

FILOVIRUSES – A MYSTERY OF XX CENTURY

S. V. NETESOV

History of discovery of filoviruses, chronology of their outbreaks, the virion structure and the genome map are described. The current situation of vaccine preparation and treatment development are considered. The main unsolved problems pertinent to the study of these viruses are discussed.

Описана история открытия и хронология вспышек заболеваний, вызванных филовирусами. Рассмотрено строение этих вирусов и их геномов. Изложена современная ситуация с получением вакцины против вируса и лечением вызванной инфекцией болезни, а также основные, не решенные до сих пор проблемы, связанные с изучением этих вирусов.

ФИЛОВИРУСЫ – ЗАГАДКА XX ВЕКА

С. В. НЕТЕСОВ

Новосибирский государственный университет

Филовирусы были открыты уже в те времена, когда человечество имело в своем арсенале вакцины против главных инфекционных заболеваний: оспы, полиомиелита и кори. Тогда казалось, что наступающая эра антибиотиков и вакцин уже в ближайшем будущем не оставит на своем пути ни одного вредного для человека микроба. Однако первые неожиданные вспышки в 1967 году болезни Марбург и в 1976 году болезни Эбола были поучительным уроком ученым и врачам. До сих пор эти вирусы во многом являются загадкой природы: неизвестен их природный резервуар, неизвестны причины вспышек этих заболеваний, уникальна структура их вирионов и картина вызываемых ими болезней. Наконец, весьма скромны успехи в разработке вакцин и методов лечения вызываемых ими болезней несмотря на интенсивное более чем двадцатилетнее их изучение.

Это семейство вирусов, поражающих человека и обезьян, получило название от латинского слова “filamentous” – длинный, протяженный в связи с уникальной для вирусов человека формой их вирионов в виде длинных цилиндрических палочек. Семейство в настоящее время собираются разделить на два вида: Эбола-вирусы и Марбург-вирусы. Вирусы Марбург и Эбола – одни из самых патогенных и смертоносных для человека. Смертность при заболевании вирусом Марбург достигает 25–30% от числа заболевших, а при заболевании вирусом Эбола – до 80–90%. Вирус Рестон, вызывающий при заражении гибель у подавляющего числа макак, для человека, по всей видимости, неопасен. Лишь вирус бешенства, дальний родственник филовирусов, превосходит их по смертности, достигающей в этом случае практически 100% при попадании в кровь и отказе или невозможности срочно ввести вакцину.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И СЛУЧАИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

На рис. 1 схематично изображена карта Центральной Африки с обозначением мест основных вспышек заболеваний, вызванных филовирусами. Следует отметить, что этот район Африки вообще знаменит и другими уникальными инфекционными заболеваниями, такими, как вирусная лихорадка Ласса, желтая лихорадка и лихорадка долины Рифт. Наконец, именно здесь наиболее высока встречаемость среди населения вируса ВИЧ-1, который является основной причиной СПИДа, синдрома приобретенного иммунодефицита. На карте показана

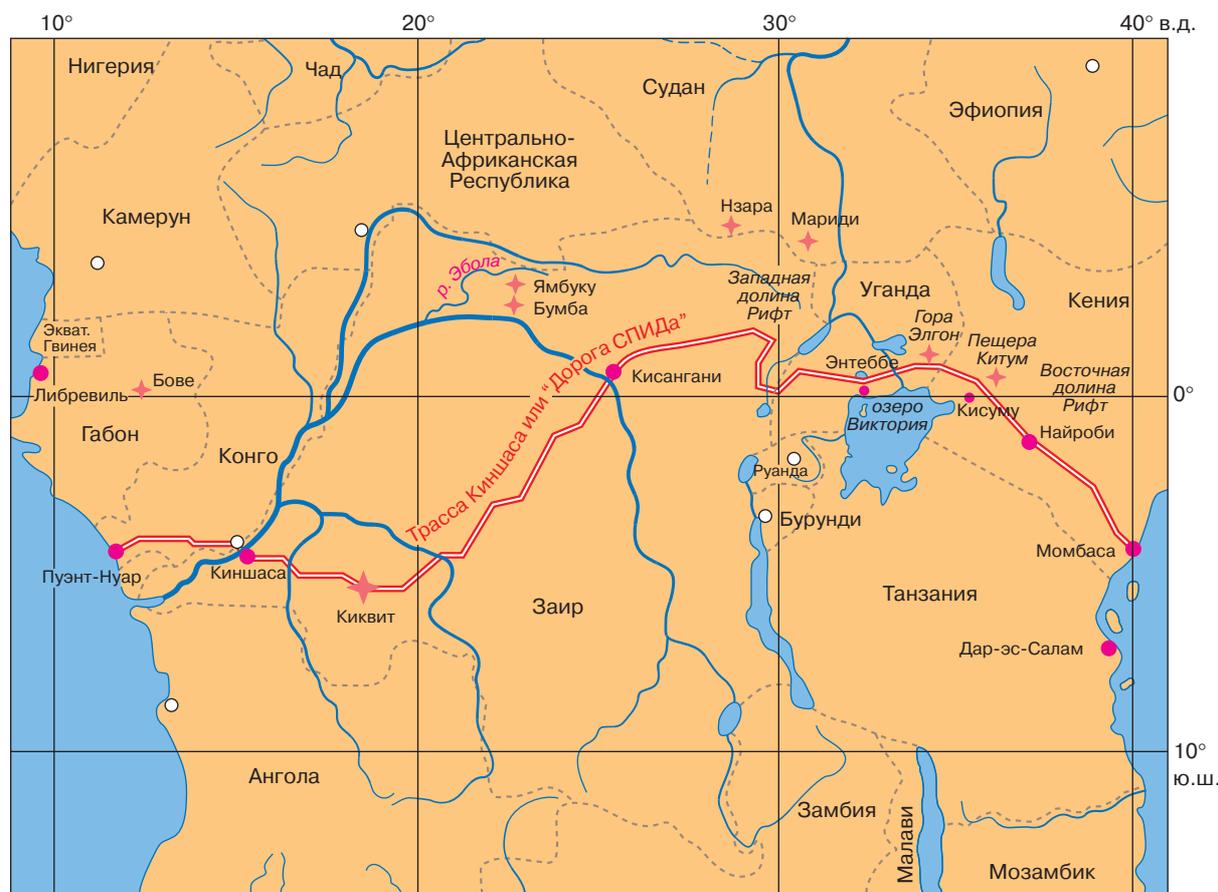


Рис. 1. Карта Центральной Африки с обозначением мест основных вспышек заболеваний филловирусами. Эта область Африки богата экзотическими болезнями. Показаны также и ареалы распространения вируса лихорадки долины Рифт

так называемая автострада Киншаса, у которой есть второе название — дорога СПИДа, потому что в крови у большинства «кормящихся» на дороге проституток обнаруживается этот вирус. Кроме того, в некоторых странах региона до 9% населения (почти каждый десятый) инфицировано этим вирусом.

Вирус Марбург. В 1967 году практически одновременно в Марбурге и Франкфурте (Германия), а также в Югославии заболели работники фармацевтических заводов, занятые в процедуре забора почек от экспортированных из Африки (из Уганды, район озера Виктория, см. рис. 1) обезьян вида *Scorpius aethiops* (культура клеток почек до сих пор используется в некоторых странах для производства вакцин, в основном против полиомиелита). Болезнь проходила в виде геморрагической лихорадки, причем заболела и часть медицинского персонала, участвовавшего в лечении заболевших. Всего заболел 31 человек, из них семеро умерли. Путем пассивирования проб крови больных на культурах клеток и животных (морских свинок) был выделен возбудитель вирусной природы, который не был ан-

тигенно близок ни одному из известных вирусов. Этот вирус получил название Марбург в честь города в Германии, где он был впервые обнаружен.

Следующий случай болезни произошел в 1975 году в Зимбабве: заболел и через 12 дней умер путешественник. От него заразились его спутница и медсестра, обе они выжили. Затем случаи заболеваний были отмечены в 1980 и 1987 годах в Кении (трое заболевших, двое умерли), причем заражение во всех этих случаях, судя по всему, произошло около горы Элгон (см. рис. 1), недалеко от места отлова обезьян, которые явились источником заболевания в Германии и Югославии в 1967 году. Ни в одном из случаев, происшедших в Африке, не удалось обнаружить источник заражения. Тщательные исследования местности, в которой произошло заражение, и отловленных там животных не выявили наличия вируса. В 1999 году заболевание вирусом Марбург опять появилось в Демократической Республике Конго.

Вирус Эбола. В июле 1976 года от странной скоротечной болезни умер сторож склада сырья хлопковой фабрики в небольшом поселке Нзара на юге

Судана (см. рис. 1). Болезнь сопровождалась обильными кровотечениями. Через несколько дней после этого умерли еще двое человек, работавших на фабрике в том же помещении. Вероятно, от этих двух больных возбудитель распространился не только по поселку, но и в соседнем городе Мариди, где он начал распространяться среди пациентов городской больницы и членов их семей. Более того, интенсивное лечение больных путем инъекций медикаментов, переливанием крови и других процедур повлекло распространение инфекции также и среди медицинского персонала. Смертность составила 53% от числа заболевших, что вдвое выше смертности от болезни Марбург. Врачи и жители города были настолько напуганы, что многие из них убежали в джунгли, что, может быть, и остановило эпидемию. Про эту вспышку специалисты из Всемирной организации здравоохранения узнали, когда она практически уже закончилась.

В сентябре того же года аналогичная вспышка произошла в северном Заире, в деревнях, расположенных на берегах небольшой реки Эбола (см. рис. 1). Заболевание было очень похоже по клинической картине на наблюдавшееся в Судане, однако смертность в этом случае была намного выше — до 88%. Первым больным был школьный учитель, заразившийся, судя по всему, от употребления полусырого мяса больной обезьяны. Он попал в церковную больницу, где из-за отсутствия нужного оборудования (было всего несколько шприцев) практиковалось многократное применение шприцев для инъекций без стерилизации. Это и послужило причиной распространения инфекции среди больных, членов их семей и медперсонала. Распространение заболевания усугублялось специфическим ритуалом захоронения, при котором женщины, входящие в состав семьи, должны были лично привести тело в порядок голыми руками. Более того, одну из заболевших медсестер, бельгийку по национальности, решили перевезти в столицу страны Киншасу, где она умерла в одной из лучших частных больниц несмотря на применение всех известных методов лечения. От нее заразилась медсестра, попавшая в другую больницу, в которой и начался следующий виток эпидемии. Дело дошло до того, что президент Заира направил войска для установления карантина как в самой столице, так и в районе эпидемии, а правительства европейских стран всерьез рассматривали вопрос о прекращении полетов в Заир. С целью выяснения природы возбудителя и ликвидации эпидемий Всемирной организацией здравоохранения были привлечены лучшие эпидемиологи и вирусологи США, Бельгии, Англии и Франции. Возбудитель вскоре был идентифицирован как вирус, родственник вирусу Марбург; назвали его по имени реки Эбола. Эпидемию удалось остановить лишь путем применения строгих карантинных мер, наведении порядка в обращении со шприцами и в соблюдении правил санитарии в больницах, а также изменив ри-

туал захоронения умерших с целью сделать его безопасным для окружающих. В итоге эпидемий в Судане и Заире заболели 550 человек, из которых умерли 430 человек.

Осенью 1976 года произошел случай лабораторного заражения вирусом Эбола в Англии, к счастью, больной выздоровел. В 1977 году был выявлен единственный, закончившийся смертью случай заболевания в Заире, в местечке, расположенном более чем в 300 км от первых очагов заболевания. Тщательное расследование обнаружило постфактум еще два смертельных случая болезни и, кроме того, выявило по проведенному анализу крови случай несмертельного заболевания у врача в 1972 году, считавшийся ранее вызванным вирусом желтой лихорадки. В 1979 году небольшая эпидемия случилась в Судане, практически в том же месте, где и в первый раз; из 34 заболевших 22 человека умерли. После этого болезнь Эбола не наблюдалась почти 15 лет.

Поздней осенью 1994 года в Кот-д'Ивуар заразилась вирусом Эбола женщина, ученый из Швейцарии. Ее срочно доставили на родину, и там, к счастью, вылечили. Источником заражения, судя по всему, явились трупы умерших от этой болезни шимпанзе, которые она изучала.

В 1995 году весной правительство Заира попросило Всемирную организацию здравоохранения отправить экспертов для расследования непонятной эпидемии в городе Киквит, расположенном в 400 км к востоку от столицы страны Киншасы. Срочно выехавшие эксперты в считанные часы выяснили — инфекция вызвана вирусом Эбола. Предположительно первый случай болезни произошел в деревне с рабочим склада хлопкоперерабатывающей фабрики (аналогия со случаем в Судане 1976 года). Эпидемия началась еще зимой в окрестностях города и распространялась вначале медленно, но когда больные были перевезены в Киквит, город с 600-тысячным населением, то ввиду плохого снабжения больницы шприцами и неполного соблюдения санитарных правил инфекция начала распространяться с ужасающей быстротой. Эксперты ВОЗ были извещены и прибыли уже на этой стадии эпидемии. Были приняты жесткие карантинные меры вплоть до оцепления больницы, блокирования города войсками. Правительства многих стран на этот период прекратили все транспортные сообщения с Заиром. Всего за время эпидемии заболели 316 человек, из которых умерли 245 (в это число включены и 90 умерших сотрудников медперсонала). В 1995—1996 годах произошли несколько вспышек заболевания недалеко от местечка Бове в Габоне. Первичное заражение было вызвано употреблением жителями одной из деревень мяса больной обезьяны. Из 60 заболевших 45 умерли.

В ноябре 1996 года случай инфекции вирусом Эбола был обнаружен в Южно-Африканской Республике у врача, вернувшегося из Габона и принимавшего

участие в лечении больных. От него заразилась медсестра больницы. Врач выздоровел, медсестра умерла.

Вирус Рестон. В 1989 году ветеринары карантинного пункта города Рестон (Вирджиния, США), где проходили обследование ввезенные из-за рубежа для исследований обезьяны, обнаружили эпидемию геморрагической лихорадки среди обезьян. Срочно проведенное обследование выявило заражение вирусом, похожим на вирус Эбола. Было принято решение об уничтожении всех обезьян сначала в одном помещении здания, а затем и в остальных, поскольку инфекция продолжала распространяться. Вирус оказался неопасным для людей (он был выявлен у четверых служителей, но никто из них не заболел), но в процессе выяснения этого властям пришлось срочно ввести неординарные санитарные меры, поскольку от Рестона до крупных городов Вашингтон и Балтимор всего несколько десятков километров. Обезьяны были ввезены из Филиппин, причем одновременно в три карантинных пункта США, остальные два расположены в Эллисе (Техас) и Пенсильвании. В двух последних пунктах случаев заболеваний аналогичной природы не наблюдалось. Сходные вспышки среди импортированных обезьян, вызванные таким же возбудителем, случились в 1992 году в Италии, и в 1996 году в Эллисе (Техас, США). Заболеваний среди людей также не было.

СИМПТОМЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ЛЮДЕЙ (на примере вируса Эбола)

Вирусы вызывают сильную геморрагическую лихорадку (болезнь с высокой температурой, множественными наружными и внутренними кровоизлияниями). После инкубационного периода, который составляет обычно от 4 до 10 дней, болезнь начинается внезапно и сразу с сильными головными болями, лихорадкой, высокой температурой, болями в мышцах, слабостью, конъюнктивитом, замедленным сердцебиением. Эти первые признаки похожи на симптомы дизентерии или желтой лихорадки, что вводило врачей в заблуждение. В дальнейшем состояние больного ухудшается, проявляясь в виде фарингита, тошноты, поноса и рвоты. Больной впадает в протрацию, лицо становится похожим на маску. Позднее начинается стадия геморрагий – кровь продолжает течь, не свертываясь, в местах уколов, выступает через кожу, появляется на слизистых оболочках. Часто это сопровождается специфической сыпью (если сыпь начинает подсыхать, это означает хорошие шансы на выздоровление). Смерть наступает от шока, обычно на 7–9-й день болезни. Выздоровление (если оно наступает) проходит медленно и сопровождается апатией, сильной потерей веса и аппетита. Человек, как правило, не помнит своих ощущений во время болезни. Клинический лабораторный анализ показывает у

заболевших раннее возрастание количества нейтрофилов, уменьшение числа лимфоцитов и тромбоцитов. Все это сопровождается ненормальной агрегацией кровяных телец. Уровни активности ферментов печени заметно выше нормы, причем на поздней стадии болезни часто бывает желтуха.

СТРОЕНИЕ ВИРУСА И ЕГО ГЕНОМА

Вирионы этого семейства (рис. 2) многообразны по форме, встречаются сигмообразные, U-образные формы, однако основной является палочковидная форма с диаметром 80 нм и длиной от 790 нм (вирус Марбург) до 970 нм (вирусы Эбола и Рестон). При рассмотрении их поперечных срезов в электронном микроскопе обнаруживаются внутренний нуклеокапсид (комплекс нуклеиновой кислоты с белками, в основном белком NP) диаметром 50 нм, окруженный липидной оболочкой, и внутреннее пространство с малой электронной плотностью диаметром 20 нм. Такие параметры предполагают спиральную форму нуклеокапсида с пустой сердцевиной, что подтверждается и видимой продольной периодичностью вирионов с шагом 5 нм (рис. 3). На поверхности вирионов, образованной липидной оболочкой, которую вирус заимствует у клетки-хозяина, можно видеть шипы длиной 10 нм. В состав вирионов входят все кодируемые геномом вируса белки, что является обычным для большинства вирусов с негативным РНК-геномом.

Инфекционные свойства вирусов Марбург и Эбола весьма стабильны при комнатной температуре и умеренном освещении. Их можно полностью инактивировать прогреванием при 60°C в течение

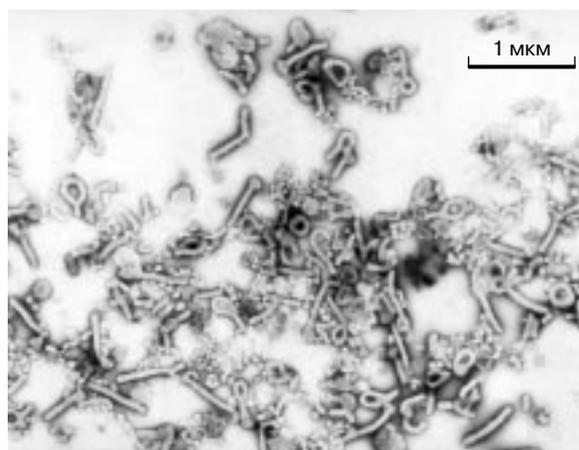


Рис. 2. Фотография очищенного препарата вируса Эбола, сделанная с помощью электронного микроскопа. Видно, что вирус полиморфен, то есть часть его частиц выглядит как палочки, часть – как кольца или тороиды, часть – как сковородки, а часть – как цифра 6. Фото любезно предоставлено Л.В. Колесниковой и Е.И. Рябчиковой (ГНЦ ВБ «Вектор»)

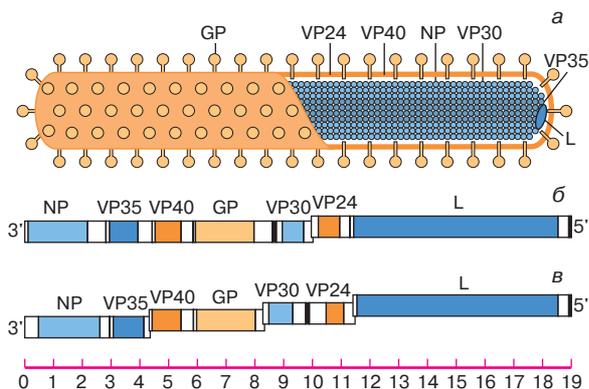


Рис. 3. Приведены схема строения вириона филовируса (а), карта генома вируса Марбург (б) и карта генома вируса Эбола (в). На схеме устройства вириона показано, что РНК находится в составе нуклеокапсида (или “ядра” вируса) и связана с белками NP и VP30, а белки VP40, VP24 и GP связаны с липидной мембраной. При этом основным поверхностным белком является белок GP, который образует шипики на поверхности вириона. Масштабная линейка для карты генома проградуированна в тысячах нуклеотидов

4 ч, обработкой фенолом, хлорсодержащими дезинфектантами, ультрафиолетовым или гамма-облучением.

Генетический материал вируса представлен одноцепочечной неинфекционной РНК негативной полярности, что означает неспособность этой цепи РНК выступать в качестве матрицы для синтеза белка. РНК имеет молекулярную массу $4,2 \cdot 10^6$ дальтон, что соответствует длине примерно в 19 200 нуклеотидов и 1,1% массы всего вириона.

Полные нуклеотидные последовательности геномов вирусов Эбола и Марбург определены несколько лет назад российскими, германскими и американскими учеными. В плюс-цепи РНК (она комплементарна геномной РНК) выявлены семь рамок трансляции белков. Строение генома вируса Марбург приведено на рис. 3. Оно сходно со строением геномов вирусов бешенства и кори, однако имеет некоторые особенности.

Каждый из белков филовирусов кодируется своей собственной матричной РНК. В свою очередь, эти матричные РНК считываются с минус-цепи вирионной РНК с помощью вирусспецифической РНК-полимеразы, кодируемой геном L.

ВИРУСНЫЕ БЕЛКИ

Гликопротеин (GP) является единственным поверхностным белком вириона. Его тримеры образуют шипы на поверхности вириона и отвечают, по видимому, за первичное присоединение вируса к клетке. Этот белок сильно модифицирован (в отличие от большинства аналогичных белков других ви-

русов) остатками олигосахаридов. Российскими исследователями недавно было выяснено, что один из участков этого белка похож по структуре и свойствам на фрагменты белков вирусов иммунодефицита человека и животных. Предполагается, что это является одной из причин необычно высокой патогенности филовирусов.

Внутренний белок VP40 является одним из основных по содержанию в вирионе белков. Он, по всей видимости, выстилает внутреннюю поверхность липидной мембраны и связан с ней. Одновременно он является наружным белком нуклеокапсида — “вирусного ядра”.

Внутренний белок VP24 также связан с липидной мембраной. Функция его неизвестна, но, по последним данным, он может играть роль при “раздевании” вируса в процессе его проникновения в клетку.

Белок нуклеопротеин (NP) имеет ярко выраженный положительный заряд и связан в вирионе непосредственно с РНК.

Внутренний белок VP30 является минорным белком вириона, функция его неизвестна.

Внутренний белок VP35, по-видимому, играет регуляторную роль при размножении вирусного генома.

Полимераза (L-белок) — самый большой по размеру белок вируса. Его функция — синтезировать матричные РНК с минус-цепи вирионной РНК, плюс-цепь вирионной РНК на матрице минус-цепи и на поздней стадии саму вирионную РНК на матрице плюс-цепи. Предполагается, что некоторые другие вирионные белки также принимают участие в этих процессах.

ДИАГНОСТИКА

По внешним признакам эта болезнь в начальной фазе похожа на грипп, малярию или тиф, а на более поздних стадиях — на тяжелую форму дизентерии, с которой ее и спутали вначале во время вспышки в Заире в 1995 году. Поэтому только лабораторная инструментальная диагностика может дать правильный ответ. Наиболее надежны иммунофлуоресцентный и иммуноферментный методы, основанные на выявлении вирусных белков-антигенов (в основном белки GP и VP24) в пробе крови больного с помощью специальным образом меченых антител: в первом случае с помощью флуоресцентных красителей, а во втором с помощью фермента пероксидазы. Эти методы дают возможность поставить диагноз в течение нескольких часов с момента взятия пробы, несложны в исполнении и, кроме того, позволяют обойтись минимумом оборудования.

ПРОФИЛАКТИКА

К сожалению, удовлетворительных вакцинных препаратов против этих вирусов не разработано до сих пор. Поэтому единственным способом профилактики инфекции для медперсонала является

защита кожных покровов (перчатки) и органов дыхания (маски или защитные костюмы). Кроме того, все исследования этих вирусов и подобных им по опасности для человека следует проводить в специально оборудованных помещениях и зданиях с высшим уровнем физической (P-4) и биологической (BSL-4) защиты. Такая защита включает в себя следующие основные устройства:

- система для поддержания небольшого разрежения воздуха в рабочих помещениях по сравнению с наружной средой – это позволяет полностью исключить возможность выхода наружу зараженного в случае аварии воздуха;
- система для фильтрации всего выходящего из этих помещений воздуха с целью очистки воздуха от всех частиц, могущих нести на себе вирусы;
- системы для обработки перегретым до 130°C паром всех жидких и твердых отходов из рабочей зоны;
- специальные герметичные рабочие костюмы вместе с системой подачи в них кондиционированного воздуха;
- специальные рабочие шкафы для работы с вирусами;
- другие системы и устройства.

Именно так оборудованы все исследовательские лаборатории мира, в которых ведутся работы с опасными вирусами и бактериями. Сходным образом должны быть оборудованы и лаборатории в инфекционных больницах и сами больницы. Больница в городе Киквит (Заир), где произошла последняя крупная вспышка заболевания вирусом Эбола, к сожалению, не обладала таким оборудованием, что и явилось одной из причин широкого распространения инфекции.

НЕРЕШЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ

Несмотря на двадцатилетнее изучение этих вирусов в ведущих лабораториях мира, до сих пор не удалось найти ответа на многие связанные с ними вопросы:

- какие живые существа являются природными хозяевами этих вирусов?
- почему возникают вспышки этих заболеваний?
- каким образом и где заразились самые первые больные во время эпидемий?

- почему неэффективны в случае этих вирусов вакцинные препараты, полученные по технологиям, успешно апробированным на других возбудителях?

- что является причиной высокой смертности от этих вирусов?

Ответы на вопросы ученые целенаправленно ищут много лет, но ключевых результатов до сих пор нет. Кроме того, набор довольно странных обстоятельств, сопутствовавших началу всех эпидемий в Африке, придал ореол мистики всему связанному с этими вирусами. Может быть, именно поэтому полудокументальная книга о вирусах Ричарда Престона “Горячая зона” стала бестселлером в США в 1994 году, а снятый по ее мотивам фильм “Эпидемия” – одним из лидеров видеопроката во всем мире.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вирусология: В 3 т. / Под ред. Б.Филдса, Д. Найпа. М.: Мир, 1989.
2. Preston R.M. The Hot Zone. N.Y.: Random House, 1994.
3. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней: В 2 т. / Под ред. В.И. Покровского. М.: Медицина, 1993.
4. Fields Virology / Ed. B.N. Fields et al. Philadelphia; N.Y.: Lippincott-Raven Publ., 1996.
5. Жданов В.М., Гайдамович С.Я. Общая и частная вирусология. М.: Медицина, 1982.
6. Лурия С., Дорнелл Дж., Балтимор Д., Кэмпбелл Э. Общая вирусология. М.: Мир, 1981.

* * *

Сергей Викторович Нетесов, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор НИИ молекулярной биологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии “Вектор”, руководитель лаборатории молекулярной биологии РНК-содержащих вирусов того же института, лауреат премии правительства РФ 1998 года. Область научных интересов – вирусология, молекулярная биология. Основные исследования связаны с изучением структуры и функций РНК-содержащих вирусов, разработкой генноинженерных противовирусных вакцин. Автор более 120 научных публикаций.