

©Borgis

*Krzysztof Pyrc

Ludzkie koronawirusy

The human coronaviruses

Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków
 Dziekan Wydziału: prof. dr hab. Zbigniew Madeja
 Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków
 Dyrektor Centrum: prof. dr hab. Kazimierz Strzałka

Słowa kluczowe

koronawirus, zakażenia układu oddechowego, epidemiologia

Key words

coronavirus, respiratory tract infections, epidemiology

Adres/address:

*Krzysztof Pyrc
 Zakład Mikrobiologii
 Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ
 ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków
 tel. +48 (12) 664-61-21
 fax +48 (12) 664-69-02
 k.a.pyrc@uj.edu.pl

WSTĘP

Koronawirusy przez lata znajdowały się na uboczu głównego nurtu badań w wirusologii i medycynie, ponieważ panowało przekonanie, że wywołują łagodne przeziębienie, które bez żadnej interwencji ustępuje w ciągu kilku dni. Brak metod diagnostycznych oraz skutecznej terapii dodatkowo pogłębiał pogląd, że patogeny te mogą być interesujące badawczo, jednak *per se* nie stanowią problemu medycznego. Pojawie-

Streszczenie

Pierwsze wzmianki o ludzkich koronawirusach pochodzą z lat 60. XX wieku, kiedy to udało się wyizolować i opisać dwa patogeny – HCoV-229E oraz HCoV-OC43. Koronawirusy przez lata znajdowały się na uboczu głównego nurtu badań w wirusologii i medycynie, ponieważ te dwa gatunki wywołują łagodne przeziębienie, które bez żadnej interwencji ustępuje w ciągu kilku dni. Dopiero początek XXI wieku przyniósł światu epidemię choroby wywołanej przez nieznaną wcześniej, wysoce zakaźny gatunek koronawirusa SARS (ang. *severe acute respiratory syndrome*). Szczęśliwie, dzięki zastosowanym środkom zaradczym oraz naturalnej sezonowości występowania koronawirusów, już po kilku miesiącach wirus zniknął z ludzkiej populacji. Epidemia przyczyniła się do zintensyfikowania prac badawczych, które doprowadziły w następnych latach do identyfikacji i opisanie kolejnych, niskopatogennych ludzkich koronawirusów – ludzkiego koronawirusa NL63 oraz HKU1. W 2012 roku, po 10 latach od epidemii SARS-CoV, pojawiły się przypadki nowej, ciężkiej i często śmiertelnej choroby układu oddechowego wywoływanej przez koronawirus MERS.

Niniejsza praca ma na celu przedstawienie podrodziny *Coronavirinae*, skupiając się na charakterystyce klinicznej oraz dostępnych danych epidemiologicznych.

Summary

First human *coronaviruses* 229E and HCoV-OC43 were isolated and described in 1960's. These viruses for years were neglected as human pathogens, as they are associated with relatively mild, self-limiting common cold. It is the beginning of the 21st century that brought us the epidemic of highly infectious severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus, causing severe respiratory disease with mortality rate reaching 10%. Fortunately, due to healthcare measures and seasonality of coronaviral infections, this pathogen disappeared after eight months. The emergence of highly virulent coronavirus increased the scientific interest in *Coronaviridae* family, and in subsequent years two low pathogenic human coronaviruses NL63 and HKU1 were discovered. Ten years after the SARS-CoV the new severe, acute disease with mortality rate exceeding 35% has been associated with emergence of novel coronavirus – Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus. Current work aims to describe the *Coronavirinae* subfamily, focusing on clinical and epidemiological aspects of infection.

nie się nowych, wysoce patogennych gatunków koronawirusów oraz zrozumienie, że wirusy te u dzieci, osób starszych oraz osób z niedoborami odporności mogą prowadzić do rozwoju poważnej, zagrażającej życiu choroby spowodowały wzrost zainteresowania tymi patogenami.

Niniejsza praca ma na celu przedstawienie podrodziny *Coronavirinae*, skupiając się na charakterystyce klinicznej oraz dostępnych danych epidemiologicznych.

Na początku warto wspomnieć, że koronawirusy nie stanowią wyłącznie problemu w medycynie człowieka. Wirusy te zakażają ptaki i ssaki, powodując liczne choroby układu oddechowego, nerwowego, narządów wewnętrznych czy układu pokarmowego. Do najbardziej znanych chorób wywołanych przez zwierzęce koronawirusy zaliczyć można zakaźne zapalenie otrzewnej u kotów, epidemiczną biegunkę świń, wirusowe zapalenie żołądka i jelit u bydła czy zakaźne zapalenie oskrzeli u ptactwa. Pierwsze wzmianki o ludzkich koronawirusach pochodzą z lat 60., kiedy to udało się wyizolować i opisać dwa patogeny – HCoV-229E oraz HCoV-OC43 – powodujące u ludzi schorzenia układu oddechowego (1, 2). Przez wiele lat pozostawały one jedynymi przedstawicielami rodzaju, zdolnymi zakażać ludzi. Dopiero początek XXI wieku przyniósł światu epidemię choroby wywołanej przez nieznaną wcześniej, wysoce zakaźny gatunek koronawirusa. Został on nazwany od nazwy zespołu chorobowego wirusem SARS (ang. *severe acute respiratory syndrome*) (3-5). Wysoka śmiertelność (~ 10%) oraz bardzo wysoka zakaźność patogenu doprowadziły do globalnej paniki, której efekty ekonomiczne można obserwować do dnia dzisiejszego. Szczęśliwie, dzięki zastosowanym środkom zaradczym oraz naturalnej sezonowości występowania koronawirusów, już po kilku miesiącach wirus zniknął z ludzkiej populacji. Epidemia przyczyniła się do zintensyfikowania prac badawczych, które doprowadziły w następnych latach do identyfikacji i opisanie kolejnych ludzkich koronawirusów – NL63 oraz HKU1. W 2012 roku, po 10 latach od epidemii SARS-CoV, ogłoszono przypadki nowej choroby układu oddechowego wywołanej przez koronawirus MERS (ang. *middle east respiratory syndrome*). Tym razem nie doszło do wybuchu ogólnoświatowej epidemii, jednakże zagrożenie nie zniknęło – liczba zakażeń i ofiar śmiertelnych wzrasta z roku na rok.

CHARAKTERYSTYKA WIRUSÓW Z RODZINY CORONAVIRIDAE

Wirusy należące do tej rodziny zostały sklasyfikowane do dwóch odrębnych podrodziny: *Coronavirinae* i *Torovirinae*. Podrodzina *Coronavirinae* po uwzględnieniu cech genetycznych poszczególnych gatunków podzielona została na cztery rodzaje: alfa-, beta-, delta- oraz gamma-koronawirusy. Najbardziej interesujące z medycznego punktu widzenia są wirusy grup alfa oraz beta, do których należą wszystkie znane gatunki zakażające ludzi.

Koronawirusy są jednymi z największych wirusów RNA pod względem długości genomu (~ 30 000 nukleotydów) oraz rozmiaru wirionu (sferyczny, 80-180 nm średnicy). Pierwsze 2/3 wirusowego RNA od strony 5' zajmuje gen kodujący białka tworzące maszynę replikacyjną. Gen ten ulega transkrypcji i translacji do pojedynczej polipeptydy, która na etapie obróbki posttranslacyjnej ulega autoproteolizie, co prowadzi do powstania zestawu dojrzałych białek odpowiedzialnych za replikację genomu, modyfikację środowiska

komórkowego czy wreszcie interferencję z naturalnymi mechanizmami obronnymi organizmu. Pozostała 1/3 genomu zajęta jest przez geny kodujące białka strukturalne S-E-M-N (S – białko odpowiedzialne za interakcję z receptorem na powierzchni komórek; E – białko płaszczka, odpowiedzialne m.in. za formowanie wirionów; M – białko błonowe, będące głównym białkiem macierzy wirusa; oraz N – białko nukleokapsydu, jedno z głównych białek wirusowych, pełniące zarówno funkcję ochronną dla dużej cząsteczki RNA, jak i aktywnie uczestniczące w modyfikacji procesów komórkowych i w replikacji wirusa). W niektórych przypadkach w genomie kodowane są również białko HE, odpowiedzialne m.in. za interakcję z komórką gospodarza, oraz białka dodatkowe, których liczba i charakter są zmienne w zależności od gatunku. Kodujące RNA wirusowe flankowane jest z obu stron regionami niekodującymi, które są kluczowe dla replikacji wirusa.

LUDZKIE KORONAWIRUSY

Lata 60.: pierwsze ludzkie koronawirusy

Pierwszy ludzki koronawirus B814 został wyizolowany w 1962 roku od dziecka z objawami przeziębienia, kiedy zastosowano hodowlę narządową pochodzącą z tchawicy (1, 6). Dokładna przynależność gatunkowa tego izolatu pozostaje jednak nieznaną, gdyż próbka zaginęła zanim dostępne były metody badawcze pozwalające na identyfikację nowych patogenów wirusowych. Dalsze badania doprowadziły do pozyskania innych izolatów klinicznych, włączając w to koronawirusy 229E i OC43, które z czasem uznane zostały za przedstawicieli odrębnych gatunków (1, 2, 7).

Obraz infekcji ludzkimi koronawirusami został nakreślony dzięki badaniom przeprowadzonym z udziałem zdrowych ochotników. Po zakażeniu koronawirusami 229E oraz OC43 u zdrowych osób wystąpiły typowe objawy przeziębienia, głównie nieżyt błony śluzowej nosa, a w pojedynczych przypadkach kaszel. Objawy utrzymywały się przez okres do tygodnia, po czym samoistnie ustępowały (1, 2, 8). Dalsze doświadczenia kliniczne potwierdziły, że wirusy te powodują stosunkowo łagodną, często subkliniczną infekcję u dorosłych. Jednakże w przypadku dzieci, osób starszych oraz osób o osłabionej odporności patogeny te mogą powodować ciężką chorobę o ostrym przebiegu (m.in. zapalenie oskrzeli, podgłośniowe zapalenie krtani, zapalenie płuc) (9-12).

W przeszłości pojawiły się hipotezy, że ludzkie koronawirusy OC43 oraz 229E mogą również powodować lub indukować rozwój innych chorób. Przykładowo, sugerowano, że HCoV-OC43 może powodować zakażenia układu pokarmowego. Nie udało się jednak w tym przypadku wykazać związku przyczynowo-skutkowego, a kolejne badania pokazały, że obecność wirusów w kale wynikała z drogi rozprzestrzeniania się wirusa, a nie aktywnej infekcji komórek układu pokarmowego (13-16). Sugerowano również, że wirus HCoV-OC43 może brać udział w rozwoju stwardnienia rozsianego (SM). Powiązania tego dokonano w oparciu o obser-

wacje, że w tkance mózgowej pacjentów z SM można wykryć koronawirusy, a miano przeciwciał specyficznych względem ludzkich koronawirusów jest znacznie wyższe u pacjentów z SM niż w grupach kontrolnych. Również w tym wypadku nie udało się jednoznacznie potwierdzić związku patogenu z chorobą (17-21).

Początek XXI wieku: epidemia SARS-CoV

Obraz ludzkich koronawirusów, jako stosunkowo niegroźnych patogenów zmienił się wraz z pojawieniem się w listopadzie 2002 roku w chińskiej prowincji Guangdong nowego gatunku ludzkiego koronawirusa – wirusa SARS-CoV (3-5). Pierwszą osobą, u której stwierdzono zakażenie, był 45-letni mężczyzna w mieście Foshan, u którego 16 listopada 2002 roku pojawiły się gorączka i objawy ze strony układu oddechowego. Transmisja wirusa pomiędzy pacjentami następowała w szybkim tempie, a w niektórych przypadkach dochodziło do masowych zakażeń. Przykładem takiego zakażenia może być przypadek 44-letniego mężczyzny, hospitalizowanego w Guangzhou 30 stycznia 2003 roku. W czasie choroby zakażył on 19 krewnych oraz ponad 50 osób należących do personelu medycznego. Dalsza transmisja i przekroczenie granic kraju stały się tylko kwestią czasu, i tak jeden z zakażonych lekarzy w czasie swojej podróży do Hong Kongu zakażył kolejne 17 osób, co umożliwiło transmisję wirusa poza granice Chin. W ciągu jednego sezonu wirus rozprzestrzenił się do 37 krajów, stwierdzono 8273 przypadków zakażenia, a dla 775 osób choroba zakończyła się zgonem (22). Co zaskakujące, 5 lipca 2003 roku, a więc niespełna 8 miesięcy od pierwszego stwierdzonego przypadku zakażenia, WHO ogłosiła eradykację wirusa SARS-CoV. Nagłe zniknięcie wirusa można tłumaczyć dwojako. Po pierwsze, zakażenia ludzkimi koronawirusami mają charakter sezonowy, z częstością najwyższą w zimie i wczesną wiosną. Można więc założyć, że zakończenie epidemii na początku lipca nie było przypadkowe. Po drugie, objawy zakażenia są stosunkowo wyraźne i pojawiają się zanim pacjent wejdzie w najbardziej zakaźną fazę choroby (ilość wirusa w wydzielinach wzrasta stopniowo w czasie choroby, osiągając maksimum po pierwszym tygodniu). Umożliwiło to zastosowanie skutecznych środków zapobiegających transmisji wirusa oraz izolację chorych (23).

Tak nagłe pojawienie się nowego ludzkiego patogenu wywołało liczne spekulacje co do jego pochodzenia. Przeprowadzone badania wykazały u osób trudniących się handlem żywymi zwierzętami wysokie miano przeciwciał specyficznych względem wirusa SARS-CoV, chociaż nie zgłaszali oni przebiecia choroby. Było to o tyle frapujące, że u osób sprzedających inne towary spożywcze nie stwierdzano podwyższonych mian przeciwciał. Szczegółowe badania zwierząt na rynku chińskim wykazały obecność wirusa w organizmach łaskunów chińskich (*Paguma larvata*) oraz jenotów (*Nyctereutes procyonoides*), których mięso w Chinach wykorzystywane jest w celach konsumpcyj-

nych. Nasunęło to przypuszczenie, że wirus mógł przenieść się na ludzi bezpośrednio z tych zwierząt (24, 25). Jednakże, zarówno stosunkowo niewielka zmienność genetyczna wirusa zwierzęcego, jak i stosunkowo rzadkie jego występowanie u tych zwierząt wskazywały, że prawdziwego rezerwuaru wirusa należy szukać gdzie indziej (26). Dalsze badania wykazały, że najbardziej prawdopodobnym naturalnym gospodarzem wirusa SARS-CoV były nietoperze. U zwierząt tych zidentyfikowano wirusy prawie identyczne pod względem genetycznym do wirusa ludzkiego (RsSHC014 oraz Rs3367). Wykazano również, że wirusy izolowane od nietoperzy były w stanie zakażać komórki ludzkie. Co więcej, u niektórych gatunków nietoperzy (rodzaj *Rhinolophus*) stwierdzono obecność przeciwciał neutralizujących, specyficznych względem białek wirusa SARS-CoV (25-27). Dostępne dane wskazują, że wirus SARS-CoV pojawił się w populacji ludzkiej na skutek transmisji od nietoperzy, przy czym pośrednimi gospodarzami mogły być również inne zwierzęta, takie jak łaskuny czy jenoty.

Chociaż od ponad 10 lat nie stwierdzono przypadków zakażenia SARS-CoV u ludzi, nieustannie pozostaje obawa, że w przyszłości wirus może pojawić się ponownie. Analiza retrospektywna archiwizowanych próbek surowic pobranych od osób zamieszkujących zagrożone tereny wykazała, że u części z nich przeciwciała specyficzne względem wirusa SARS-CoV pojawiły się na długo przed epidemią. Wynika z tego, że wirus SARS-CoV nie pierwszy raz przeniósł się na ludzi w 2002 roku. Częściową przynajmniej odpowiedź na pytanie, dlaczego wcześniej nie doszło do epidemii, dostarczył przypadek pojawienia się czterech nowych przypadków zakażenia wirusem SARS-CoV rok po pierwszej epidemii (28). U wszystkich zakażonych osób przebieg choroby był diametralnie różny niż obserwowano rok wcześniej i nie nastąpiło dalsze jej rozprzestrzenienie. Badania molekularne wykazały, że wirus, który spowodował chorobę, był inny niż ten występujący w czasie epidemii. Porównanie wirusów ludzkich i zwierzęcych ujawniło, że „nowy” wirus był znacznie gorzej przystosowany do replikacji w komórkach ludzkich (m.in. wykazywał znacznie mniejsze powinowactwo do receptora komórkowego), a jego pojawienie się było efektem ponownej transmisji od zwierzęcej (28-30). Można zatem wnioskować, że do transmisji wirusa zwierzęcego dochodziło również na przestrzeni poprzednich lat, jednak w 2002 roku doszło do adaptacji wirusa do komórek ludzkich, co sprawiło że szczep stał się bardzo wirulentny.

Wirus SARS-CoV, jak wspomniano powyżej, powodował ciężką chorobę układu oddechowego. Patogen ten zakażał urzęsione komórki górnych i dolnych dróg oddechowych oraz pneumocyty. Wirus znajdowany był również w innych organach, nerkach, wątrobie i jelitach. Istnieją liczne hipotezy dotyczące przyczyn wysokiej patogenności tego wirusa u ludzi, które zakładają, że uszkodzenia tkanki płucnej powodowane były nie tylko przez replikację patogenu, ale również

przez indukcję nadmiernej, uszkodzającej odpowiedzi immunologicznej lub zaburzenie szlaków odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy, takich jak szlak reninowo-angiotensynowo-aldosteronowy. Prawdopodobnie jednak wirulencja wirusa była efektem wspólnego oddziaływania czynników wymienionych powyżej (23, 31-34).

SARS-CoV przenosił się głównie drogą kropelkową, a pierwszym miejscem infekcji był nabłonek migawkowy górnych dróg oddechowych. Po okresie wylęgania trwającym 2-10 dni rozwijało się zapalenie płuc, z rozsiazanym uszkodzeniem pęcherzyków płucnych, złuszczeniem warstwy pneumocytów, obrzękiem płuc, wysiękiem komórek zapalnych czy tworzeniem się błon szklistych. U części pacjentów uszkodzenie tkanki płucnej postępowało i prowadziło do ostrego uszkodzenia płuc, a w ciężkich przypadkach – zespołu ostrej niewydolności oddechowej (34).

Nowe gatunki: HCoV-NL63 oraz HCoV-HKU1

Krótko po identyfikacji czynnika etiologicznego SARS opisano kolejny ludzki koronawirus, HCoV-NL63 (alfa-koronawirus) (35, 36), a rok później HCoV-HKU1 (beta-koronawirus) (37). Oba te wirusy pod względem klinicznym powodują chorobę o podobnym przebiegu jak dobrze znane koronawirusy 229E oraz OC43.

Identyfikacja ludzkiego koronawirusa NL63 została opisana w sumie trzykrotnie. Pierwszy raport był wynikiem badań grupy z Amsterdamu w Holandii i opisywał nieznaną wcześniej wirus, który wyizolowano od 7-miesięcznego dziecka z zapaleniem oskrzeli o nieustalonej etiologii. Nowy patogen został nazwany HCoV-NL63 (35). Drugi raport ukazał się kilka tygodni później, został przygotowany przez grupę z Rotterdamu w Holandii i opisywał niezależną identyfikację tego samego patogenu (nazwanego HCoV-NL) u 8-miesięcznego dziecka z zapaleniem płuc o nieznannej etiologii (38). Co jednak zaskakujące, rok po publikacji wyników przez dwie grupy badawcze ukazał się trzeci raport identyfikujący ten sam czynnik zakaźny, któremu autorzy nadali nową nazwę „New Haven” (39). Dokładna analiza danych pozwoliła stwierdzić, że wszystkie trzy raporty opisują ten sam gatunek wirusa, który zgodnie z zalecaniami ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) ostatecznie został nazwany ludzkim koronawirusem NL63 (40).

Ludzki koronawirus HKU1 odkryty został w próbce pobranej w 2004 roku od osoby w podeszłym wieku z chroniczną obturacyjną chorobą płuc. Pacjent był hospitalizowany z uwagi na gorączkę i kaszel (37).

Publikowane wyniki kolejnych badań wskazują, że zakażenia oboma patogenami są szeroko rozpowszechnione. Częstość występowania poszczególnych gatunków koronawirusów jest jednak zależna od terytorium oraz czasu izolacji i waha się dla poszczególnych gatunków (41-43). Wynika to bezpośrednio z sezonowości występowania koronawirusów, które w klimacie umiarkowanym najczęściej występują zimą

i wczesną wiosną. Częstość występowania poszczególnych gatunków koronawirusów przedstawia się następująco: HCoV-OC43 \geq HCoV-NL63 > HCoV-HKU1 \geq HCoV-229E. Analiza serologiczna wykazała, że praktycznie wszystkie osoby w wieku > 10 lat przeszły zakażenie HCoV-NL63 (średnia wieku, w którym dochodzi do zakażenia, to 3,5 roku) (44). W przypadku wirusa HKU1 dane są nieco odmienne. U dzieci < 10 lat nie wykryto specyficznych przeciwciał, natomiast najwyższy odsetek osób seropozytywnych (21,6%) dotyczy grupy wiekowej 31-40 lat. U osób starszych odsetek ten nie ulega zmianie (45). Porównując te dane z informacjami dostępnymi dla wirusów HCoV-229E i HCoV-OC43, można zauważyć, że wśród alfa-koronawirusów głównym patogenem jest HCoV-NL63, natomiast wśród beta-koronawirusów jest nim HCoV-OC43. Możliwe jest, że powstające przeciwciała neutralizujące reagują z innymi wirusami z tej grupy, co chroni przed późniejszymi zakażeniami (46).

Identyfikacja wirusów w próbkach archiwalnych oraz datowanie prawdopodobnego przeniesienia tych patogenów na ludzi wskazuje, że oba te wirusy były obecne w populacji od wielu lat. Analizując dane epidemiologiczne, zaskakujące jest, że nie wykryto ich wcześniej. Jednak żaden z dostępnych przed 2003 rokiem testów diagnostycznych, ze względu na dużą zmienność genetyczną i serologiczną w obrębie rodziny nie był w stanie wykryć wirusów HCoV-NL63 ani HCoV-HKU1 (36, 47). Dopiero rozwój nowoczesnych metod diagnostycznych, takich jak VIDISCA (ang. *virus discovery based on cDNA-amplified fragment length polymorphism*) (35, 48) czy startery uniwersalne (37) pozwoliło na identyfikację tych patogenów.

Ustalenie powiązania nowo odkrytych wirusów z chorobą było trudniejsze niż w przypadku HCoV-229E czy HCoV-OC43. Ze względów etycznych prowadzenie badań nad procesem zakażenia z udziałem zdrowych ochotników jest obecnie rzadko stosowane, a choroba powiązana z zakażeniem wirusami oddechowymi nie uzasadnia podjęcia takiego ryzyka. W związku z powyższym, wszelkie wnioski dotyczące związku pomiędzy zakażeniem koronawirusami HKU1 i NL63 a konkretną jednostką chorobową pochodzą z badań przeprowadzonych z udziałem pacjentów naturalnie zakażonych wirusami. Analiza taka jest utrudniona, ze względu na częste występowanie koinfekcji z innymi patogenami układu oddechowego.

Wykazano, że zakażenie HCoV-HKU1 u dorosłych bez innych chorób obciążających nie wymaga hospitalizacji. Jednak obraz kliniczny u dzieci, osób starszych lub pacjentów z obniżonym poziomem odporności może być diametralnie inny (42, 49-51).

W przypadku wirusa HCoV-NL63 zakażenie może prowadzić do choroby układu oddechowego lub przebiegać asymptomatycznie. Podobnie jak w przypadku koronawirusa HKU1, u dzieci, osób starszych i pacjentów z obniżonym poziomem odporności obserwowano zakażenia górnych i dolnych dróg oddechowych, włączając w to zapalenie płuc (35, 50, 52-55). HCoV-NL63

jest również głównym czynnikiem etiologicznym podłożniowego zapalenia krtań (pseudokrupu) u dzieci (52, 53, 56, 57).

Duże zainteresowanie podrodziną *Coronavirinae* po pojawieniu się SARS-CoV sprawiło, że przeprowadzono szczegółowe badania dotyczące związku zakażenia HCoV-NL63 z innymi chorobami. Analizy przeprowadzone przez grupę z New Haven, USA, wykazały, że u większości dzieci z chorobą Kawasaki (58) można było wykryć zakażenie HCoV-NL63 (54). Opublikowane dane nie znalazły jednak potwierdzenia w dalszych badaniach, w których nie stwierdzono żadnego związku choroby z zakażeniem (59, 60). Niedawno ukazał się również raport sugerujący, że to zakażenie HCoV-229E prowadzi do rozwoju tej choroby. Jednakże, wyniki nie zostały jeszcze zweryfikowane (61).

Najnowsze zagrożenie: MERS-CoV

Liczne prace z ostatnich lat pokazały, że istnieje olbrzymia grupa wirusów zwierzęcych, które potencjalnie mogą przekroczyć barierę gatunkową. Nie było w związku z tym zaskoczeniem pojawienie się w 2012 roku kolejnego odzwierzęcego koronawirusa zakażającego ludzi (62).

Wirus MERS-CoV (ang. *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) został pierwszy raz rozpoznany u pacjenta z Arabii Saudyjskiej (62). Analiza danych od pacjentów zakażonych wykazała, że nowy wirus powoduje ciężką chorobę, która w ~ 35% przypadków jest śmiertelna. Do listopada 2014 roku, zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia, zanotowano 897 przypadków zakażenia, z których 325 zakończyło się zgonem.

Przeprowadzone badania ujawniły, że wirus MERS-CoV, podobnie jak SARS-CoV jest wirusem odzwierzęcym. Ze względu na podobieństwo na poziomie genetycznym i funkcjonalnym (m.in. wykorzystanie tego samego receptora komórkowego) do wirusów występujących u nietoperzy uznano, że naturalnym gospodarzem i rezerwuarem wirusa są właśnie nietoperze (63-66). Pozostaje jednak pytanie dotyczące transmisji wirusa na ludzi. Wydaje się, że w tym przypadku ogniwem pośrednim mogą być wielbłądy jednogarbne (*Camelus dromedarius*), u których stwierdzono wysokie miana przeciwciał neutralizujących specyficznych względem wirusa ludzkiego oraz wirusowe RNA (67-72). Należy jednak pamiętać, że temat ten jest wciąż przedmiotem debaty, a dla wyciągnięcia jednoznacznych wniosków konieczne jest przeprowadzenie dalszych analiz.

Niezależnie od tego, głównym źródłem zakażenia u ludzi wydaje się być bezpośredni kontakt ze zwierzętami. Transmisja wirusa MERS-CoV pomiędzy ludźmi jest możliwa, jednak w przeciwieństwie do wirusa SARS-CoV jest stosunkowo mało wydajna i wymaga długotrwałego, bezpośredniego kontaktu z osobą zakażoną. Na Półwyspie Arabskim notuje się liczne dowody na występowanie koronawirusa MERS u zwierząt, i to właśnie w tym rejonie występuje większość przypadków zakażenia u ludzi. Natomiast w regionach,

w których transmisja odzwierzęca nie jest możliwa, częstość występowania wirusa jest znacznie mniejsza i zakażenia ograniczone są do osób powracających z miejsc występowania wirusa oraz pojedynczych przykładów transmisji między ludźmi (73, 74).

Obraz kliniczny zakażenia wirusem MERS-CoV może być bardzo różny, począwszy od infekcji asymptomatycznej do ostrej, ciężkiej choroby układu oddechowego, która kończy się śmiercią pacjenta. Początkowe objawy zakażenia są niespecyficzne i obejmują m.in. gorączkę, dreszcze, ból głowy, kaszel, duszności i bóle mięśni. Dodatkowo mogą pojawić się: ból gardła, nudności, wymioty, zawroty głowy, biegunka i ból brzucha. W kolejnej fazie choroby dochodzi do rozwoju zapalenia płuc, które może skutkować zgonem. U pacjentów często obserwowano również upośledzenie czynności nerek. Badania laboratoryjne wskazują na limfopenię, trombocytopenię czy podniesiony poziom dehydrogenazy mleczanowej. W obrazie radiologicznym stwierdza się zmiany jedno- lub dwustronne, niejednolite nacieki czy płyn w jamie opłucnej. Obecnie wirusa stwierdzano w wydzielinach układu oddechowego, kale, surowicy i w moczu (73, 75, 76).

TERAPIA I PROFILAKTYKA

W momencie pojawienia się wirusa SARS-CoV nie były dostępne praktycznie żadne leki o specyficznym działaniu przeciwwirusowym ani protokoły stosowania leków o szerokim spektrum działania. Zachorowania o ciężkim, a nawet śmiertelnym przebiegu sprawiły, że prace nad lekami i szczepionkami nabrały rozpędu. Poznano struktury krystaliczne licznych białek wirusa, opracowano całe serie specyficznych inhibitorów mało- i wielkocząsteczkowych, sprawdzające się w warunkach *in vitro* i w pojedynczych przypadkach również *in vivo*. Jednakże początkowy entuzjazm osłabł po stwierdzeniu, że zakażenia koronawirusem SARS ograniczone były do jednego sezonu. Prace nad nowymi inhibitorami nie zostały doprowadzone do etapu badań przedklinicznych/klinicznych i po dekadzie badań można stwierdzić, że nie opracowano żadnych nowych form terapii.

Obecnie w zakażeniach MERS-CoV stosowane są leki o niepotwierdzonym działaniu, zatwierdzone do stosowania w innych wskazaniach. Próbuje się np. wykorzystywać interferon w połączeniu z lopinawirem i rytonawirem, lekami zatwierdzonymi do stosowania u osób zakażonych wirusem HIV. Wybór tych leków opiera się głównie na doświadczeniach z epidemii SARS-CoV. Obecnie nie są dostępne szczepionki skuteczne w zakażeniach ludzkimi koronawirusami, jednak badania nad opracowaniem szczepionek przeciwko SARS-CoV (inaktywowany wirus, białka wirusowe, szczepionki DNA, chimeryczne wirusy, cząstki VLP) prowadzone były w warunkach *in vitro* i *in vivo* (77). Podobne badania zostały już rozpoczęte dla wirusa MERS-CoV (78, 79).

Wobec problemu nowych zakażeń koronawirusowych, bardzo interesujące wydają się dwie publikacje z 2014 roku wskazujące na możliwość leczenia infekcji

SARS-CoV i MERS-CoV z wykorzystaniem leków zatwierdzonych do stosowania w innych wskazaniach (80, 81). W pierwszej pracy, de Wilde i wsp. przebadali bibliotekę 348 leków, wskazując na cztery substancje aktywne względem koronawirusa MERS: chlorochinę (stosowana m.in. w malarii), chlorpromazynę (neuroleptyk), loperamid (lek przeciwbiegunkowy) oraz lopinawir (stosowany w zakażeniach wirusem HIV) (81). Przebadane substancje charakteryzowały się dobrymi parametrami, hamowały replikację wirusa (IC_{50}) przy stężeniach od 3 do 8 μ M. W drugiej pracy, Dyal i wsp. przebadali 290 leków, analizując ich wpływ na replikację MERS-CoV i SARS-CoV (80). W efekcie zidentyfikowano 33 substancje hamujące namnażanie MERS-CoV, 6 substancji działających na SARS-CoV oraz 27 związków aktywnych względem obu tych patogenów. Niektóre z substancji czynnych wykazały aktywność już przy bardzo niskim stężeniu. Przytoczone badania są istotne, gdyż leki te zostały już zatwierdzone do stosowania u pacjentów, a ich właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne są dobrze poznane. Głównym problemem pozostaje jednak brak możliwości potwierdzenia ich aktywności przeciwwirusowej w warunkach eksperymentalnych *in vivo* i brak doświadczenia klinicznego.

PODSUMOWANIE

Identyfikacja nowych ludzkich i zwierzęcych koronawirusów, dynamiczny rozwój diagnostyki

ki oraz pogłębione zrozumienie procesu zakażenia to niewątpliwie plon ostatnich lat. Niestety, poznanie arsenału wirusów zwierzęcych, które mogą przenosić się na ludzi i stanowią realne zagrożenie dla ich zdrowia i życia, nie przełożyło się na efektywny rozwój nowych strategii terapeutycznych w leczeniu chorób wywoływanych przez koronawirusy. Wydaje się, że przy medialnej „sławie” wirusów takich jak SARS-CoV oraz MERS-CoV świat medyczny i farmaceutyczny pominął problem kliniczny, jakim są zakażenia koronawirusami u dzieci, osób starszych oraz osób z niedoborami odporności.

Jaka będzie cena tego zaniedbania, okaże się w nadchodzących latach, jako że liczba przypadków zakażenia wirusem MERS-CoV rośnie z roku na rok. Koronawirusy już dwukrotnie pokazały, że stanowią duże zagrożenie epidemiczne dla świata i można założyć, że MERS-CoV nie jest ostatnim wysoce patogennym przedstawicielem rodziny *Coronaviridae*.

PODZIĘKOWANIA

Krzysztof Pyrc jest beneficjentem programu LIDER finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (Lider/27/55/L-2/10/2011) (KP) oraz Sonata Bis, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (UMO-2012/07/E/NZ6/01712).

PIŚMIENNICTWO

- Tyrrell DA, Bynoe ML: Cultivation of a Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures. *British medical journal* 1965; 1: 1467-1470.
- Hamre D, Procknow JJ: A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; 121: 190-193.
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS et al.: A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *The New England journal of medicine* 2003; 348: 1953-1966.
- Rota PA, Oberste MS, Monroe SS et al.: Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003; 300: 1394-1399.
- Drosten C, Gunther S, Preiser W et al.: Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *The New England journal of medicine* 2003; 348: 1967-1976.
- Kendall EJ, Bynoe ML, Tyrrell DA: Virus isolations from common colds occurring in a residential school. *British medical journal* 1962; 2: 82-86.
- McIntosh K, Dees JH, Becker WB et al.: Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1967; 57: 933-940.
- Bradburne AF, Somerset BA: Coronative antibody titres in sera of healthy adults and experimentally infected volunteers. *The Journal of hygiene* 1972; 70: 235-244.
- Bradburne AF, Bynoe ML, Tyrrell DA: Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers. *British medical journal* 1967; 3: 767-769.
- McIntosh K, Chao RK, Krause HE et al.: Coronavirus infection in acute lower respiratory tract disease of infants. *The Journal of infectious diseases* 1974; 130: 502-507.
- Nicholson KG, Kent J, Hammersley V, Cancio E: Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: comparative, prospective, population based study of disease burden. *BMJ* 1997; 315: 1060-1064.
- van Elden LJ, van Loon AM, van Alphen F et al.: Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *The Journal of infectious diseases* 2004; 189: 652-657.
- Gerna G, Passarani N, Battaglia M et al.: Coronaviruses and gastroenteritis: evidence of antigenic relatedness between human enteric coronavirus strains and human coronavirus OC43. *Microbiologica* 1984; 7: 315-322.
- Gerna G, Passarani N, Battaglia M, Rondanelli EG: Human enteric coronaviruses: antigenic relatedness to human coronavirus OC43 and possible etiologic role in viral gastroenteritis. *The Journal of infectious diseases* 1985; 151: 796-803.
- Esper F, Ou Z, Huang YT: Human coronaviruses are uncommon in patients with gastrointestinal illness. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2010; 48: 131-133.
- Risku M, Lappalainen S, Rasanen S, Vesikari T: Detection of human coronaviruses in children with acute gastroenteritis. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2010; 48: 27-30.
- Dessau RB, Lisby G, Frederiksen JL: Coronaviruses in brain tissue from patients with multiple sclerosis. *Acta neuropathologica* 2001; 101: 601-604.
- Arbour N, Day R, Newcombe J, Talbot PJ: Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *Journal of virology* 2000; 74: 8913-8921.
- Stewart JN, Mounir S, Talbot PJ: Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. *Virology* 1992; 191: 502-505.
- Sorensen O, Collins A, Flintoff W et al.: Probing for the human coronavirus OC43 in multiple sclerosis. *Neurology* 1986; 36: 1604-1646.
- Salmi A, Ziola B, Hovi T, Reunanen M: Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology* 1982; 32: 292-295.
- <http://www.who.int/csr/don/03-november-2014-mers/en/> (dostęp: styczeń 2015)
- Cheng VC, Chan JF, To KK, Yuen KY: Clinical management and infection control of SARS: lessons learned. *Antiviral research* 2013; 100: 407-419.
- Guan Y, Zheng BJ, He YQ et al.: Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 2003; 302: 276-278.
- Tu C, Cramer G, Kong X et al.: Antibodies to SARS coronavirus in civets. *Emerging infectious diseases* 2004; 10: 2244-2248.
- Kan B, Wang M, Jing H et al.: Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *Journal of virology* 2005; 79: 11892-11900.
- Ge XY, Li JL, Yang XL et al.: Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* 2013; 503: 535-538.

28. Liang G, Chen Q, Xu J et al.: Laboratory diagnosis of four recent sporadic cases of community-acquired SARS, Guangdong Province, China. *Emerging infectious diseases* 2004; 10: 1774-1781.
29. Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC: Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* 2005; 309: 1864-1868.
30. Hilgenfeld R, Peiris M: From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Antiviral research* 2013; 100: 286-295.
31. Huang KJ, Su IJ, Theron M et al.: An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients. *Journal of medical virology* 2005; 75: 185-194.
32. Glowacka I, Bertram S, Herzog P et al.: Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus NL63. *Journal of virology* 2010; 84: 1198-1205.
33. Kuba K, Imai Y, Rao S et al.: A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nature medicine* 2005; 11: 875-879.
34. Gu J, Korteweg C: Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *The American journal of pathology* 2007; 170: 1136-1147.
35. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF et al.: Identification of a new human coronavirus. *Nature medicine* 2004; 10: 368-373.
36. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L: Identification of new human coronaviruses. *Expert review of anti-infective therapy* 2007; 5: 245-253.
37. Woo PC, Lau SK, Chu CM et al.: Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of virology* 2005; 79: 884-895.
38. Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM et al.: A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 6212-6216.
39. Esper F, Weibel C, Ferguson D et al.: Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *The Journal of infectious diseases* 2005; 191: 492-498.
40. van der Hoek L, Berkhout B: Questions concerning the New Haven coronavirus. *The Journal of infectious diseases* 2005; 192: 350-351; author reply 353-354.
41. Arden KE, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM: New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *Journal of medical virology* 2005; 75: 455-462.
42. Gaunt ER, Hardie A, Claas EC et al.: Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *Journal of clinical microbiology* 2010; 48: 2940-2947.
43. Lepiller Q, Barth H, Lefebvre F et al.: High incidence but low burden of coronaviruses and preferential associations between respiratory viruses. *Journal of clinical microbiology* 2013; 51: 3039-3046.
44. Dijkman R, Jebbink MF, El Idrissi NB et al.: Human coronavirus NL63 and 229E seroconversion in children. *Journal of clinical microbiology* 2008; 46: 2368-2373.
45. Chan CM, Tse H, Wong SS et al.: Examination of seroprevalence of coronavirus HKU1 infection with S protein-based ELISA and neutralization assay against viral spike pseudotyped virus. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2009; 45: 54-60.
46. Dijkman R, Jebbink MF, Gaunt E et al.: The dominance of human coronavirus OC43 and NL63 infections in infants. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2012; 53: 135-139.
47. Pyrc K, Dijkman R, Deng L et al.: Mosaic structure of human coronavirus NL63, one thousand years of evolution. *Journal of molecular biology* 2006; 364: 964-973.
48. Pyrc K, Jebbink MF, Berkhout B, van der Hoek L: Detection of new viruses by VIDISCA. *Virus discovery based on cDNA-amplified fragment length polymorphism. Methods Mol Biol* 2008; 454: 73-89.
49. Owusu M, Annan A, Corman VM et al.: Human coronaviruses associated with upper respiratory tract infections in three rural areas of Ghana. *PLoS one* 2014; 9: e99782.
50. Jartti L, Langen H, Soderlund-Venermo M et al.: New respiratory viruses and the elderly. *The open respiratory medicine journal* 2011; 5: 61-69.
51. Kupfer B, Simon A, Jonassen CM et al.: Two cases of severe obstructive pneumonia associated with an HKU1-like coronavirus. *European journal of medical research* 2007; 12: 134-138.
52. Leung TF, Li CY, Lam WY et al.: Epidemiology and clinical presentations of human coronavirus NL63 infections in hong kong children. *Journal of clinical microbiology* 2009; 47: 3486-3492.
53. van der Hoek L, Sure K, Ithorst G et al.: Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS medicine* 2005; 2: e240.
54. Esper F, Shapiro ED, Weibel C et al.: Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *The Journal of infectious diseases* 2005; 191: 499-502.
55. Boivin G, Baz M, Cote S et al.: Infections by human coronavirus-NL in hospitalized children. *The Pediatric infectious disease journal* 2005; 24: 1045-1048.
56. Sung JY, Lee HJ, Eun BW et al.: Role of human coronavirus NL63 in hospitalized children with croup. *The Pediatric infectious disease journal* 2010; 29: 822-826.
57. Wu PS, Chang LY, Berkhout B et al.: Clinical manifestations of human coronavirus NL63 infection in children in Taiwan. *European journal of pediatrics* 2008; 167: 75-80.
58. Burns JC, Glode MP: Kawasaki syndrome. *Lancet* 2004; 364: 533-544.
59. Ebihara T, Endo R, Ma X et al.: Lack of association between New Haven coronavirus and Kawasaki disease. *The Journal of infectious diseases* 2005; 192: 351-352; author reply 353.
60. Baker SC, Shimizu C, Shiike H et al.: Human coronavirus-NL63 infection is not associated with acute Kawasaki disease. *Advances in experimental medicine and biology* 2006; 581: 523-526.
61. Shirato K, Imada Y, Kawase M et al.: Possible involvement of infection with human coronavirus 229E, but not NL63, in Kawasaki disease. *Journal of medical virology* 2014; 86: 2146-2153.
62. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM et al.: Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *The New England journal of medicine* 2012; 367: 1814-1820.
63. van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C et al.: Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio* 2012 Nov 20; 3(6).
64. De Benedictis P, Marciano S, Scaravelli D et al.: Alpha and lineage C betaCoV infections in Italian bats. *Virus genes* 2014; 48: 366-371.
65. Yang Y, Du L, Liu C et al.: Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014; 111: 12516-12521.
66. Corman VM, Ithete NL, Richards LR et al.: Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *Journal of virology* 2014; 88: 11297-11303.
67. Reusken CB, Haagmans BL, Muller MA et al.: Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *The Lancet Infectious diseases* 2013; 13: 859-866.
68. Haagmans BL, Al Dhahiry SH, Reusken CB et al.: Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: an outbreak investigation. *The Lancet Infectious diseases* 2014; 14: 140-145.
69. Drosten C, Kellam P, Memish ZA: Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *The New England journal of medicine* 2014; 371: 1359-1360.
70. Madani TA, Azhar EI, Hashem AM: Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *The New England journal of medicine* 2014; 371: 1360.
71. Chan RW, Hemida MG, Kayali G et al.: Tropism and replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus from dromedary camels in the human respiratory tract: an in-vitro and ex-vivo study. *The Lancet Respiratory medicine* 2014; 2: 813-822.
72. Raj VS, Farag EA, Reusken CB et al.: Isolation of MERS coronavirus from a dromedary camel, Qatar, 2014. *Emerging infectious diseases* 2014; 20: 1339-1342.
73. Sampathkumar P: Middle East respiratory syndrome: what clinicians need to know. *Mayo Clinic proceedings* 2014; 89: 1153-1158.
74. Al-Tawfiq JA, Memish ZA: Middle East respiratory syndrome coronavirus: transmission and phylogenetic evolution. *Trends in microbiology* 2014; 22: 573-579.
75. Al-Tawfiq JA, Hinedi K, Ghandour J et al.: Middle East respiratory syndrome coronavirus: a case-control study of hospitalized patients. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2014; 59: 160-165.
76. Brand JM, Smits SL, Haagmans BL: Pathogenesis of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *The Journal of pathology* 2014 Jan; 235(2): 175-184.
77. Zhu X, Liu Q, Du L et al.: Receptor-binding domain as a target for developing SARS vaccines. *Journal of thoracic disease* 2013; 5 (suppl. 2): S142-148.
78. Kim E, Okada K, Kenniston T et al.: Immunogenicity of an adenoviral-based Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine in BALB/c mice. *Vaccine* 2014; 32: 5975-5982.
79. Hotez PJ, Bottazzi ME, Tseng CT et al.: Calling for rapid development of a safe and effective MERS vaccine. *Microbes and infection/Institut Pasteur* 2014; 16: 529-531.
80. Dyal J, Coleman CM, Hart BJ et al.: Repurposing of clinically developed drugs for treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014; 58: 4885-4893.
81. de Wilde AH, Jochmans D, Posthuma CC et al.: Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014; 58: 4875-4884.