostały wyizolowane od kilku owocożernych nietoperzy w Afryce Środkowej i Zachodniej i zakłada się, iż są one ich naturalnym rezerwuarem [7].

Przenoszenie wirusa

Uważa się, że wirus Ebola został wprowadzony do populacji ludzkiej poprzez bezpośredni kontakt z krwią lub innymi płynami ustrojowymi, wydzielinami, narządami zakażonych lub padłych zwierząt, takich jak: małpy, szympansy, goryle, antylopy, świnie, gryzonie i inne ssaki. Zwierzęta te z kolei mogły się zarazić wirusem poprzez kontakt ze śliną lub odchodami nietoperzy [7]; dotyczy to także ludzi. Następnie choroba rozprzestrzenia się z człowieka na człowieka poprzez bezpośredni kontakt przez uszkodzoną skórę lub błony śluzowe z krwią lub innymi płynami ustrojowymi, wydzielinami, organami osoby zakażonej, u której **występują objawy** lub która zmarła. Człowiek staje się zakaźny z chwilą wystąpienia objawów choroby. Zakaźny może być także materiał biologiczny, który pozostał na przedmiotach i materiałach (np. na pościeli czy ubraniu). Okres utrzymywania się wirusa w organizmie jest trudny do jednoznacznego ustalenia, ponieważ są widoczne różnice w długości czasu utrzymywania się wirusa we krwi i innych płynach ustrojowych. W badaniach różnych materiałów biologicznych RNA wirusa Ebola wykrywano w następujących

okresach po wystąpieniu objawów: do 33 dni w wymazie z pochwy, 29 dni w wymazie z odbytnicy, 23 dni w moczu, 22 dni w wymazie ze spojówek, 21 dni we krwi, 15 dni w mleku matki, 8 dni w ślinie oraz 6 dni na skórze. Ze względu na stosunkowo niewielką liczbę pacjentów objętych badaniem, należy liczyć się z tym, że czas pozostawania RNA wirusa Ebola w płynach ustrojowych może być dłuższy. Obserwacja dotycząca wykrywania EBOV w mleku matki dotyczy tylko jednego przypadku, dlatego podkreśla się konieczność gromadzenia większej liczby obserwacji, aby w sposób bardziej miarodajny ustalić długość czasu od początku choroby, po którym na przykład wznowienie karmienia piersią będzie bezpieczne dla dzieci [7–11].

Niepokojące obserwacje dotyczą przenoszenia zakażeń drogą seksualną. Opisano przypadek kobiety, która w marcu 2015 roku w Liberii została zakażona wirusem Ebola poprzez kontakty seksualne bez zabezpieczeń z ozdowieńcem. Do kontaktów tych doszło po upływie 6 miesięcy po zakażeniu mężczyzny wirusem i 155 dni po drugim badaniu krwi, na podstawie którego pacjent został uznany za wolnego od wirusa [12]. Według najnowszych doniesień, najdłuższy zaobserwowany okres pomiędzy wypisaniem pacjenta ze szpitala a pobraniem próbki spermy z pozytywnym wynikiem na obecność wirusa wyniósł 565 dni. Dane pochodzą z programu obejmującego mężczyzn w Liberii. Z 429 ozdowieńców, 38 oddało co najmniej jedną próbkę nasienia, która dała wynik pozytywny na obecność EBOV, natomiast 24 miało pozytywny wynik po 12 miesiącach lub dłużej po wyleczeniu [13].

Interesującą i niezwykle istotną z epidemiologicznego punktu widzenia kwestią jest możliwość przeniesienia EBOV drogą kropelkową. Badania na zwierzętach sugerują, iż EBOV może się przenosić tą właśnie drogą. Przypadki przeniesienia zakażenia drogą kropelkową są rozważane u pacjentów, u których nie stwierdzono zakażenia drogą bezpośredniego kontaktu. Wirus Ebola zawieszony w kropli może pochodzić z takich płynów ustrojowych, jak: krew, wymioty, ślina lub biegunka oraz może się przenosić poprzez kaszel, kichanie, mówienie i niektóre zabiegi medyczne (np. odsysanie, intubacja dotchawicza, resuscytacja krążeniowo-oddechowa). Kaszel może być częstym objawem u pacjentów z EVD, zwłaszcza podczas późnych faz choroby, gdy wirus w surowicy rośnie znacząco, w konsekwencji czego wirus trafia do większości płynów ustrojowych i ostatecznie może być wydzielany w postaci aerozolu o różnych rozmiarach cząstek. Ograniczona liczba autopsji przeprowadzonych na ludziach (przede wszystkim

podczas wybuchu epidemii EBOV w latach 1976 i 1995) wykazała przekrwienia, ogniskowe obrzęki pęcherzyków płucnych, rozlane uszkodzenia pęcherzyków płucnych i krwotoki w płucach. Sugeruje to, że aerozole zakaźne mogą być emitowane z dróg oddechowych. Wdychanie aerozoli zakaźnych przez osobę zdrową, znajdującą się w pobliżu zakażonej osoby, może prowadzić do osadzenia się patogenu w układzie oddechowym. Dane eksperymentalne prowadzone na zwierzętach wykazały, że mechaniczna aerolizacja cząstek wirusa może przenieść zakażenie nawet w przypadku niskiego ich stężenia, ale znaczenie tego eksperymentu w warunkach naturalnych jest niejasne. Wiele czynników wpływa na tempo inaktywacji wirusów w aerozolu, na przykład temperatura i wilgotność względna, rodzaj płynu, w którym jest zawieszony wirus. Jednak dotychczas nie zgromadzono wystarczających danych, aby jednoznacznie określić liczbę cząsteczek wirusa, które trafiają do środowiska zewnętrznego, na przykład podczas kaszlu. Niemniej podkreśla się, że podczas pracy z pacjentem/materiałem zakażonym EBOV konieczne jest skrupulatne przestrzeganie zasad ochrony osobistej oraz bezpiecznych praktyk laboratoryjnych. Zwraca się jednak także uwagę, że mimo iż kaszel był powszechny wśród zakażonych EBOV w Afryce, nie opisano dotychczas udokumentowanych przypadków rozprzestrzeniania się wirusa poprzez aerozole w populacjach ludzkich. Przypuszcza się, iż droga aerolowa jest możliwa, ale w niższych temperaturach i wilgotności. Podkreślając, bardzo trudno jest definitywnie wykazać lub wykluczyć zakażenie przez aerozole, ponieważ osoby narażone na aerozole zakaźne są również, najprawdopodobniej, w bezpośrednim kontakcie z zainfekowanym pacjentem [14, 15].

Inkubacja

Okres inkubacji (okres między zakażeniem a wystąpieniem pierwszych objawów) trwa zwykle 4–10 dni, ale może być zarówno bardzo krótki — 2 dni, jak i wydłużony, nawet do 21 dni [16]. Okres inkubacji podczas największej epidemii Eboli trwał 9–11 dni [17].

Przebieg kliniczny zakażenia

U pacjentów z EVD gorączka i inne objawy pojawiają się nagle, zazwyczaj po 8–12 dniach po ekspozycji na wirusa. Początkowe objawy są niecharakterystyczne i mogą obejmować podwyższoną temperaturę ciała lub gorączkę, dreszcze, bóle mięśniowe oraz złe samopoczucie. Ze wzglę-

du na te niespecyficzne objawy, szczególnie we wczesnym stadium choroby, EVD często może być mylona z innymi bardziej rozpowszechnionymi chorobami zakaźnymi, takimi jak: malaria, dur brzuszny, bakteriemia meningokokowa i inne infekcje bakteryjne (np. prowadzące do zapalenia płuc). Po około 5 dniach od pojawienia się pierwszych, nieswoistych objawów, mogą się pojawić objawy ze strony przewodu pokarmowego w postaci ciężkiej, wodnistej biegunki, wymiotów, nudności i bólów brzucha, a także inne dolegliwości, takie jak: ból w klatce piersiowej, duszność, ból głowy czy dezorientacja. Często także występuje zapalenie spojówek, a sporadycznie — drgawki i obrzęk mózgu. Objawy skazy krwotocznej nie zawsze są obecne na początku choroby, mogą się pojawiać później w postaci wybroczyn, krwiaków lub krwawień z miejsc wkłucia i śluzówek. Od 5. do 7. dnia trwania choroby u pacjentów może występować również rozlana grudkowo-rumieniowa wysypka z tendencją do łuszczenia, zwykle na szyi, tułowi i ramionach. U kobiet w ciąży dochodzi do poronień. U pacjentów z najcięższą, prowadzącą do zgonu, postacią choroby, poważne objawy kliniczne rozwijają się zwykle we wczesnym okresie infekcji. Chorzy ci w trakcie epidemii w Afryce Zachodniej w latach 2013–2016 ginęli między 6. a 16. dniem z powodu powikłań, w tym niewydolności wielonarządowej i wstrząsu septycznego, średnio 7,5 dnia od wystąpienia pierwszych objawów. W przypadkach zakończonych wyzdrowieniem gorączka utrzymuje się przez kilka dni, później, zwykle około 6. dnia, stan chorego ulega poprawie. Czas rekonwalescencji pacjentów, którzy przeżyli, może być wydłużony [18, 19]. W czasie epidemii na tym obszarze do najczęściej występujących objawów do czasu identyfikacji zakażenia należały: gorączka (87,1%), zmęczenie (76,4%), wymioty (67,6%), biegunka (65,6%), utrata łaknienia (64,5%), ból głowy (53,4%) i ból brzucha (44,3%). Krwawienie jest mniej powszechne. Wystąpiło tylko u 18% chorych i najczęściej pod postacią obecności krwi w kale (5,7%). Śmiertelność wśród pacjentów z objawami klinicznymi zakażenia w Gwinei, Liberii i Sierra Leone wyniosła około 70,8%, jednak wśród pacjentów hospitalizowanych była nieco mniejsza i sięgała 64,3%. Do istotnych niekorzystnych czynników rokowniczych u chorych dotkniętych EVD w krajach Afryki Zachodniej należały: wiek > 45 lat i obecność objawów ogólnych, takich jak: biegunka, zapalenie spojówek, trudności w oddychaniu lub polykaniu, dezorientacja i śpiączka oraz objawów krwotocznych w postaci niewyjaśnionego krwawienia dziąseł, krwotoków z nosa, pochwy i krwawień w miejscu wkłucia [20]. W badaniach

laboratoryjnych stwierdzano leukopenię i małopłytkowość oraz zwiększenie aktywności enzymów wątrobowych [21]. Niektóre obserwacje wskazują na to, że wirus może atakować ośrodkowy układ nerwowy. Świadczy o tym przypadek ostrej postaci EVD z objawami zapalenia opon mózgowych, encefalopatii i drgawkami [22]. Inny przypadek, w którym wykryto wirus w płynie mózgowo-rdzeniowym, wskazuje, że wirus Ebola może przekroczyć barierę krew–mózg, a tym samym może pełnić patogenną rolę w zapaleniu mózgu. W takich sytuacjach zaleca się ukierunkowanie leczenia również na ośrodkowy układ nerwowy [23].

Zespół chorobowy po gorączce krwotocznej Ebola

Niektóre tkanki ustroju mogą być siedliskiem wirusa przez okres wielu miesięcy po stwierdzeniu wyleczenia chorego. Wirus może przetrwać w takich miejscach, jak: oczy, gruczoły sutkowe czy jądra, długo po tym, gdy przestaje być wykrywalny we krwi. Wskazuje się także na psychiczne i fizyczne dolegliwości u ozdowieńców, które mogą trwać przez wiele lat po eliminacji wirusa z krwioobiegu. Wykazano między innymi, że nowo odkryty wariant zespołu chorobowego po EVD, obejmujący uszkodzenia narządu wzroku i stawów, jest wywołany obecnością żywego wirusa Ebola, namnażającego się w płynach ustrojowych, właśnie w tych mniej dostępnych miejscach. Około połowa ozdowieńców w Afryce Zachodniej odczuwa przewlekłe dolegliwości, obejmujące między innymi bóle stawów i zapalenie oka, które może prowadzić nawet do utraty wzroku. Wyrażana jest obecnie opinia, iż bezobjawowi ozdowieńcy, często żyjący i pracujący w swym środowisku bez nałożonej izolacji, stanowią potencjalny rezerwuuar wirusa. Ryzyko transmisji wirusa z płynu z gałki ocznej i innych organów wydaje się bardzo niskie, jednak na obecnym poziomie wiedzy nie można go całkowicie wykluczyć. Przy wciąż rosnącej liczbie ozdowieńców w Afryce Zachodniej istnieje ryzyko pojawiania się nowych ognisk choroby, których źródłem mogą być osoby, które ograniczyły, ale nie wyeliminowały zakażenia całkowicie w przeszłości. U jednego z ozdowieńców zidentyfikowano replikującego się wirusa w jednej z gałek ocznych, chociaż wcześniej wirusa już nie wykrywano. Badane próbki łez i błony zewnętrznej oka dały wynik negatywny, co oznacza, że pacjent nie stwarzał ryzyka rozprzestrzeniania się choroby podczas przypadkowych kontaktów. U ozdowieńca stwierdzono także psychiczne i fizyczne następstwa EVD [24].

W dniu 9 października 2015 roku w Wielkiej Brytanii zgłoszono niezwykle późne powikłanie u ozdowieńca. Przypadek dotyczył pielęgniarki, u której zdiagnozowano EVD w dniu 29 grudnia 2014 roku, po powrocie z Sierra Leone do Glasgow. Pacjentka była leczona osoczem ozdowieńca i eksperymentalnym lekiem. Została uznana za wolną od wirusa Ebola w dniu 24 stycznia 2015 roku. Konieczne są zatem dalsze badania, aby w pełni zrozumieć mechanizm i skutki ponownego pojawienia się RNA wirusa u pacjentki po ponad 8 miesiącach od wyleczenia. Aktualnie można tylko domniemywać, czy leczenie pacjentów z EVD przy użyciu osocza ozdowieńców może wpłynąć na odpowiedź immunologiczną i zdolność eliminacji wirusa. Być może prowadzone badania kohortowe dostarczą więcej informacji na temat powikłań u ozdowieńców oraz długoterminowych rokowań [25].

Przypadki bezobjawowego zakażenia

Wiele zgromadzonych dotychczas obserwacji wskazuje, że niektóre infekcje wirusem Ebola mają przebieg bezobjawowy. Uwagę zwracają zwłaszcza wyniki dwóch badań przeprowadzonych po epidemii EVD. W jednym wykazano, że aż 71% osób seropozytywnych nie przechodziło EVD; w innym badaniu stwierdzono, że blisko połowa (46%) osób, które miały bliski kontakt z pacjentami zakażonymi wirusem Ebola, było seropozytywnych, mimo braku objawów choroby. Uważa się za mało prawdopodobne, aby osoby bezobjawowe były zakażne, natomiast wydaje się, że mogą one nabyć odporność ochronną, co jest istotne z epidemiologicznego punktu widzenia [26].

Inaktywacja

Wirusy mogą przetrwać, znajdując się w płynie lub w suchym materiale przez wiele dni. Wykazano, że wiriony ulegają inaktywacji pod wpływem promieniowania gamma, ogrzewania przez 60 minut w temperaturze 60°C lub w temperaturze wrzenia przez 5 minut. Są wrażliwe na podchloryn sodowy (wybielacz) i inne środki dezynfekcyjne. Zamrażanie lub chłodzenie nie inaktywuje wirusa Ebola [27]. Stwierdzono także skuteczność technologii redukcji patogenów (PR, *pathogen reduction*) z zastosowaniem ryboflawiny i światła ultrafioletowego (UV+RB). W badaniu przeprowadzonym w Stanach Zjednoczonych wykazano, że technika ta pozwoliła na zmniejszenie stężenia EBOV do poziomu niewykrywalnego, zarówno w osoczu, jak i w pełnej krwi (redukcja

odpowiednio $0 \geq 2,8-3,2 \log$ oraz $\geq 3,0 \log$) bez zmniejszania stężenia przeciwciał ochronnych [28]. Opracowanie skutecznych procedur redukcji biologicznych czynników chorobotwórczych jest ważne nie tylko dla bezpieczeństwa dawców, lecz przede wszystkim ze względu na użyteczność przy przygotowaniu bezpiecznych przetoczeń osocza od ozdowieńców. Osocze pobrane od takich osób, zaraz po uzyskaniu wyniku negatywnego badań molekularnych, zawiera wysokie stężenie przeciwciał neutralizujących, dzięki czemu znajduje zastosowanie do leczenia osób zakażonych. Ostatnio także wykazano skuteczność techniki PR opartej na amotoksaleniu S59 i naświetlaniu UVA do przygotowania osocza od ozdowieńca. Osocze takie zastosowano z powodzeniem u zakażonego EBOV pacjenta. Stwierdzono, że w trakcie całej procedury następuje tylko nieznaczny spadek stężenia przeciwciał neutralizujących [29].

Diagnostyka

Należy podkreślić, że wirusy Ebola zaklasyfikowano do 4. najwyższego poziomu bezpieczeństwa biologicznego (BSL-4, *biosafety level 4*, grupa ryzyka 4) i praca z nimi, zwłaszcza w przypadku pracowników ochrony zdrowia, wymaga szczególnych środków ograniczających rozprzestrzenianie i barier ochronnych [27].

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) w 2014 roku wydała tymczasowe wytyczne dotyczące diagnostyki laboratoryjnej EVD. W dokumencie zawarto między innymi informacje o pobieraniu próbek do badań, zalecenia dotyczące bezpieczeństwa biologicznego laboratoriów i diagnostyki laboratoryjnej [30].

Diagnostyka laboratoryjna

- Dla wczesnego wykrywania wirusa Ebola w przypadkach możliwych (podejrzanych) lub prawdopodobnych zalecane są badania wirusowego RNA lub antygeny wirusa.
- Przypadki potwierdzone laboratoryjnie to takie, w których wykryto wirusa metodami bezpośrednimi, czyli stwierdzono RNA wirusa metodą RT-PCR i/lub wykryto antygen EBOV za pomocą swoistego testu i/lub wykryto przeciwciała IgM anty-EBOV.
- Dwa ujemne wyniki testu RT PCR, wykonanego w co najmniej 48-godzinym odstępie, są wymagane, aby pacjent bez objawów klinicznych mógł zostać wypisany ze szpitala [30].

Szybkie metody diagnostyczne wirusa Ebola

We wrześniu 2014 roku WHO przedstawiła procedurę awaryjną w ramach Planu Kwalifikacji Wstępnej do szybkiej oceny metod diagnostycznych EBOV w krajach dotkniętych chorobą, a pierwsza metoda diagnostyczna została zaakceptowana w listopadzie tego samego roku. W tym samym miesiącu WHO wezwała producentów do opracowania dla punktów opieki szybkich i łatwych w użyciu metod diagnostycznych, które byłyby lepiej przystosowane do stosowania w krajach dotkniętych Ebolą, gdzie w dużym stopniu brakuje infrastruktury medycznej i przeszkolonego personelu. Eksperti w dziedzinie diagnostyki, producenci testów, WHO, Fundacja na Rzecz Nowych Innowacyjnych Metod Diagnostycznych (FIND, *The Foundation for Innovative New Diagnostics*) oraz organizacja „Lekarze Bez Granic” wspólnie dostrzegli konieczność przyspieszenia opracowania, a następnie produkcji i wdrażania odpowiednio dostosowanych i szybkich testów do diagnostyki Eboli. W wyniku spotkania w grudniu 2014 roku WHO zatwierdziła do awaryjnego stosowania 7 metod diagnostycznych:

OraQuick® Ebola Rapid Antigen Test Kit (Cadaveric Oral fluid and Whole Blood) wyprodukowany przez OraSure Technologies, Inc (marzec 2016 r.);

RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0, opracowany przez *Altona Diagnostics GmbH* (listopad 2014 r.);

Antigen Rapid Test Kit, ReEBOV™, opracowany przez *Corgenix* (luty 2015 r.);

Liferiver™ Ebola Virus (EBOV) Real Time RT-PCR Kit, wyprodukowany przez *Shanghai ZJ BioTech Co., Ltd.* (kwiecień 2015 r.);

— *Xpert® Ebola Test* wyprodukowany przez *Cepheid AB* — Solna, Sweden (maj 2015 r.);

— *FilmArray™ Biothreat-E*, opracowany przez *BioFire Defence LLC.* (sierpień 2015 r.);

SD Q Line Ebola Zaire Ag, opracowany przez *SD Biosensor Inc.* (sierpień 2015 r.) [31].

Pierwszy szybki test wykrywający wirusa Ebola

Szybki test wykrywający antygen wirusa Ebola — *ReEBOV Antigen Rapid Test Kit* (*Corgenix, USA*) został zakwalifikowany przez WHO jako pierwszy do użytku w krajach dotkniętych epidemią Eboli. Test był oceniany w ramach procedury Awaryjnej Oceny i Użytku WHO, ustanowionej w celu zapewnienia minimalnej jakości, bezpieczeństwa i skuteczności produktów diagnostycznych w kontekście stanu zagrożenia epidemiologicznego wywołanego przez EVD. Badania kwasów nukleinowych (NAT)

charakteryzują się większą czułością, przy zachowaniu wysokiej swoistości, jednak ich wykonanie jest skomplikowane i wymaga posiadania laboratorium z doświadczonym i dobrze wyszkolonym personelem. Co więcej, czas wykonania badania jest długi i waha się w zakresie 12–24 godzin. W przypadku *ReEBOV Antigen Rapid Test Kit*, który opiera się na wykrywaniu białka wirusa Ebola, wynik jest dostępny już po 15 minutach. Czułość kliniczna oceniana w odniesieniu do wyników testów NAT dla *ReEBOV Antygen Rapid Test Kit* wynosi około 92%, natomiast swoistość szacuje się na 85%. Mimo gorszej skuteczności w porównaniu z testami wykorzystującymi metody molekularne niezwykle istotną zaletą szybkiego testu jest łatwość jego wykonania, gdyż nie wymaga on energii elektrycznej. A zatem może z powodzeniem być stosowany w zakładach opieki zdrowotnej niższego szczebla lub w jednostkach mobilnych. Jeśli to tylko możliwe, zaleca się, aby wyniki *ReEBOV Antygen Rapid Test Kit* były potwierdzane przy użyciu zatwierdzonego przez WHO testu NAT [32].

Zalecenia dotyczące bezpieczeństwa biologicznego laboratoriów

- I. Zalecenia dotyczące bezpieczeństwa biologicznego dla laboratoriów **z odpowiednim stopniem bezpieczeństwa biologicznego** na poziomie BSL-3/BSL-4, prowadzących badania diagnostyczne EVD:
 - Izolacja wirusa powinna być wykonywana wyłącznie w laboratorium kategorii BSL-4. Musi zostać zapewnione bezpieczne i w pełni kontrolowane obchodzenie się i przechowywanie izolatów wirusa oraz innych próbek, aby zapobiec ich przypadkowemu lub zamierzonemu uwolnieniu;
 - Inaktywacja próbek, w zależności od stosowanego protokołu wykrywania, powinna być wykonywana w warunkach laboratorium kategorii BSL-3;
 - Dla próbek nieinaktywowanych RT PCR i test immunoenzymatyczny (ELISA) mogą być prowadzone w laboratorium kategorii BSL-3;
 - Jeżeli próbki poddano wcześniej procedurom powodującym inaktywację wirusa i utratę jego zakaźności (np. wykonano lisę komórek), RT PCR i test ELISA mogą być wykonane w laboratorium kategorii BSL-2 [30].
- II. Zalecenia dotyczące bezpieczeństwa biologicznego dla laboratoriów **bez odpowiedniego stopnia bezpieczeństwa biologicznego** na poziomie BSL-3/BSL-4, prowadzących badania diagnostyczne EVD:
 - Próbki do badań PCR lub ELISA powinny być

przetwarzane wewnątrz komory bezpieczeństwa biologicznego klasy II (komora rękawicowa) z aktualnym certyfikatem dla wydzielonej części laboratoryjnej;

- Po inaktywacji proces usuwania próbek z komory rękawicowej oraz wszystkie inne procedury mogą być przeprowadzane w warunkach laboratorium kategorii BSL-2;
- Używanie odpowiednich środków ochrony osobistej podczas pracy z próbką przed inaktywacją: rękawice, maski ochronne typu N95 i FFP 3, maski z filtracją powietrza (PARP), a gdy nie są dostępne — pełne osłony twarzy oraz jednorazowe, nieprzepuszczalne fartuchy [30].

Wszystkie odpady stałe i ciekłe powinny być traktowane z ostrożnością i poddawane właściwej dekontaminacji. Pojemniki na próbki i powierzchnie laboratoryjne powinny być odpowiednio odkażone [30].

Przytoczone zasady bezpieczeństwa dotyczą badań diagnostycznych w kierunku EVD, jednak należy rozważyć zastosowanie podobnych zabezpieczeń w przypadku, gdy konieczne jest wykonywanie innych badań laboratoryjnych, jakie mogą się okazać konieczne w trakcie opieki medycznej nad osobą zakażoną, zwłaszcza tą z objawami klinicznymi. Przykładowo w przypadku wystąpienia objawów gorączki krwotocznej należy się liczyć z koniecznością przetoczeń składników krwi, oznaczania grupy krwi czy wykonania próby krzyżowej.

Leczenie

Dotychczas nie opracowano specyficznego sposobu leczenia ani nie dopuszczono do obrotu szczepionki przeciw EVD, wiadomo jednak, że odpowiednio wcześnie rozpoczęte leczenie może zwiększyć szanse na wyleczenie. Pacjenci z EVD są często poddawani eksperymentalnym terapiom. Podczas pierwszego spotkania konsultacyjnego WHO dotyczącego EVD uzgodniono, iż stosowanie terapii pełną krwią i surowicą ozdowieńców należy uznać za sprawę priorytetową [33]. We wrześniu 2014 roku WHO opublikowała tymczasowe wytyczne dla krajowych organów ochrony zdrowia i jednostek służby krwi: *Use of convalescent whole blood or plasma collected from patients recovered from Ebola virus disease during outbreaks*. Dokument przedstawia kolejne kroki, wymagane przy pobieraniu krwi lub osocza od ozdowieńców, przeznaczonych do transfuzji dla pacjentów we wczesnym okresie EVD, jako empiryczna metoda leczenia. Poszczególne rozdziały obejmują: wytyczne dotyczące doboru dawcy, badań przesiewowych, pobierania

krwi i obchodzenia się z jednostką krwi i osocza oraz wytyczne dotyczące przetaczania krwi pełnej lub osocza od ozdrowieńców [34].

Krew i jej składniki

Krwiodawstwo odgrywa istotną rolę także w pozyskiwaniu składników krwi stosowanych do leczenia osób zakażonych EBOV. Takim składnikiem stosowanym jeszcze w trakcie poprzednich epidemii jest osocze pozyskiwane od ozdrowieńców. Już pierwsze analizy wykazały, że zastosowanie tego rodzaju leczenia sprawia, że przeżywalność zakażonych jest większa w porównaniu z osobami nieleczonymi [35]. Jednak, jak pokazują niektóre wyniki badań na większej liczbie pacjentów, podawanie osocza z przeciwciałami neutralizującymi nie zawsze przynosi poprawę przeżywalności w porównaniu z grupą kontrolną. Podkreśla się, że rozbieżności w ocenie skuteczności tej strategii terapeutycznej mogą być związane ze zróżnicowanym mianem tych przeciwciał w używanym osoczu. Ten czynnik nie był dotychczas analizowany w kontekście skuteczności osocza od ozdrowieńców [36].

Osocze

W 2015 roku w Gwinei analizowano skuteczność leczenia ozdrowieńców osoczem. Były to badania porównawcze, nierandomizowane, przeprowadzone na grupie 84 pacjentów w różnym wieku (od < 5 do ≥ 45 lat), w tym również kobiet w ciąży, leczonych osoczem ozdrowieńców. Grupę kontrolną stanowiło 418 pacjentów hospitalizowanych w tym samym centrum medycznym 5 miesięcy wcześniej, lecz nieleczonych osoczem. Osocze podawano w dniu rozpoznania lub do 2 dni po rozpoznaniu EVD (2 kolejne transfuzje po 200–250 ml osocza zgodnego w układzie ABO). W grupie tej objawy choroby występowały przez krótszy okres niż w grupie kontrolnej. W okresie 3–16 dni po rozpoznaniu ryzyko zgonu wyniosło 31% w grupie osób leczonych osoczem i 38% w grupie kontrolnej. U 84 pacjentów z potwierdzonym EVD przetoczenie osocza ozdrowieńców (z nieznanym poziomem przeciwciał neutralizujących) w objętości do 500 ml nie wiązało się z istotną poprawą przeżywalności. Poziom przeciwciał neutralizujących EBOV w osoczu dawcy może być ważny dla skuteczności tej terapii, co wykazano w badaniach z udziałem innych ssaków naczelnych. Nie można było niestety określić poziomu przeciwciał neutralizujących w osoczu dawcy przed transfuzją, ponieważ testy neutralizacji przeciwciał EBOV (*EBOV plaque-neutralization assays*) wymagają do-

stępu do laboratorium o poziomie bezpieczeństwa biologicznego BSL-4. Laboratoria takie są obecnie niedostępne w krajach dotkniętych chorobą, a przesyłanie próbek krwi za granicę w celu ich zbadania nie było możliwe w chwili przygotowywania raportu z tych badań. Poziom przeciwciał jest często niski u niektórych pacjentów podczas wczesnej rekonwalescencji, co mogło spowodować osłabienie efektu leczenia osoczem ozdrowieńców. Wobec niejasności co do skuteczności terapii osoczem od ozdrowieńców, uważa się, że konieczne jest przeprowadzenie analizy zależności między poziomem przeciwciał neutralizujących EBOV w osoczu a czasem przeżycia pacjentów. Częstość podawania osocza ozdrowieńców, która wykazywałaby największą skuteczność, nie jest znana. Być może wymagane jest powtórne podawanie osocza w większych objętościach niż te stosowane w badaniu. Nie można wykluczyć, iż u niektórych pacjentów leczenie osoczem ozdrowieńców będzie bardziej korzystne. Interesująca jest obserwacja dotycząca dzieci w wieku poniżej 5 lat z EVD, u których rokowanie przebiegu zakażenia jest niekorzystne. O ile ryzyko zgonu w grupie kontrolnej było wysokie, to 4 spośród 5 leczonych osoczem ozdrowieńców przeżyło. Mimo iż kobiety w ciąży z EVD również miały złe rokowanie, 6 z 8 leczonych osoczem przeżyło. Pacjenci ci mogą również odnosić korzyść z czynników krzepnięcia obecnych w osoczu [37].

Krew pełna

Od grudnia 2014 roku do kwietnia 2015 roku rząd Sierra Leone we współpracy z WHO prowadził badania nad zastosowaniem do leczenia EBOV krwi pełnej ozdrowieńców (CWB, *convalescent whole blood*). W badaniach wzięło udział 69 pacjentów; 44 osoby zgodziły się na leczenie CWB, a 25 osób nie wyraziło zgody na transfuzję. Wszyscy pacjenci otrzymali rutynowe leczenie stosowane w przypadku zakażenia EBOV (otrzymywali wlewy dożylnie płynów, witaminy, leki przeciwgorączkowe, leki przeciwbólowe, antybiotyki i leki przeciwmalarijne). Krew podawano w ciągu 24 godzin od przyjęcia pacjenta do ośrodka. Przetaczano jedną jednostkę krwi pełnej (450 ml) w czasie 1–4 godzin. Krew pochodziła od dawców, którzy wyleczyli się z EVD co najmniej 3 miesiące przed donacją. Jedna z 44 osób leczonych CWB wycofała się z badania, 31 — wyzdrowiało, a 12 — zmarło. Śmiertelność w badanej grupie wyniosła 27,9%. W grupie, która otrzymywała rutynowe leczenie (bez CWB), śmiertelność oszacowano na 44% (zmarło 11 osób). Pacjenci leczeni CWB potrzebowali średnio 10,6 ±

$\pm 3,4$ dnia, aby wyzdrowieć, podczas gdy w grupie kontrolnej $12,23 \pm 4,8$ dnia. Pacjentów uważano za wyleczonych po uzyskaniu 2 negatywnych wyników w testach PCR i braku klinicznych oznak EVD. W ciągu pierwszych 24 godzin od transfuzji CWB wiremia znacząco zmniejszyła się u tych chorych, natomiast nie zmieniła się ona istotnie w grupie kontrolnej. Mediana liczby dni do zgonu wyniosła 4 dni w grupie kontrolnej i 5 dni w grupie leczonej CWB. Wyniki tego badania wskazują, że ocena wiremii jest istotna przy przyjęciu pacjentów z EVD. W przypadku wysokiej wiremii leczenie CWB może przynieść korzyści, prowadząc do wyleczenia. Badanie to miało wiele ograniczeń, ponieważ zostało przeprowadzone w sytuacji awaryjnej. Jednym z ograniczeń było to, że nie było randomizowane, a wielkość próby była stosunkowo niewielka w porównaniu z badaniami z Gwinei. Ponadto pacjenci nie byli leczeni wyłącznie CWB. Krew ozdrowieńców była stosowana z rutynową terapią wspomagającą, a bardzo niska liczba zgonów może być wynikiem synergistycznego efektu terapii wspomagającej i CWB [38].

Badanie to jest istotne, ponieważ przemawia za skutecznością leczenia krwią ozdrowieńców podczas epidemii EVD. Rodzaj składnika krwi zastosowanego w tym badaniu różni się od tego, ocenianego w Gwinei (osocze). Wyniki obu tych badań wykazują, że terapia krwią ozdrowieńców może być pomocna podczas przyszłych epidemii EBOV [38].

Leki

Zidentyfikowano tylko trzy produkty, które wykazują działanie *in vitro* (działają w testach próbkowych), a także dają 100-procentową ochronę u zakażonych małp: ZMAPP (koktajl przeciwciał monoklonalnych), małe inhibitory RNA oraz antysensowne fosforodiamidowe oligomery morfolinowe, wszystkie skierowane przeciw EBOV. Nie wiadomo jednak, czy są one bezpieczne i skuteczne u ludzi zakażonych wirusem Ebola, a dostępność do nich jest bardzo ograniczona i są używane jedynie w ramach badań klinicznych. Sporządzono krótką listę leków, które stosowano w innych jednostkach chorobowych, a które mogą zostać dodatkowo rozpatrzone do wykorzystania podczas leczenia EVD. Lista obejmuje między innymi favipirawir, brincidofovir, toremefin i interferony. Są one bardziej dostępne, ale brakuje klinicznych dowodów na ich skuteczność wobec EBOV (badania kliniczne jeszcze trwają). Testowanie tych leków na zwierzętach zakażonych wirusem jest utrudnione przez fakt, iż muszą one być wykonane w labora-

toriach o stopniu bezpieczeństwa BSL-4, których liczba jest nieduża. Dodatkowo, każde z nich może badać tylko niewielką liczbę zwierząt w jednym czasie [39]. Pełna lista leków rozpatrywanych do badań lub leczenia pacjentów zakażonych wirusem Ebola (*Categorization and prioritization of drugs for consideration for testing or use in patients infected with Ebola*) znajduje się na stronie internetowej WHO pod adresem http://who.int/medicines/ebola-treatment/2015-0116_TablesOfEbolaDrugs.pdf [40]. Światowa Organizacja Zdrowia stworzyła również tymczasowy wykaz leków podstawowych i niezbędnych do leczenia przypadków Eboli (*Interim list of WHO essential medicines necessary to treat Ebola cases based on existing guidelines*): http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/medicines_ebola_17nov.pdf?ua=1 [41].

Szczepionka

Dotychczas opracowano co najmniej 15 szczepionek (w Ameryce Północnej, Europie, Rosji i Chinach). Dwie firmy rozpoczęły badania kliniczne na ludziach we wrześniu 2014 roku. Obie szczepionki są obecnie w II/III fazie badań prowadzonych w trzech krajach dotkniętych Ebolą [42].

Wyniki badania nad skutecznością szczepionki rVSV-ZEBO opublikowano w grudniu 2016 roku. W badaniu tym wzięło udział 11 841 mieszkańców Gwinei. Szczepienia prowadzono metodą pierścieniową, to znaczy że po znalezieniu potwierdzonego przypadku Eboli badacze kontaktowali się ze wszystkimi osobami z najbliższego kręgu chorego (rodzina, sąsiedzi, znajomi i opiekunowie chorego). Około połowie z tych osób podano szczepionkę. U żadnej z 5837 osób, które otrzymały szczepionkę, nie stwierdzono EVD po 10 dniach lub dłużej po podaniu szczepionki. Wśród tysięcy osób, które nie otrzymały szczepionki, wystąpiły 23 przypadki EVD [43].

Epidemiologia

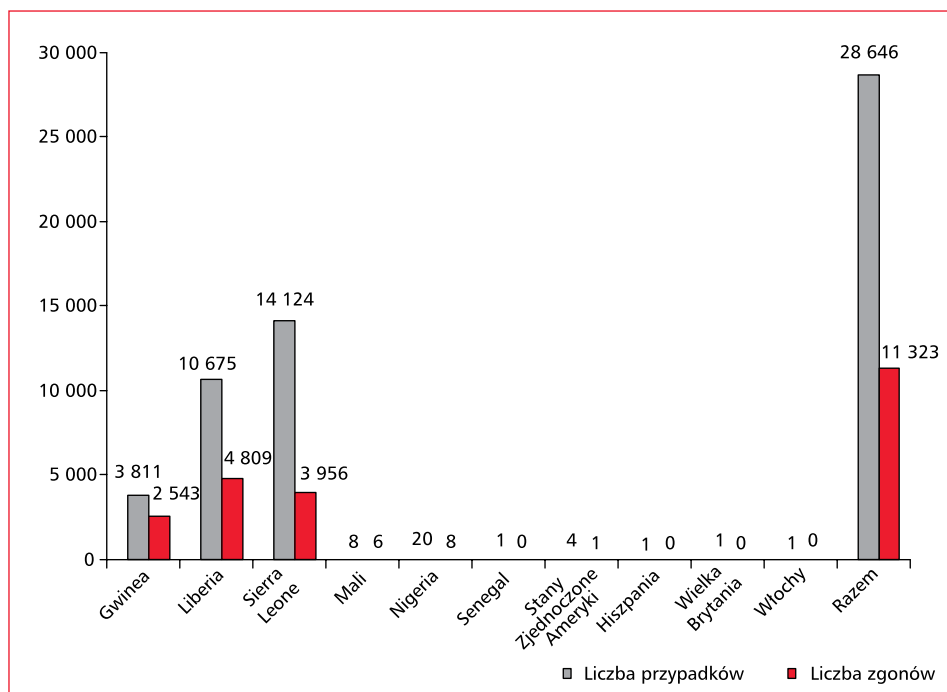
Większość dotychczasowych epidemii EVD w Afryce było spowodowanych ebolawirusami z gatunku *Zair i Sudan* (tab. 1) [44]. Epidemia, która miała miejsce w latach 2013–2016, w Afryce Zachodniej została wywołana wirusem z gatunku *Zair* i była największą epidemią EVD od czasu odkrycia wirusa w 1976 roku, a jej przebieg był trudny do przewidzenia. Była to 25. z kolei epidemia EVD. Liczba przypadków zachorowań i zgonów była większa niż wszystkich wcześniejszych epidemii tej choroby razem wziętych i obejmowała obszar

Tabela 1. Chronologia wcześniejszych epidemii wirusa Ebola [44]**Table 1.** Chronology of previous Ebola virus disease outbreaks [44]

| Rok | Kraj | Gatunek wirusa Ebola | Przypadki zakażeń | Zgony | Śmiertelność |
|-------------------------------|--|----------------------|-------------------|-------|--------------|
| 2012 | Demokratyczna Republika Kongo | Bundibugyo | 57 | 29 | 51% |
| 2012 | Uganda | Sudan | 7 | 4 | 57% |
| 2012 | Uganda | Sudan | 24 | 17 | 71% |
| 2011 | Uganda | Sudan | 1 | 1 | 100% |
| 2008 | Demokratyczna Republika Kongo | Zaire | 32 | 14 | 44% |
| 2007 | Uganda | Bundibugyo | 149 | 37 | 25% |
| 2007 | Demokratyczna Republika Kongo | Zaire | 264 | 187 | 71% |
| 2005 | Kongo | Zaire | 12 | 10 | 83% |
| 2004 | Sudan | Sudan | 17 | 7 | 41% |
| 2003 (listopad- -grudzień) | Kongo | Zaire | 35 | 29 | 83% |
| 2003 (styczeń- -kwiecień) | Kongo | Zaire | 143 | 128 | 90% |
| 2001-2002 | Kongo | Zaire | 59 | 44 | 75% |
| 2001-2002 | Gabon | Zaire | 65 | 53 | 82% |
| 2000 | Uganda | Sudan | 425 | 224 | 53% |
| 1996 | Republika Południowej Afryki (przypadek zawleczony z Gabonu) | Zaire | 1 | 1 | 100% |
| 1996 (lipiec- -grudzień) | Gabon | Zaire | 60 | 45 | 75% |
| 1996 (styczeń- -kwiecień) | Gabon | Zaire | 31 | 21 | 68% |
| 1995 | Demokratyczna Republika Kongo | Zaire | 315 | 254 | 81% |
| 1994 | Wybrzeże Kości Słoniowej | Tai Forest | 1 | 0 | 0% |
| 1994 | Gabon | Zaire | 52 | 31 | 60% |
| 1979 | Sudan | Sudan | 34 | 22 | 65% |
| 1977 | Demokratyczna Republika Kongo | Zaire | 1 | 1 | 100% |
| 1976 | Sudan | Sudan | 284 | 151 | 53% |
| 1976 | Demokratyczna Republika Kongo | Zaire | 318 | 280 | 88% |

wielu krajów [45]. Pierwsze ogniska tej epidemii pojawiły się pod koniec grudnia 2013 roku w Gwinei, ale jej etiologia pozostawała niewyjaśniona aż do 21 marca 2014 roku. Powodem tej sytuacji było występowanie u osób zakażonych takich objawów, jak: biegunka, wymioty i ciężkie odwodnienie, które mylnie przypisano objawom endemicznie występującej cholery na terenach Gwinei. Gdy WHO publicznie ogłosiło wybuch epidemii na swojej stronie internetowej w dniu 23 marca, oficjalnie zgłoszono 49 przypadków choroby i 29 zgonów [46]. Do tego czasu kilka rozsianych przypadków zawleczono już z Gwinei do Liberii i Sierra Leone, ale nie zostały one wówczas wykryte i formalnie

zgłoszone WHO. Zachorowania w tych dwóch krajach, podobnie jak w Gwinei, „tliły się” przez kilka tygodni, po czym rozszerzyły swój zasięg, obejmując stolice tych krajów. Uniemożliwiło to wysledzenie łańcuchów transmisji zakażeń. Kraje Afryki Zachodniej, które (w przeciwieństwie do krajów Afryki Środkowej) nigdy nie doświadczyły występowania ognisk EVD, były niewystarczająco przygotowane na tę nieznaną i niespodziewaną chorobę na każdym poziomie, poczynając od wczesnego wykrycia pierwszych przypadkach aż do powzięcia odpowiednich działań. Lekarze i laboratoria nie mieli jakiegokolwiek doświadczenia czy wiedzy niezbędnej do prawidłowego identyfikowania osób



Rycina 1. Potwierdzone, prawdopodobne i możliwe przypadki EVD na świecie (wg stanu na 27.03.2016 r.) [49]

Figure 1. Confirmed, probable, and suspected EVD cases worldwide (up to 27 March 2016) [49]

zakazonych. Rządy państw dotkniętych epidemią nie były świadome, jak bardzo szerzenie się wirusa będzie wpływać na społeczeństwo i gospodarkę. Z kolei ludność, wśród której szerzyły się zakażenia, nie rozumiała istoty i przyczyn pojawiającej się choroby. Opór społeczeństwa był główną przeszkodą w kontrolowaniu epidemii we wszystkich trzech krajach. Przybrał on skrajną postać w Gwinei, gdzie dochodziło do aktów wandalizmu i przemocy, a nawet morderstw, wobec pracowników medycznych zaangażowanych w pomoc w walce z EBV. Byli oni oskarżani o wprowadzenie choroby do społeczności. Mieszkańcy Gwinei byli wręcz przekonani, iż członkowie ich społeczności są mordowani w celu pozyskania organów do przeszczepów. Istotne znaczenie dla braku zaufania wobec służb medycznych, szczególnie z innych krajów, miały również kulturowe wierzenia oraz obyczaje społeczności tych krajów. Pojawienie się chorób w świadomości tych społeczności nie miało natury medycznej, lecz przypisywano mu wymiar magiczny czy mistyczny i traktowano jako klątwę lub karę za popełnione grzechy. Ogromną rolę w rozprzestrzenianiu się epidemii miały obyczaje pogrzebowe, polegające między innymi na obmywaniu zwłok zmarłych przez rodzinę. Praktyki te były przyczyną 60% przypadków zakażeń EBV w Gwinei i 80% przypadków zakażeń w Sierra Leone. Podczas poprzednich

epidemii początkowym źródłem rozprzestrzeniania się infekcji były głównie placówki opieki zdrowotnej, natomiast przeniesienie choroby wskutek kontaktów w społecznościach odgrywało mniejszą rolę, za wyjątkiem niebezpiecznych praktyk pogrzebowych. W Afryce Zachodniej całe wsie opustoszały z powodu epidemii lub ucieczki ludności z miejsca zamieszkania w wyniku obawy przed zakażeniem. Ponadto, podczas poprzednich epidemii, zakażenia ograniczały się przede wszystkim do odległych obszarów wiejskich, gdzie łatwiej było kontrolować i zwalczyć ognisko choroby. Natomiast w Afryce Zachodniej to właśnie miasta, w tym stolice wszystkich trzech krajów, stanowiły epicentrum intensywnej transmisji wirusa. Epidemia w Afryce Zachodniej uwiarydlała nadzwyczaj szybkie rozprzestrzenianie się EBOV w obszarach miejskich, a zwłaszcza gęsto zaludnionych slumsach [47, 48].

Sytuacja epidemiologiczna w latach 2013–2016

Od grudnia 2013 roku do 27 marca 2016 roku odnotowano 28 646 potwierdzonych, prawdopodobnych i możliwych przypadków EVD na świecie, w tym 11 323 przypadki zgonów (ryc. 1) [49]. Śmiertelność wyniosła około 40%. Większość przypadków zakażeń (28 610) i zgonów (11 308) z powodu EVD pochodziła z trzech krajów: Liberii, Sierra Leone i Gwinei. W tym ostatnim liczba za-

chorowań była najmniejsza, natomiast śmiertelność z powodu EVD była najwyższa i wyniosła 67%. Od początku epidemii zgłoszono 881 potwierdzonych przypadków zakażenia EBOV wśród pracowników ochrony zdrowia w Gwinei, Liberii i Sierra Leone, w tym 513 zakończonych zgonem. Śmiertelność w tej grupie wynosiła około 58% [50, 51].

W marcu 2016 roku WHO ogłosiła wygaszenie ostatniego ogniska EVD w Sierra Leone, a w czerwcu 2016 roku — w Gwinei i Liberii. Oświadczenia te pojawiły się po 42 dniach (dwa cykle 21-dniowej inkubacji wirusa) po otrzymaniu 2 negatywnych wyników testów od ostatnich pacjentów z potwierdzoną wcześniejszą infekcją EBOV. Kraje te weszły w okres 90-dniowego zwiększonego nadzoru w celu zapewnienia, iż wszelkie nowe przypadki są szybko identyfikowane i zapobiega się ich dalszemu rozprzestrzenianiu [52–54].

Klasyfikacja przypadków na potrzeby zgłaszania do Unii Europejskiej

Zgłoszeniu na poziomie Unii Europejskiej są dokonywane poprzez System Wczesnego Ostrzeżenia i Reagowania (EWRS, *Early Warning and Response System*). Zgłoszeniu podlegają tylko przypadki potwierdzone. Wersja definicji przypadku Gorączki Krwotocznej Ebola (zaadaptowana do krajowego nadzoru epidemiologicznego) została opracowana przez Instytut Zdrowia Publicznego — Państwowy Zakład Higieny i Główny Inspektorat Sanitarny na podstawie rekomendacji ECDC [55].

Ocena ryzyka przeniesienia wirusa Ebola przez substancje pochodzenia ludzkiego

Ryzyko przeniesienia wirusa Ebola przez substancje pochodzenia ludzkiego (SoHO, *substances of human origin*) jest związane z obecnością EBOV we krwi, tkankach i narządach dawcy. Obecność i stężenie wirusa w narządach, tkankach, krwi i innych płynach ustrojowych zmienia się w przebiegu zakażenia. Szczytowy poziom koncentracji wirusa ma miejsce, gdy u pacjenta występuje największe nasilenie objawów choroby. Stwierdzono jednak, że wirus może zostać wykryty i wyizolowany z mleka matki i nasienia po wielu tygodniach od wyzdrowienia. Istnieją ograniczone dane pozwalające wnioskować, kiedy pacjenci stają się wiremiczni i mogą zakażać w okresie inkubacji. Uważa się, że tempo replikacji wirusa i uwalniania do płynów ustrojowych nie jest wystarczająco wysokie w fazie przedobjawowej, aby spowodować zakażenie pomiędzy osobami podczas zwykłych, codziennych kontaktów międzyludzkich. Jednak nie ma wystarczających obserwacji, aby określić dokładnie, kiedy

pojawia się wiremia po okresie inkubacji. Podczas fazy objawowej EVD, wirus jest obecny w wysokich stężeniach w każdym płynie ustrojowym, tkankach i narządach. W przypadku zgonu zwłoki pozostają wysoce zakaźne. Po ustąpieniu ostrej fazy w organizmie pacjenta może cały czas zachodzić replikacja wirusa i jego wydzielanie do płynów ustrojowych. Obecnie nadal nie dysponujemy wystarczającymi danymi, na podstawie których można by sformułować zalecenia dotyczące okresu odroczenia dla dawców SoHO w przypadku ozdowieńców. Gorączka krwotoczna Ebola charakteryzuje się pojawieniem się ostrych objawów chorobowych w czasie wiremii. Dlatego uważa się, że kwalifikacja osoby zakażonej jako dawcy SoHO jest mało prawdopodobna, gdyż zostaje ona zdyskwalifikowana z powodu manifestowanych objawów [56].

Osoby podróżujące lub mieszkańcy powracający z obszarów dotkniętych gorączką krwotoczną Ebola

Uważa się, iż odroczenie donacji na dwa okresy inkubacji powinno zapewnić rozsądny margines bezpieczeństwa donacji w przypadku dawców powracających z obszarów dotkniętych EVD. Najdłuższy okres inkubacji EVD szacuje się na 21 dni. Jednak ostatnie badania proponują wydłużenie najdłuższego okresu inkubacji do 25 dni. Wobec tego, **dawcy SoHO (osoby podróżujące lub mieszkańcy) wracający z obszarów dotkniętych EVD powinni być odroczeni na okres 2 miesięcy po opuszczeniu obszaru dotkniętego EVD** [56].

Należy zauważyć, że wszystkie dotychczasowe ogniska EVD wystąpiły na obszarach endemicznego występowania malarii w Afryce oraz, zgodnie z dyrektywą UE 2004/33/WE z 22 marca 2004 roku, bezobjawowi dawcy krwi powracający z obszarów ryzyka zakażenia malarią są odraczani (w oddawaniu krwi) na okres co najmniej 4 miesięcy. Zgodnie z dyrektywami UE, testy na malarię dla potencjalnych dawców tkanek i komórek powracających z terenów endemicznych malarii są obowiązkowe tylko w pewnych okolicznościach i nie są wcale wymagane w przypadku dawców narządów. Dlatego bezobjawowych osób podróżujących lub mieszkańców powracających z obszaru dotkniętego EVD należy zdyskwalifikować jako dawców komórek, tkanek i narządów na okres 2 miesięcy. Okres ten może być skrócony do miesiąca w przypadku pilnej potrzeby przeszczepiania narządu, pod warunkiem uzyskania wyniku negatywnego w teście amplifikacji kwasu nukleinowego (NAT) EBOV [56].

Osoby monitorowane po ekspozycji na wirusa Ebola

Osoby, które są monitorowane ze względu na historię kontaktu z pacjentem EVD lub innej ekspozycji na wirusa Ebola, powinny być bezwzględnie wyłączone z oddawania SoHO na okres 2 miesięcy od początku okresu monitorowania [56].

Osoby zakażone wirusem Ebola

Osoby z objawami zakażenia wirusem Ebola powinny być wyłączone z oddawania substancji pochodzenia ludzkiego zarówno jako żywi, jak i martwi dawcy [56].

Osoby ozdrowiałe z gorączki krwotocznej Ebola

Rekonwalescencja po EVD jest długa i często wiąże się z następstwami, takimi jak: zapalenie rdzenia kręgowego, nawroty zapalenia wątroby, psychozy lub zapalenie błony naczyniowej oka. Dane na temat okresu wirerii po wyzdrowieniu są ograniczone. Opisano przypadki obecności wirusa Ebola w mleku matki i nasieniu po tym, jak wirus przestał być obecny we krwi. Istnieje niewiele danych o wirusie Ebola w ludzkich komórkach jajowych. Ryzyko zakażenia wirusem Ebola należy uwzględnić w związku z donacją komórek rozrodczych, zarówno dla „partnera” i donacjami „innymi niż partnerskie”. Jednakże dowód na to, iż wirus Ebola może się utrzymywać przez pewien czas w organizmie człowieka po wyzdrowieniu z EVD, jest niewystarczający do określenia konkretnego okresu odroczenia dla dawców ozdrowiałych. Aktualne wytyczne przewidują **odroczenie na okres 12 miesięcy** po wyleczeniu z wirusowej gorączki krwotocznej. Zalecenie to stosuje się także do dawców, którzy wyzdrowieli z EVD. Ponadto żyjący lub zmarli dawcy SoHO powinni mieć negatywny wynik testu NAT na wirusa Ebola [56].

Donacja krwi ozdowieńca przeznaczona do leczenia poekspozycyjnego

Powyższych zaleceń nie stosuje się do donacji pełnej krwi i osocza ozdowieńców przeznaczonych do leczenia osób po ekspozycji na EBOV. Światowa Organizacja Zdrowia wydała wytyczne dotyczące takich donacji przeznaczonych do leczenia empirycznego, w których zaleca, aby tylko pacjenci z EVD, którzy zostali wypisani ze szpitala zgodnie z kryteriami WHO (czyli klinicznie bezobjawowi po miesiącu od wypisania z 2-krotnie negatywnym wynikiem testu NAT na ebolawirusa Zair), byli kwalifikowani do takich donacji [56].

Import substancji pochodzenia ludzkiego do Unii Europejskiej

Substancje pochodzenia ludzkiego nie powinny być importowane z krajów, w których panuje epidemia EVD lub krajów zagrożonych EVD ze względu na zwiększone ryzyko zakażenia wirusem Ebola [56].

Zapobieganie zakażeniom i kontrola epidemii

Prawidłowa kontrola epidemii opiera się na przestrzeganiu wielu procedur obejmujących między innymi zarządzanie przypadkiem, nadzór i śledzenie kontaktów, prawidłowe usługi laboratoryjne, bezpieczne pochówki i mobilizację społeczną. Zaangażowanie społeczne jest kluczem do skutecznej kontroli epidemii. Podnoszenie świadomości na temat czynników ryzyka zakażenia EBOV i środków ochrony osobistej, które można stosować, jest skutecznym sposobem na zmniejszenie przenoszenia wirusa wśród ludzi. Należy dążyć do rozpowszechnienia informacji dotyczącej:

- **zmniejszenia ryzyka transmisji ze zwierząt na ludzi** przez kontakt z zakażonymi owocożernymi nietoperzami i małpami oraz spożywanie ich surowego mięsa. Podczas kontaktów ze zwierzętami konieczne jest używanie rękawic i innej odpowiedniej odzieży ochronnej. Produkty pochodzenia zwierzęcego (mięso i krew) należy dokładnie gotować przed spożyciem;
- **zmniejszenia ryzyka transmisji człowiek–człowiek** przez bezpośredni lub bliski kontakt –z osobą z objawami EDV, szczególnie z ich płynami ustrojowymi. Należy używać rękawic i odpowiednich środków ochrony osobistej podczas opieki nad chorymi w domu. Konieczne jest mycie rąk zarówno po odwiedzinach u pacjentów w szpitalu, jak i po sprawowaniu opieki nad pacjentami w domu;
- **zmniejszenia ryzyka możliwej transmisji drogą kontaktów seksualnych**. Uwzględniając analizę dotychczasowych badań i stanowisko Grupy Doradczej ds. Eboli, WHO zaleca, aby mężczyźni–ozdowieńcy praktykowali bezpieczne i higieniczne kontakty seksualne przez okres 12 miesięcy od wystąpienia objawów lub do czasu, gdy badania ich nasienia na obecność wirusa Ebola dadzą 2-krotnie wynik negatywny. Należy unikać kontaktu z płynami ustrojowymi, zaleca się mycie wodą i mydłem. Światowa Organizacja Zdrowia nie zaleca izolacji kobiet i mężczyzn, którzy przebyli zakażenie wirusem Ebola, w przypadku których badania krwi dały negatywny wynik na obecność EVD [45].

Biorąc pod uwagę niepokojące informacje o utrzymywaniu się EBOV w nasieniu przez okres dłuższy niż 12 miesięcy, które opublikowano po wydaniu niniejszych wytycznych przez WHO, mężczyźni–ozdrowieńcy powinni praktykować bezpieczne i higieniczne kontakty seksualne do czasu, gdy badania ich nasienia na obecność wirusa Ebola dadzą 2-krotnie wynik negatywny;

— **środków ograniczających rozprzestrzenienia epidemii**, w tym szybkiego i bezpiecznego pochówku zmarłych, identyfikacji osób, które mogły być w kontakcie z osobą, zakażoną EBOV i monitorowania ich stanu zdrowia przez 21 dni, oddzielania osób zdrowych od chorych, aby zapobiec dalszemu rozprzestrzenieniu się choroby, higieny i utrzymania czystego środowiska [45].

Wirus Ebola jako broń biologiczna

Wirus Ebola stanowi także źródło poważnych obaw jako potencjalny czynnik biologiczny, które może zostać wykorzystany jako broń. Został on zaklasyfikowany przez amerykańskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (CDC, *Center for Disease Control and Prevention*) do kategorii A patogenów broni biologicznej (BWA, *Biological Warfare Agent*). Zostały one podzielone na trzy kategorie: od A do C. Patogeny z kategorii A przyniosłyby największe ryzyko podczas ataku bioterrorystycznego, ponieważ mogą się one łatwo rozprzestrzeniać i łatwo przenosić z osoby na osobę; ich uwolnienie może wywołać zbiorową panikę i wymagać wprowadzenia specjalnych działań na rzecz zdrowia publicznego. Laseczka wąglika, pałeczki brucelozcy, laseczka jadu kiełbasianego, pałeczka dżumy, pałeczka tularemii, wirus ospy prawdziwej i wirus Ebola posiadają największą efektywność jako potencjalna broń użyta do celów bioterrorystycznych. Innymi cechami EBOV zwiększającymi jego skuteczność w potencjalnym ataku bioterrorystycznym są: wysoka śmiertelność wśród osób zakażonych (40–50%, czasem do 90% w zależności od szczepów wirusa), brak schematów ustalonego postępowania terapeutycznego oraz brak zatwierdzonych szczepionek. Co więcej, wirus może przetrwać kilka godzin w warunkach pokojowych (między 20 i 25°C i wilgotności względnej 30–40%) na przedmiotach lub powierzchniach, zwłaszcza w ciemności. Filowirusy są w stanie przetrwać przez kilka tygodni we krwi poza organizmem lub na zanieczyszczonych powierzchniach w niskich temperaturach (4°C). Po wysuszeniu pożywki hodowlanej wirus Ebola może przetrwać w temperaturze 4°C nawet przez

ponad 50 dni. Bierze się także pod uwagę, że EBOV może zostać poddany modyfikacji (proces „uzbrajania”) w celu zwiększenia efektywności infekcji. Niestety, informacje na temat uzbrajania najprostszycy czynnikóv biologicznych w BWA są łatwo dostępne: podręczniki dotyczące namnażania i wzrostu BWA są łatwo dostępne w internecie i sprzedawane każdego roku w tysiącach egzemplarzy. Dotychczas badania nad wirusem Ebola, dotyczące jego wzrostu, przechowywania i rozprzestrzeniania, zostały już opublikowane i umożliwiają zrozumienie procesóv niezbędnych do uzbrojenia wirusa, nawet jeśli jest to skomplikowane. Jest to jednak trudny, niebezpieczny i bardzo kosztowny proces, który wymaga dysponowania laboratorium i sprzętem spełniającymi wymogi na poziomie BSL-4 oraz wysoko wyspecjalizowanych pracowników–ekspertóv z dziedziny wirusologii lub inżynierii genetycznej. Rosnąca liczba naturalnych epidemii wzbudza obawy dotyczące dostępności tego wirusa dla terrorystóv i rekrutacji ekspertóv do przygotowania i celowego wykorzystania wirusa do celóv militarnych. Zdobywanie materiału zakażonego nie jest jednak proste i wciąż trudne do przeprowadzenia w sposób niejawný. Wymaga bowiem zatrudniania osób, które będą próbowały zbierać próbki wirusa od martwych zwierząt, zakażonego pacjenta lub poprzez współpracę z personelem medycznym i potajemnego zabezpieczania materiału biologicznego. Trzeba również pamiętać o konieczności przetransportowania próbki z miejsca jej pozyskania do punktu docelowego (laboratorium na poziomie BSL-4 z zaawansowanymi urządzeniami ochronnymi, stosujące specjalne procedury zapobiegające przypadkowemu rozprzestrzenieniu się zakażenia). W kontekście potencjalnego ryzyka zastosowań terrorystycznych wirusa Ebola podkreśla się konieczność surowych kontroli diagnostyki i laboratorióv badawczych, aby zapobiec dostępowi do wirusa organizacjom terrorystycznym. Jednak wciąż wydaje się mało prawdopodobne, aby ktoś niepowołany dostał się niezauważony do laboratorium o poziomie BSL-4 w celu wykradzenia materiału biologicznego [57].

W 1993 roku japońska sekta religijna „Aum Shinrikyōna” (Najwyższa Prawda) wysłała do Zairu (obecnie Demokratyczna Republika Konga) grupę 16 osób, w tym lekarzy i pielęgniarki, na fałszywą misję medyczną, mającą na celu otrzymanie próbek do wykorzystania w ataku terrorystycznym. Ta sama grupa przeprowadziła w 1995 roku atak terrorystyczny w tokijskim metrze z wykorzystaniem gazu bojowego sarinu. Wprowadzenie wirusa Ebola do nieendemicznych obszaróv jest zagrożeniem dla bezpieczeństwa międzynarodowego i bez wątpienia

jest ono rozważane przez grupy terrorystyczne. Ponadto zagrożenie można znaleźć w programach prowadzenia wojny biologicznej niektórych państw [57].

Obecnie duże zaniepokojenie wzbudza możliwość wykorzystania wirusa Ebola, jako broni masowej zagłady, przez szerzenie globalnej epidemii. Służyć temu mogą na przykład podróże lotnicze ludzkich nosicieli celowo zakażonych wirusem. Niektóre doniesienia sugerowały możliwość wysyłania przez tak zwane Państwo Islamskie (ISIS, *Islamic State of Iraq and Syria*) grup operacyjnych w obszar epidemii EVD, które celowo miałyby wystawiać się na działanie wirusa. Wiarygodne raporty wywiadowcze wskazują jednak, iż faktycznie członkowie ISIS prowadzą badania nad BWA, natomiast EBOV nie budzi ich szczególnego zainteresowania [57].

Wydaje się, że w świetle dostępnej wiedzy ryzyko ataku bioterrorystycznego z zastosowaniem wirusa Ebola można uznać za niskie, nie można go jednak wykluczyć [57].

Podsumowanie

Wirusowa gorączka krwotoczna Ebola jest nadal ciężką, obciążoną wysoką śmiertelnością, ostro przebiegającą chorobą zakaźną. Mimo, że w warunkach naturalnych jej występowanie ograniczone jest do określonego środowiska geograficzno-klimatycznego, w dobie szybko rozwijającego się sektora przewozów lotniczych, również międzykontynentalnych, potencjalnie może stanowić zagrożenie dla populacji innych obszarów. Z uwagi na niezwykle wysoką zakaźność może stanowić olbrzymie wyzwanie dla systemów opieki zdrowotnej wielu krajów. Wydaje się, że z uwagi na ostry przebieg choroby i ograniczenie zakaźności do fazy wirerii, która jest objawowa, pobranie krwi od zakażonego dawcy jest mało prawdopodobne. Niemniej istotny jest także związek EVD z krwiolecznictwem. W leczeniu skazy krwotocznej wywołanej chorobą konieczne jest przetaczanie składników krwi, a masowe zachorowania mogą prowadzić do znacznego uszczuplenia zasobów krwi. Z kolei w leczeniu tej choroby stosuje się osocze i krew ozdrowieńców. Oprócz tego, w kontekście krwi, należy podkreślić wysoką zakaźność krwi i innych płynów ustrojowych i konieczność zachowania rygorystycznych wymogów bezpieczeństwa przy obchodzeniu się z nią w laboratorium.

Piśmiennictwo

1. Cases of Ebola Diagnosed in the United States, Centers for Disease Control and Prevention, <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/2014-west-africa/united-states-imported-case.html>.
2. Risk of transmission of Ebola virus via donated blood and other substances of human origin in the EU. 6 October 2014. TECHNICAL REPORT. European Centre for Disease Prevention and Control; 2014. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/ebola-risk-transmission-via-donated-blood-substances-human-origin-october-2014.pdf>.
3. WHO statement on end of Ebola flare-up in Sierra Leone, Media centre. World Health Organization; 2016. <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/end-flare-ebola-sierra-leone/en/>.
4. Burnouf T, Emmanuel J, Mbanya D, et al. Ebola: a call for blood transfusion strategy in sub-Saharan Africa. *Lancet*. 2014; 384(9951): 1347–1348, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61693-7, indexed in Pubmed: 25277678.
5. Folleyan MO, Brown B, Yakubu A, et al. Black market blood transfusions for Ebola: potential for increases in other infections. *Glob Health Action*. 2014; 7(1): 26356, indexed in Pubmed: 25406794.
6. Feldmann H, Geisbert TW. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*. 2011; 377(9768): 849–862, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60667-8, indexed in Pubmed: 21084112.
7. Mekibib B, Ariën KK. Aerosol Transmission of Filoviruses. *Viruses*. 2016; 8(5), doi: 10.3390/v8050148, indexed in Pubmed: 27223296.
8. Bausch DG, Towner JS, Dowell SE, et al. Assessment of the risk of Ebola virus transmission from bodily fluids and fomites. *J Infect Dis*. 2007; 196 Suppl 2: S142–S147, doi: 10.1086/520545, indexed in Pubmed: 17940942.
9. Richards GA, Murphy S, Jobson R, et al. Unexpected Ebola virus in a tertiary setting: clinical and epidemiologic aspects. *Crit Care Med*. 2000; 28(1): 240–244, indexed in Pubmed: 10667531.
10. Rodriguez LL, De Roo A, Guimard Y, et al. Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis*. 1999; 179 Suppl 1: S170–S176, doi: 10.1086/514291, indexed in Pubmed: 9988181.
11. Rowe AK, Bertolli J, Khan AS, et al. Clinical, virologic, and immunologic follow-up of convalescent Ebola hemorrhagic fever patients and their household contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *Commission de Lutte contre les Epidémies à Kikwit. J Infect Dis*. 1999; 179 Suppl 1: S28–S35, doi: 10.1086/514318, indexed in Pubmed: 9988162.
12. Mate SE, Kugelman JR, Nyenswah TG, et al. Molecular Evidence of Sexual Transmission of Ebola Virus. *N Engl J Med*. 2015; 373(25): 2448–2454, doi: 10.1056/NEJMoa1509773, indexed in Pubmed: 26465384.
13. Soka MJ, Choi MJ, Baller A, et al. Prevention of sexual transmission of Ebola in Liberia through a national semen testing and counselling programme for survivors: an analysis of Ebola virus RNA results and behavioural data. *Lancet Glob Health*. 2016; 4(10): e736–e743, doi: 10.1016/S2214-109X(16)30175-9, indexed in Pubmed: 27596037.
14. Lawrence P, Danet N, Reynard O, et al. Human transmission of Ebola virus. *Curr Opin Virol*. 2017; 22: 51–58, doi: 10.1016/j.coviro.2016.11.013, indexed in Pubmed: 28012412.
15. Mekibib B, Ariën KK. Aerosol Transmission of Filoviruses. *Viruses*. 2016; 8(5), doi: 10.3390/v8050148, indexed in Pubmed: 27223296.
16. Bannister B. Viral haemorrhagic fevers imported into non-endemic countries: risk assessment and management. *Br Med Bull*. 2010; 95: 193–225, doi: 10.1093/bmb/ldq022, indexed in Pubmed: 20682627.
17. Ebola Virus Disease (EVD) Information for Clinicians in U.S. Healthcare Settings, Clinical Presentation and Clinical Course.

- Centers for Disease Control and Prevention; 2016. <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/healthcare-us/preparing/clinicians.html>.
18. Martínez MJ, Salim AM, Hurtado JC, et al. Ebola Virus Infection: Overview and Update on Prevention and Treatment. *Infect Dis Ther.* 2015; 4(4): 365–390, doi: 10.1007/s40121-015-0079-5, indexed in Pubmed: 26363787.
 19. Woldu MA, Lenjisa JL, Tegegn TG, et al. Emerging Therapeutic Approaches to Combat the Pandemicity of the Deadly Ebola Virus. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics.* 2014; 2: 1287–1298.
 20. Helleringer S, Grépin KA, Noymer A. Ebola virus disease in West Africa--the first 9 months. *N Engl J Med.* 2015; 372(2): 188–189, doi: 10.1056/NEJMc1413884#SA2, indexed in Pubmed: 25564905.
 21. Chiappelli F, Bakhordarian A, Thames AD, et al. Ebola: translational science considerations. *J Transl Med.* 2015; 13: 11, doi: 10.1186/s12967-014-0362-3, indexed in Pubmed: 25592846.
 22. Bwaka MA, Bonnet MJ, Calain P, et al. Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. *J Infect Dis.* 1999; 179 Suppl 1: S1–S7, doi: 10.1086/514308, indexed in Pubmed: 9988155.
 23. Sagui E, Janvier F, Baize S, et al. Severe Ebola Virus Infection With Encephalopathy: Evidence for Direct Virus Involvement. *Clin Infect Dis.* 2015; 61(10): 1627–1628, doi: 10.1093/cid/civ606, indexed in Pubmed: 26197842.
 24. Ebola update (116): WHO, Scottish nurse relapse, susp. research, funding. [2] Scottish nurse in serious condition with relapse. *PROMED-mail*; 2015 <http://promedmail.org/post/>; 20151011: 3708317.
 25. Outbreak of Ebola virus disease in West Africa. Rapid risk assessment. 13th update, 13 October 2015. European Centre for Disease Prevention and Control; 2015. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Ebola-west-africa-13th-update.pdf>.
 26. Bellan SE, Pulliam JRC, Dushoff J, et al. Ebola control: effect of asymptomatic infection and acquired immunity. *Lancet.* 2014; 384(9953): 1499–1500, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61839-0, indexed in Pubmed: 25390569.
 27. Outbreak of Ebola virus disease in West Africa. Seventh update, 17 October 2014. European Centre for Disease Prevention and Control; 2014 <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/ebola-Sierra-Leone-Liberia-Guinea-Spain-United-States-risk-assessment.pdf>.
 28. Cap AP, Pidcock HF, Keil SD, et al. Treatment of blood with a pathogen reduction technology using ultraviolet light and riboflavin inactivates Ebola virus in vitro. *Transfusion.* 2016; 56 Suppl 1: S6–15, doi: 10.1111/trf.13393, indexed in Pubmed: 27001363.
 29. Geisen C, Kann G, Strecker T, et al. Pathogen-reduced Ebola virus convalescent plasma: first steps towards standardization of manufacturing and quality control including assessment of Ebola-specific neutralizing antibodies. *Vox Sang.* 2016; 110(4): 329–335, doi: 10.1111/vox.12376, indexed in Pubmed: 26766162.
 30. Laboratory diagnosis of Ebola virus disease. INTERIM GUIDELINE.19 September 2014. World Health Organization; 2014, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/134009/1/WHO_EVD_GUIDANCE_LAB_14.1_eng.pdf.
 31. Diagnostics, Ebola treatments and interventions, Medicines and health products. World Health Organization, cytowany 13.07.2016 r. http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/emp_ebola_diagnostics/en/.
 32. First Antigen Rapid Test for Ebola through Emergency Assessment and Eligible for Procurement, Ebola treatments and interventions, Medicines and health products. World Health Organization, cytowany 20. 02 2015 r http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/1st_antigen_RT_Ebola/en.
 33. Outbreak of Ebola virus disease in West Africa. Seventh update, 17 October 2014. European Centre for Disease Prevention and Control; 2014. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/ebola-Sierra-Leone-Liberia-Guinea-Spain-United-States-risk-assessment.pdf>.
 34. Use of Convalescent Whole Blood or Plasma Collected from Patients Recovered from EbolaVirus Disease for Transfusion, as an Empirical Treatment during Outbreaks. Interim Guidance for National Health Authorities and Blood Transfusion Services, Version 1.0 September 2014. World Health Organization; 2014 http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/135591/1/WHO_HIS_SDS_2014.8_eng.pdf?ua=1.
 35. Mupapa K, Massamba M, Kibadi K, et al. Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusions from convalescent patients. *International Scientific and Technical Committee. J Infect Dis.* 1999; 179 Suppl 1: S18–S23, doi: 10.1086/514298, indexed in Pubmed: 9988160.
 36. van Griensven J, Edwards T, de Lamballerie X, et al. Ebola-Tx Consortium. Evaluation of Convalescent Plasma for Ebola Virus Disease in Guinea. *N Engl J Med.* 2016; 374(1): 33–42, doi: 10.1056/NEJMoa1511812, indexed in Pubmed: 26735992.
 37. van Griensven, Edwards T, et al. de Lamballerie X. , Evaluation of Convalescent Plasma for EbolaVirus Disease in Guinea, *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, Volume: 374 Issue: 1 Pages: 33-42. : 2016.
 38. Sahr F, Ansumana R, Massaquoi TA, et al. Evaluation of convalescent whole blood for treating Ebola Virus Disease in Freetown, Sierra Leone. *J Infect.* 2017; 74(3): 302–309, doi: 10.1016/j.jinf.2016.11.009, indexed in Pubmed: 27867062.
 39. Fleck F. Tough challenges for testing Ebola therapeutics. *Bull World Health Organ.* 2015; 93(2): 70–71, doi: 10.2471/BLT.15.020215, indexed in Pubmed: 25883398.
 40. Categorization and prioritization of drugs for consideration for testing or use in patients infected with Ebola. World Health Organization 15 January 2015. http://who.int/medicines/ebola-treatment/2015-0116_TablesOfEbolaDrugs.pdf.
 41. Interim list of WHO essential medicines necessary to treat Ebola cases based on existing guidelines. 07 November 2014. World Health Organization; 2014, http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/medicines_ebola_17nov.pdf?ua=1.
 42. Vaccines, Ebola treatments and interventions, Medicines and health products. World Health Organization cytowany:17. ; 12: 2015. http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/emp_ebola_vaccines/en/.
 43. Henao-Restrepo AM, Camacho A, Longini IM, et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). *Lancet.* 2017; 389(10068): 505–518, doi: 10.1016/S0140-6736(16)32621-6, indexed in Pubmed: 28017403.
 44. Ebola virus disease Fact sheet N°103, Updated September 2014, World Health Organization, cytowano: grudzień 2014 r., <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/>.
 45. Ebola virus disease Fact sheet N°103., Updated January 2016. World Health Organization, cytowano: luty 2016 r. , <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en>.
 46. Origins of the 2014 Ebola epidemic, One year into the Ebola epidemic. January 2015. World Health Organization.; 2015. <http://www.who.int/csr/disease/ebola/one-year-report/virus-origin/en/>.

47. Factors that contributed to undetected spread of the Ebola virus and impeded rapid containment. One year into the Ebola epidemic. January 2015. World Health Organization; 2015. <http://www.who.int/csr/disease/ebola/one-year-report/factors/en/>.
48. Guinea: The Ebola virus shows its tenacity. One year into the Ebola epidemic. January 2015. World Health Organization; 2015. <http://www.who.int/csr/disease/ebola/one-year-report/guinea/en/>.
49. World Health Organization, Ebola Situation Report – 30 March 2016, <http://apps.who.int/ebola/current-situation/ebola-situation-report-30-march-2016>.
50. Ebola Situation Report – 30 March 2016. World Health Organization; 2016. <http://apps.who.int/ebola/current-situation/ebola-situation-report-30-march-2016>.
51. Ebola Situation Report – 4 november 2015. World Health Organization; 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/192654/1/ebolasitrep_4Nov2015_eng.pdf?ua=1.
52. End of Ebola transmission in Guinea, Media centre. World Health Organization; 2016. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/ebola-guinea/en/>.
53. End of the most recent Ebola virus disease outbreak in Liberia, Media centre. World Health Organization; 2016 <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/ebola-liberia/en/>.
54. WHO statement on end of Ebola flare-up in Sierra Leone, Media centre. World Health Organization; 2016. <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/end-flare-ebola-sierra-leone/en/>.
55. Gorączka Krwotoczna Ebola – definicja przypadku (zaadaptowana do krajowego nadzoru epidemiologicznego) Wersja definicji przypadku z dnia 09 września 2014. PRZEGL EPIDEMIOLOG. 2014; 68(4): 789.
56. Risk of transmission of Ebola virus via donated blood and other substances of human origin in the EU. 6 October 2014. TECHNICAL REPORT. European Centre for Disease Prevention and Control; 2014. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/ebola-risk-transmission-via-donated-blood-substances-human-origin-october-2014.pdf>.
57. Cenciarelli O, Gabbarini V, Pietropaoli S, et al. Viral bioterrorism: Learning the lesson of Ebola virus in West Africa 2013-2015. Virus Res. 2015; 210: 318–326, doi: 10.1016/j.virusres.2015.09.002, indexed in Pubmed: 26359111.