

GORĄCZKA KRWOTOCZNA EBOLA. IMMUNOLOGICZNE I MOLEKULARNE MECHANIZMY PATOGENEZY, DIAGNOSTYKA, EKSPERYMENTALNE METODY LECZENIA I UODPARNIANIA

Maciej Łuczkiwicz¹, Magdalena Joanna Flaga²

¹Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii UW,
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (022) 5541421, e-mail: macciej@biol.uw.edu.pl

²Akademia Medyczna w Warszawie, I Wydział Lekarski, ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa

Wpłynęło w listopadzie 2006 r.

1. Historia odkrycia wirusa. Epidemie gorączki krwotocznej Ebola. 2. Obraz kliniczny gorączki krwotocznej Ebola. 3. Przebieg infekcji. 4. Budowa i funkcje białek wirusa. 5. Diagnostyka gorączki krwotocznej Ebola. 6. Leczenie. 7. Eksperymentalne metody uodparniania czynnego. 8. Podsumowanie

Ebola haemorrhagic fever. Immunological and molecular mechanisms of pathogenesis, diagnostics, experimental methods of therapy and vaccination

Abstract: Two outbreaks of unknown haemorrhagic fever occurred in 1976 in central Africa. Mortality rate was very high, reaching 90%. Isolated virus was classified as a new member of the *Filoviridae* family and called Ebola. In the following years several new outbreaks occurred. The possibility of occurrence of this disease in developed countries and the threat of bioterrorism motivate many scientific centers to carry on the research on the mechanisms of pathogenesis trying to find effective treatment and vaccines. Experimental models using Ebola virus proteins (which do not require biosafety level 4 laboratories) have simplified investigations of viral protein functions. This review presents up-to-date knowledge about mechanisms of pathogenesis, molecular structure and function of viral proteins, rapid detection of Ebola hemorrhagic fever cases and experimental treatment as well as vaccination against this extremely dangerous disease.

1. Discovery of Ebola virus. Known Ebola haemorrhagic fever outbreaks. 2. Clinical symptoms of Ebola haemorrhagic fever. 3. Course of infection. 4. Structure and functions of viral proteins. 5. Diagnostics of Ebola haemorrhagic fever. 6. Treatment. 7. Experimental vaccines. 8. Summary

Słowa kluczowe: Ebola, *Filoviridae*, glikoproteina, krwotoki, Marburg

Key words: Ebola, *Filoviridae*, glycoprotein, haemorrhage, Marburg

1. Historia odkrycia wirusa. Epidemie gorączki krwotocznej Ebola

W czerwcu 1976 roku w południowym Sudanie w miejscowościach Nzara i Maridi wybuchła epidemia nieznanego dotąd gorączki krwotocznej (284 przypadki). We wrześniu 1976 r. podobna epidemia pojawiła się w północnym Zairze w miejscowości Yambuku (318 przypadków). Wyizolowany czynnik chorobotwórczy był wirusem bardzo podobnym do jedynego znanego dotąd przedstawiciela rodziny *Filoviridae* – wirusa Marburg, jednak z powodu różnic antygenowych sklasyfikowano go jako nowy typ i nazwano Ebola (*Ebolavirus* – EBOV) – od nazwy rzeki w Zairze, nad którą wybuchła epidemia [91, 96, 97]. Ponieważ wykazano różnice pomiędzy wirusami wyizolowanymi w Sudanie i Zairze, wyróżniono dwa podtypy: Ebola-Zaire (EBO-Z) i Ebola-Sudan (EBO-S) [9, 18, 65, 96, 97]. EBO-Z (wskaźnik śmiertelności 88%) był bardziej zjadliwy od EBO-S (wskaźnik śmiertelności 53%). Pojedynczy przypadek zakażenia EBO-Z zanotowano w 1977 w Tandala w Zairze. Analiza wykazała, że w tym rejonie wystąpiły już w 1972 r. 2 przypadki

choroby. U 7% okolicznych mieszkańców stwierdzono w surowicy krwi przeciwciała [28]. W 1979 w Nzara wybuchła kolejna, znacznie mniejsza (34 przypadki) epidemia wywołana przez EBO-S; śmiertelność sięgnęła 65%. W roku 1989 w laboratorium w Reston w USA wybuchła epidemia gorączki krwotocznej wśród małp z gatunku *Macacca fascicularis*. Małpy zabito i spalono, laboratorium zamknięto i odkażono. Wyizolowanego wirusa zaklasyfikowano jako nowy podtyp Ebola-Reston (EBO-R) [16, 96, 97]. Przypadki zachorowań wśród zwierząt doświadczalnych wywołane przez EBO-R zdarzały się jeszcze kilkakrotnie w USA i we Włoszech; dotyczyły małp przywiezionych z Filipin. EBO-R okazał się niepatogenny dla ludzi, mimo że wykrywano u nich przeciwciała. Jako jedyny z podtypów Ebola przenosił się na drodze kropelkowej. W 1994 na Wybrzeżu Kości Słoniowej zanotowano pojedynczy przypadek gorączki krwotocznej; osobą zakażoną był naukowiec, który dokonywał sekcji zwłok szympanсів. Wyizolowanego wirusa zaklasyfikowano jako kolejny podtyp: Ebola-Cote d'Ivoire (EBO-CI) [96, 97]. Przypadki choroby wywołanej przez ten podtyp obserwowano również u różnych gatunków małp.

EBO-Z pojawił się znów w 1995 w Kikwit w Zairze (315 przypadków, śmiertelność 81%) [38, 96, 97] oraz w 1996, 1997 i 2002 w Gabonie (mniejsze epidemie). W latach 2001–2003 wywołał również trzy epidemie w Kongo (dawnym Zairze), potwierdzając po raz kolejny swoją bardzo wysoką zjadliwość (śmiertelność powyżej 75%). EBO-S wywołał największą ze znanych epidemii wirusa Ebola – w latach 2000–2001 w Ugandzie (425 przypadków, w tym 224 śmiertelne) [11, 96, 97]. Od czasu odkrycia wirusa Ebola notowano również kilka sporadycznych zachorowań na terenach endemicznych oraz przypadki zakażeń w laboratoriach. Zestawienie wszystkich dotychczasowych przypadków gorączki krwotocznej Ebola przedstawia tabela I.

Wirus Ebola należy do rodziny *Filoviridae* (wirusy o nitkowatym kształcie wirionu, otoczone osłonką z podwójnej błony lipidowej), zaliczanej do *Mononegavirales* (zwierzęcych wirusów, których genomem jest pojedyncza cząsteczka RNA o ujemnej polarności) [99]. Wyróżniono się 4 podtypy (EBO-Z, EBO-S, EBO-R, EBO-CI), różniące się w niewielkim stopniu średnią długością i morfologią wirionu; w ramach każdego podtypu występuje polimorfizm wirionów. Podtypy znacznie różnią się między sobą na poziomie antygenowym. Znane szczepy EBO-Z (Mayinga-76, Zaire-76, Eckron-76, Tandala-77, Kikwit-95 i Gabon-94) wykazywały najwyższą zjadliwość (śmiertelność w czasie większych epidemii sięgała ok. 90%). Szczepy EBO-S (Boniface-

76, Maleo-79) były również bardzo zjadliwe, ale tu śmiertelność była nieco niższa i wynosiła do ok. 65%. Zanotowano pojedyncze przypadki EBO-CI (Tai Forest-94), zakończone wyzdrowieniem. EBO-R (Reston-89, Philippines-89, Siena-92, Texas-96), mimo że infekował ludzi, nie wywoływał objawów chorobowych (jedyne epidemie wywołane przez EBO-R wystąpiły wśród małp). W czasie trzydziestu lat od wyizolowania i zidentyfikowania wirusa Ebola, zanotowano łącznie 1851 przypadków u ludzi, z czego 1288 śmiertelnych; ogólny wskaźnik śmiertelności wynosi 69,5% (należy jednak pamiętać, że poszczególne podtypy znacznie różnią się zjadliwością) [9, 96–98].

Do dnia dzisiejszego nie jest znany rezerwuuar wirusa. Przepuszczalnie mogą być to owocożerne nietopierze, u których stwierdzano wysoki poziom przeciwciał, natomiast nie zaobserwowano objawów chorobowych [44]. Wirus Ebola wywołuje chorobę u różnych gatunków małp, na ludzi przenosi się sporadycznie. Do zakażenia dochodzi przez bezpośredni kontakt ze zwierzęciem lub osobą chorą. Szczególnie niebezpieczne są: krew, ślina, wydaliny; dochodzi również do zakażeń na drodze płciowej i w czasie kontaktu ze zwłokami. Z tego powodu najbardziej narażony jest personel medyczny i rodziny chorych. W epidemiach afrykańskich poważnym źródłem zakażenia były również niewystarczająco sterylizowane igły, strzykawki i inny sprzęt medyczny wielokrotnego użytku [11, 38, 91, 96, 97].

Tabela I
Znane przypadki gorączki krwotocznej Ebola [96, 97]

| Rok | Kraj | Podtyp wirusa | Liczba przypadków | Liczba przypadków śmiertelnych | Śmiertelność |
|----------------|-----------------|---------------|-------------------|--------------------------------|--------------|
| 1976 | Sudan | EBO-S | 284 | 151 | 53% |
| 1976 | Zair | EBO-Z | 318 | 280 | 88% |
| 1976 | Wlk. Brytania | EBO-S | 1 | 0 | 0% |
| 1977 | Zair | EBO-Z | 1 | 1 | 100% |
| 1979 | Sudan | EBO-S | 34 | 22 | 65% |
| 1994 | Gabon | EBO-Z | 52 | 31 | 60% |
| 1994 | Wybż. Kości Sł. | EBO-CI | 1 | 0 | 0% |
| 1995 | Liberia | EBO-CI | 1 | 0 | 0% |
| 1995 | Zair | EBO-Z | 315 | 250 | 81% |
| 1996 | Gabon | EBO-Z | 37 | 21 | 57% |
| 1996 | RPA | EBO-Z | 1 | 1 | 100% |
| 1996–1997 | Gabon | EBO-Z | 60 | 45 | 74% |
| 2000–2001 | Uganda | EBO-S | 425 | 224 | 53% |
| 2001–2002 | Gabon | EBO-Z | 65 | 53 | 82% |
| 2001–2002 | Kongo | EBO-Z | 59 | 44 | 75% |
| 2002–2003 | Kongo | EBO-Z | 143 | 128 | 89% |
| 2003 | Kongo | EBO-Z | 35 | 29 | 83% |
| 2004 | Sudan | EBO-S | 17 | 7 | 41% |
| 2004 | USA | EBO-Z | 1 | 0 | 0% |
| 2004 | Rosja | EBO-Z | 1 | 1 | 100% |
| Łącznie | | | 1851 | 1288 | |

2. Obraz kliniczny gorączki krwotocznej Ebola

Początkowe objawy są niecharakterystyczne: uczucie zmęczenia, bóle brzucha, mięśni, stawów, gardła, nudności, wymioty, biegunka. W drugiej fazie choroby występuje skaza krwotoczna: krwawe wymioty i biegunki, wybroczyny (łac. *petechiae*), krwawienia i krwo-toki wewnętrzne i zewnętrzne, nawet przez nieuszkodzoną skórę i błony śluzowe. Pojawia się zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC – *disseminated intravascular coagulation*). Utrata krwi i powstawanie ognisk martwiczych w narządach prowadzą do wstrząsu i śmierci. W przebiegu choroby charakterystyczne są również: leukopenia, małopłytkowość, objawy uszkodzenia wątroby i masywna wiremia. Nie jest znane leczenie przyczynowe; pomoc udzielana chorym polega na łagodzeniu objawów i wyrównywaniu strat płynów, elektrolitów, krwi i osoczowych czynników krzepnięcia [5, 11, 38, 91, 96, 97].

3. Przebieg infekcji

Na podstawie badań wśród ludzi zakażonych wirusem Ebola, jak również doświadczeń prowadzonych na małpach, opracowano model przebiegu infekcji. EBOV infekuje w pierwszej kolejności monocyty i komórki dendrytyczne [2, 19, 75, 87]. We wnikaniu wirusa istotną rolę odgrywa komórkowe białko DC-SIGN (*Dendritic Cell – Specific ICAM-3 Grabbing Non-tegrin*, CD209) i jego homolog L-SIGN. Są to białka błonowe typu 2, z pozakomórkową domeną C-lecycyny. Ekspresja DC-SIGN zachodzi w niedojrzałych komórkach śródłonka w wątrobie i w węzłach chłonnych. DC-SIGN bierze udział w migracji komórek dendrytycznych oraz we wczesnych etapach odpowiedzi immunologicznej – w interakcjach pomiędzy komórkami dendrytycznymi i komórkami śródłonka z limfocytami T. Obydwa białka są prawdopodobnie receptorem *cis* dla wirusa Ebola, ale mogą również funkcjonować jako receptor *trans*, umożliwiając cząstkom wirusowym wnikanie do innych komórek [2]. Koreceptorem jest prawdopodobnie FR- α (*folate receptor alpha*) – białko błonowe, wiążące cząsteczki kwasu foliowego i transportujące je do komórki [12]. Szereg prac podkreśla rolę wirusowego białka GP_{1,2} w specyficznym rozpoznaniu receptora [1, 13, 48, 49, 67]. Po sfagocytowaniu wirus znajduje się w pęcherzyku endosomalnym, gdzie w wyniku działania obniżonego pH następuje zmiana konformacji białka powierzchniowego GP, co z kolei indukuje fuzję błony komórki z otoczką wirusa [1, 49, 67]. EBOV rozprzestrzenia się z pierwotnego miejsca zakażenia za pośrednictwem monocytów i komórek dendrytycznych do regionalnych

węzłów chłonnych (głównie przez naczynia limfatyczne) oraz do wątroby i śledziony (przez naczynia krwionośne). Na wczesnym etapie infekcji wirus aktywuje monocyty i makrofagi. Początkowa aktywacja jest niezależna od replikacji wirusa wewnątrz zainfekowanych komórek; natomiast podtrzymanie aktywacji wymaga replikacji wirusa bądź dłuższego kontaktu z wirusem inaktywowanym. Sądzone, że może to świadczyć o pewnej roli niestrukturalnych białek wirusowych w zapoczątkowaniu aktywacji [75], jednak nowsze prace wykazały, że białkiem aktywującym jest GP_{1,2} w formie związanej z otoczką wirionu [87]. Żadne z białek niestrukturalnych nie aktywowało monocytów, być może białko obecne na wirionach ma inną konformację, niezbędną do aktywacji. Rola białek niestrukturalnych jest nadal dyskusyjna; przypuszcza się, że mogą one działać w tkankach będących późniejszymi celami infekcji, adsorbować przeciwciała lub blokować aktywację neutrofilii [93]. Aktywacja monocytów i makrofagów powoduje zwiększenie ekspresji genów kodujących wiele czynników wydzielanych przez te komórki: cytokiny i chemokiny prozapalne. W wątrobie i węzłach chłonnych EBOV infekuje makrofagi tkankowe (w tym komórki Kupffera w wątrobie) i komórki dendrytyczne. We wczesnej fazie infekcji EBOV aktywuje komórki dendrytyczne przez zwiększenie ekspresji INF- α i TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*). Nadekspresja TRAIL indukuje apoptozę limfocytów T, co skutkuje supresją odpowiedzi immunologicznej [21, 27]. Makrofagi nie ulegają apoptozie pod wpływem TRAIL z powodu obniżonej ekspresji TRAIL-receptora 2 [21]. Wśród czynników wydzielanych przez zainfekowane komórki wymienić należy: IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, GRO- α , MIP-1 α , MIP-2 β i MCP-1. Przyciągają one kolejne makrofagi do miejsc infekcji, ułatwiając w ten sposób wirusowi zakażenie nowych komórek [3, 21, 27, 43, 75]. Dodatkowo po ok. 6 dniach od infekcji następuje zahamowanie ekspresji MHC II [27]. W wyniku działania białka VP35 zahamowana zostaje również produkcja interferonów typu I (α i β) w zainfekowanych komórkach [6, 7]. W miarę postępu choroby wzrasta poziom wolnych rodników tlenowych uwalnianych przez zakażone makrofagi, co wywołuje apoptozę komórek NK, dodatkowo upośledzając odpowiedź immunologiczną gospodarza. Niekontrolowane, masywne namnażanie wirusa prowadzi do dalszego podwyższenia poziomu cytokin prozapalnych; powoduje to m.in. zwiększenie adhezyjności komórek i zlepianie się monocytów, co może zaburzać przepływ krwi w małych naczyniach i wyzwolić kaskadę krzepnięcia [75]. TNF- α wraz z wolnymi rodnikami uwalnianymi z zainfekowanych komórek zmniejszają adhezję plakoglobiny do komórek śródłonka naczyń. Plakoglobina jest białkiem spajającym śródłonek i jej utrata powoduje rozluźnienie

połączeń pomiędzy komórkami, a w efekcie utratę szczelności śródbłonka (*permeabilization*) [19]. Supresja odpowiedzi immunologicznej ułatwia wirusowi kolonizację komórek śródbłonka, hepatocytów i innych tkanek. Niszczenie śródbłonka przez wirusa oraz przez cytokiny i wolne rodniki wydzielane z aktywowanych i lizowanych komórek jednojądrzastych krwi sprzyja wyzwoleniu kaskady krzepnięcia. Następuje aktywacja fibrynogenowych i fibrynolitycznych szlaków, co prowadzi do zespołu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC) [19, 21, 75]. Masowość powstających zakrzepów prowadzi do szybkiego wyczerpania czynników krzepnięcia i ich inhibitorów; jednocześnie uszkodzenie komórek wątroby przez wirusy w bardzo znaczącym stopniu upośledza ich produkcję. Kombinacja uszkodzenia śródbłonka, licznych zakrzepów i wyczerpania czynników krzepnięcia prowadzi do masywnych krwotoków i do wstrząsu krwotocznego oraz MOF (*multiple organ failure* – niewydolność wielonarządowa) i ostatecznie do śmierci [21].

Na podstawie badań ludzi zakażonych wirusem Ebola, jak również doświadczeń prowadzonych na małpach, stworzono profile odpowiedzi immunologicznej dla przypadków o przebiegu łagodnym i śmiertelnym [3, 21, 27, 43, 75, 80].

Łagodny przebieg choroby charakteryzuje się wystąpieniem w fazie objawowej silnej odpowiedzi immunologicznej. Miano przeciwciał IgG anty-EBOV wyraźnie narasta w trakcie trwania fazy objawowej i fazy zdrowienia (po ustąpieniu objawów). Faza objawowa charakteryzuje się od początku wysokimi stężeniami cytokin prozapalnych: IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, GRO- α , MIP-1 α i MIP-2 β (czynniki mobilizujące układ immunologiczny); stężenia te obniżają się w trakcie zdrowienia do poziomu występującego u ludzi zdrowych. W końcowym stadium fazy objawowej w pewnym stopniu wzrastają, a następnie w fazie zdrowienia obniżają się stężenia IL-1RA, sIL-6R, sTNF-RI, sTNF-RII (cytokiny odpowiedzialne za kontrolę i ograniczanie reakcji zapalnej), jak również kortyzolu, NO₂- i neopteryny. Narasta również poziom INF- γ i INF- α . Zatrzymanie narastania, a następnie obniżenie stężenia tych czynników świadczy o skutecznej walce układu immunologicznego z wirusem. Dowodem jej skuteczności jest również ciągły wzrost miana przeciwciał IgG anty-EBOV, i spadek poziomu antygenów wirusowych.

Za dobre wskaźniki rokownicze choroby można uznać: wyjściowo wysoki poziom IL-1 β , IL-6 i TNF- α , który obniża się w trakcie trwania choroby; narastające miano przeciwciał IgG; niski i nie narastający poziom IL-10 i neopteryny [3].

Śmiertelny przebieg choroby charakteryzuje praktycznie brak odpowiedzi immunologicznej. Miano przeciwciał IgG anty-EBOV jest bardzo niskie przez cały czas trwania choroby. W konsekwencji wirus zakaża

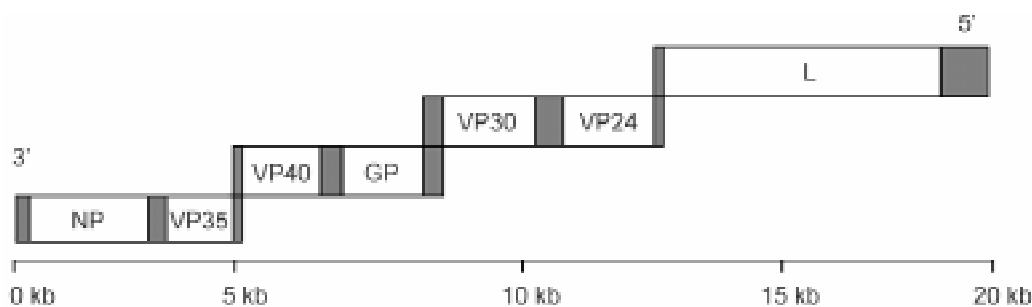
bez przeszkód kolejne komórki jednojądrzaste krwi, indukując wydzielanie dużych ilości cytokin: TNF- α , IL-6, IL-1RA, sTNF-RI, sTNF-RII, IL-10. Stężenia tych cytokin wyraźnie narastają w trakcie trwania choroby, natomiast stężenia IL-1 β , MIP-1 α i MIP-2 β praktycznie w ogóle nie różnią się od tych występujących u ludzi zdrowych. Przed śmiercią narastają także znacząco stężenia NO₂- i neopteryny. Charakterystyczny jest również stały wzrost wiremii. Uszkodzenie śródbłonka naczyń przez TNF- α i uwalnianie wolne rodniki tlenowe oraz blokowanie reakcji zapalnej przez IL-1RA, sTNF-RI, sTNF-RII i IL-10 ułatwia wirusowi kolonizację komórek śródbłonka i ich niszczenie. Uszkodzenie śródbłonka spowodowane przez namnażaniem się wirusa i działaniem cytokin jest jedną z przyczyn wystąpienia DIC i masywnych krwawień. Narastająca wiremia i rozpad zajętych przez wirusa tkanek (komórki wątroby, nerek, śledziona, gonad) w połączeniu ze wstrząsem krwotocznym prowadzą do śmierci.

Za złe wskaźniki rokownicze choroby można uznać: utrzymujące się niskie miano przeciwciał IgG; narastające stężenia IL-10, IL-1RA, sTNF-RI, sTNF-RII i neopteryny.

W badaniach prowadzonych po epidemii w Kikwit w 1995 r. wyizolowano od ozdowieńców przeciwciała skierowane przeciwko białkom wirusowym: anty-NP, anty-GP, anty-sGP. Przeciwciała wiążące silnie sGP i NP nie neutralizowały wirusa, natomiast przeciwciała anty-GP neutralizowały go skutecznie [50]. W późniejszych badaniach na myszach zaobserwowano, że infekcyjność wirusa VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) zrekombinowanego białkiem GP EBOV wzrasta pod wpływem monoklonalnych przeciwciał anty-EBOV uzyskanych z immunizowanych myszy. Sugeruje to, że przeciwciała mogą zwiększać infekcyjność wirusa, prawdopodobnie ułatwiając wnikanie do wnętrza komórek jednojądrzastych krwi. Dodanie białka sGP zmniejszyło efekt wzmocnienia – prawdopodobnie część przeciwciał została związana przez sGP [78].

4. Budowa i funkcje białek wirusa

Genom wirusa Ebola tworzy jednoniciowa cząsteczka (–)RNA długości ok. 19 kpz. Zawiera ona 7 otwartych ramek odczytu, kodujących 7 białek strukturalnych wirionu: L (180 kDa), GP (125 kDa), NP (104 kDa), VP40 (40 kDa), VP35 (35 kDa), VP30 (30 kDa), VP24 (24 kDa) [17]. Układ genów jest następujący: 3'-*np-vp35-vp40-gp-vp30-vp24-l-5'*. Białko GP jest drugim produktem genu *gp*, powstającym w wyniku edycji ramki odczytu; podstawowym produktem genu *gp* jest niestrukturalne białko sGP [71, 72]. Miejsca terminacji transkrypcji są konserwowa-



Rys. 1. Schemat organizacji genomu wirusa Ebola

Zaznaczono położenie poszczególnych genów, a także kolorem szarym obszary niekodujące i zachodzenia genów na siebie

ne; wszystkie zawierają sekwencję 3'-UAAUU-5'. Po między genami występują 3 fragmenty niekodujące: między *np* a *vp35* (3'-GAU-5'), między *vp40* a *gp* (3'-AGC-5') oraz między *vp30* a *vp24* (142-nukleotydowy obszar). Genom wirusa zawiera trzy 18–20 nukleotydowe obszary zachodzenia genów na siebie: między *vp35* a *vp40*, między *gp* a *vp30* oraz między *vp24* a *l*. Odcinek liderowy RNA i 5'-koniec każdego z mRNA zawiera obszar tworzący wypętloną strukturę drugorzędową [71]. Rysunek 1 przedstawia schemat genomu wirusa Ebola.

Glikoproteinami nazywamy białka zawierające dołączony kowalencyjnie do określonego aminokwasu łańcuch cukrowy, jako część ich struktury cząsteczkowej. Przyłączenie oligomerów cukrowych może zachodzić przez wiązanie z resztą amidową asparaginy (N-glikozylacja) lub grupą hydroksylową seryny lub treoniny (O-glikozylacja). Wszystkie N-glikany zawierają charakterystyczny rdzeń: Mana1-6(Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcbAsn; asparagina pochodzi z fragmentu białka o ściśle konserwatywnej sekwencji (Asn-X-Ser/Thr). Mimo wspólnej sekwencji rdzeniowej N-glikany cechuje duża zmienność oligosacharydów przyłączonych do rdzenia. O-glikany, w przeciwieństwie do N-glikanów, nie posiadają wspólnego rdzenia i charakteryzują się większą zmiennością końca redukującego. N-glikozylacja zachodzi w szorstkim ER i aparacie Golgiego; O-glikozylacja tylko w aparacie Golgiego [57].

Glikoproteina (GP) jest najlepiej poznanym białkiem wirusa. Szereg prac podkreśla rolę tego białka: w rozpoznawaniu receptorów na powierzchni komórek docelowych [1, 13, 48, 49, 67]; w indukcji fuzji błony cytoplazmatycznej z otoczką wirionu i wnikanu wirusa [1, 13, 49, 67, 82]; także jako głównego determinantu cytotoxycznosci [84, 94] oraz roli zarówno powierzchniowego GP, jak i jego form i fragmentów wolnych (sGP, ssGP, D-peptyd, GP1 i DGP_{1,2}) w indukcji i hamowaniu odpowiedzi immunologicznej [14, 72, 85, 86]. Białko to wydaje się być najistotniejszym czynnikiem patogenezy i potencjalnie głównym celem działania leków.

Gen *gp* koduje jako główny produkt białko sGPer (364–367 aminokwasów, w zależności od szczepu wirusa) [72, 73, 86]. Gen *gp* zawiera po 295 kodonie miejsce edycyjne składające się z 7 uracyli [72, 81]. W wyniku kotranskrypcyjnej edycji w powstającym mRNA wirusowa polimeraza RNA może dodać jedną lub dwie adenozyny bądź też usunąć jedną adenozynę. W przypadku dodania jednej adenozyny ramka odczytu dalszej części genu ulega przesunięciu i ekspresji ulega drugi produkt genu *gp* – GPer (676 aminokwasów). W przypadku dodania dwóch adenozyn lub usunięcia jednej następuje przedwczesna terminacja transkrypcji i ekspresji ulega skrócona forma sGP – ssGP (297 aminokwasów) [85]. Edycji tej może również dokonać polimeraza faga T7 lub wirusa krowianki [81].

Białko sGP. Białko sGP (364–367 aminokwasów) nie posiada domeny transbłonowej na C-końcu, natomiast na N-końcu ma sekwencję sygnałną (32–33 aminokwasów), która jest odcinana podczas translacji przez błonę komórkową. Białko zawiera miejsce cięcia przez furynę (Arg-X/Lys-Arg-Arg), ok. 325 aminokwasu. Sekwencja sGP jest silnie konserwowana we wszystkich podtypach wirusa; zawiera aminokwasów zaangażowane w rozpoznawanie receptora. Bezpośredni produkt ekspresji genu *gp* to białko sGPer. Powstaje ono w rybosomach ER, gdzie dołączane są przez N-glikozylację łańcuchy oligomannozowe; w aparacie Golgiego białko jest w pełni N-glikozylowane (część N-końcowa – sGP) i O-glikozylowane (część C-końcowa – D-peptyd) do formy pre-sGP (41,8 kDa) oraz rozcinane przez furynę na sGP i D-peptyd i następnie wydzielane na zewnątrz komórki. Glikozylowane sGP ma masę 50–70 kDa, w zależności od stopnia glikozylacji [72, 82].

Białko sGP występuje w następujących formach [82, 85, 86]:

1. sGP – homodimer; podjednostki ułożone antyrównolegle, połączone dwoma mostkami dwusiarczkowymi (pomiędzy Cys53 pierwszej podjednostki i Cys306 drugiej, i drugi pomiędzy Cys306 pierwszej i Cys53 drugiej)

2. ssGP – monomer; mostki dwusiarczkowe między podjednostkami nie mogą powstać, gdyż forma skrócona nie posiada Cys306

3. D-peptyd – w formie O-glikozylowanej masa ok. 10–14 kDa; zawiera reszty kwasu sjałowego

Białko GP. Białko GP (676 aminokwasów) powstaje w wyniku kotranskrypcyjnej edycji genu *gp* [72, 81]. N-końcowe 295 aminokwasów jest identycznych z sGP, dalsza sekwencja białka jest już oczywiście inna. Białko posiada N-końcową sekwencję sygnałową (32–33 aminokwasów), która jest odcinana podczas translokacji przez błonę komórkową [82]. Domena N-końcowa zawiera ok. 150 aminokwasów, odgrywających rolę w rozpoznawaniu receptora i wnikaniu wirusa do komórki; 6 aminokwasów jest bardzo istotnych w pierwszych etapach wnikania, ale nie są one zaangażowane w tworzenie całej struktury białka; 3 nich są w obszarze 10 aminokwasów najprawdopodobniej tworzących kieszonkę katalityczną, odpowiedzialną za rozpoznanie receptora. Zidentyfikowano również ok. 30 aminokwasów istotnych w utrzymaniu właściwej konformacji białka [49]. Za częścią identyczną z białkiem sGP znajduje się rejon zmienny, tzw. mucynopodobny (*mucin-like domain*), bogaty w Thr i Ser, zawierający miejsca O-glikozylacji i część miejsc N-glikozylacji [34, 94]. Rejon ten sięga do aminokwasów 498–501, które tworzą kanoniczną sekwencję Arg-X/Lys-Arg-Arg, będącą miejscem cięcia dla furyny (cięcie po Arg501). Podtyp EBO-R ma w tym miejscu sekwencję Arg-Lys-Gln-Lys-Arg, która jest słabiej rozpoznawana przez furynę. Cięcie białka przez furynę powoduje powstawanie dwóch podjednostek – GP1 (140 kDa) i GP2 (26 kDa) [73, 82]. Cięcie to niejako „odslania” domenę mucynopodobną, odpowiedzialną za cytotoxyczność [82, 94]. W podtypie EBO-R zmiana w miejscu cięcia przez furynę skutkuje brakiem cytotoxyczności dla ludzkich komórek śródbłonna. Za miejscem cięcia furyny (czyli na N-końcu GP2) znajduje się 16 aminokwasów hydrofobowych, stanowiących tzw. *fusion peptide* (FP), odpowiedzialny za wnikanie w błonę infekowanej komórki i – po pH-zależnej zmianie konformacyjnej – destabilizację błony w kierunku fuzji z otoczką wirusa (wykazano, że najważniejszy jest obszar pomiędzy 25 a 35 aminokwasem GP2) [1, 49, 67]. Za FP zlokalizowana jest α -helisa z obszarem superskręconym, która zawiera jon chloru (przy Asn586). Ostatnie 3 skręty α -helisy oraz fragment znajdującej się dalej pętli (aminokwasów 584–610) stanowią rejon odpowiedzialny za immunosupresję (homologiczny do rejonów immunosupresyjnych u wirusów onkogennych). Wewnątrz tej pętli jest również krótki mostek dwusiarczkowy pomiędzy Cys601 i Cys608, natomiast Cys609 łączy się mostkiem dwusiarczkowym z Cys53 z podjednostki GP1. Dalej jest kolejny, krótszy obszar α -helisy, która z poprzed-

nią α -helisą tworzy strukturę „szpilki do włosów”. Na C-końcu (aminokwasów 651–676) zlokalizowana jest 23-aminokwasowa domena transbłonowa, kotwicząca białko w błonie cytoplazmatycznej. Prawdopodobnie od strony cytoplazmy pozostaje wolny 4-aminokwasowy C-końiec [48].

Niektóre prace donoszą, że w proteolityczną obróbkę GP zaangażowana jest nie tylko furyna, lub że taka obróbka w ogóle nie jest konieczna, a proces ten tylko w określonych typach komórek jest niezbędny do namnażania wirusa. Jednak silna konserwacja tego miejsca we wszystkich podtypach EBOV sugeruje, że na którymś z etapów cyklu życiowego wirusa cięcie to jest niezbędne [32, 90].

Jako bezpośredni produkt ekspresji edytowanego genu *gp* w rybosomach ER powstaje białko GPer, do którego przez N-glikozylację dołączane są łańcuchy oligomannozowe (110 kDa); następnie w aparacie Golgiego białko jest w pełni N-glikozylowane (część GP1 i GP2) i O-glikozylowane (tylko GP1) do formy preGP (160 kDa) i po cięciu przez furynę powstaje GP_{1,2}. Furyna występuje w części trans aparatu Golgiego, ale jest również wydzielana z komórki [32, 34, 73, 82].

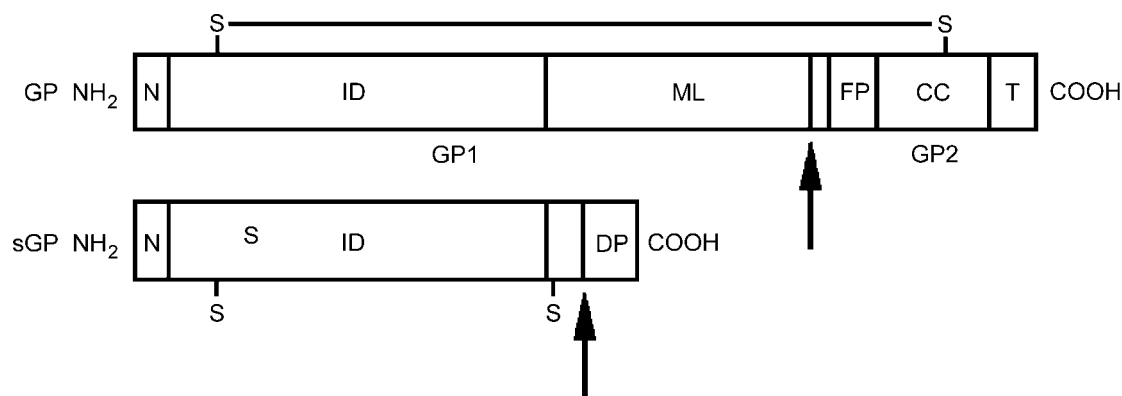
Białko GP występuje w następujących formach [14, 34]:

1. GP_{1,2} – białko zakotwiczone w błonie komórkowej (otoczce wirusa), zbudowane z podjednostek GP1 i GP2 połączonych mostkiem dwusiarczkowym; odpowiedzialne za rozpoznanie receptora (obszar N-końcowy GP1), a także fuzję błon wirusa i komórki (N-końcowy obszar GP2); dodatkowo zawiera motyw immunosupresyjny (pętla i obszar pierwszej α -helisy GP2) i domenę kotwiczącą w błonie (C-końiec GP2); na powierzchni błony tworzy trimery (C-końcowe helisy GP2 na zewnątrz, N-końcowe wewnątrz tej struktury), FPs występujące na N-końcach GP2 położone są wewnątrz trimerów, niedaleko błony.
2. DGP_{1,2} – białko GP_{1,2} odcięte z powierzchni błony komórkowej przez metaloproteinazę TACE z rodziny ADAM; nie zawiera domeny transbłonowej, występuje w formie uwolnionej, poza tym jest identyczne z GP_{1,2}; prawdopodobnie to ono adsorbuje powstające przeciwciała, natomiast nie jest w stanie wywołać silnej aktywacji monocytów.
3. GP1 – uwolnione przez rozerwanie mostka dwusiarczkowego między podjednostkami GP1 i GP2.

Rysunek 2 przedstawia schematycznie organizację białek GP i sGP.

Białka matriksowe: VP40 i VP24

Główne białko matriksowe VP40 (326 aminokwasów) jest dość dobrze poznane: bierze udział



Rys. 2. Schemat organizacji białek GP i sGP

N – N-końcowa sekwencja sygnałna; ID – część identyczna białek GP i sGP; ML – domena *mucin-like*; FP – *fusion peptide*; CC – rejon zawierający superskręcony obszar z fragmentem immunosupresyjnym; T – domena transbłonowa; DP – D-peptyd; zaznaczono mostek dwusiarczkowy łączący Cys53 i Cys609 w białku GP, a także Cys53 i Cys306, tworzące mostki dwusiarczkowe z drugą podjednostką sGP; strzałkami zaznaczono miejsce cięcia przez furynę

w formowaniu wirionów potomnych i ich uwalnianiu z zakażonej komórki, łączy otoczkę wirionu z jego rdzeniem, ma również zdolność indukowania błony komórki do formowania VLP (*virus-like particles*) – cząstek podobnych morfologicznie do wirionów, natomiast nie zawierających genomowego RNA ani pozostałych białek wirusa; formowanie VLP jest bardziej wydajne, jeśli dodatkowo w komórce wytwarzane jest białko GP lub NP [26, 45, 60].

Białko VP40 ma charakterystyczną strukturę, zawierającą dwie wyraźnie wyodrębnione domeny, każda w formie „kanapki” zbudowanej z β -kartek, pomiędzy którymi znajdują się α -helisy. Obie domeny połączone są długim odcinkiem nie posiadającym wyrażonej struktury drugorzędowej [23]. N-koniec białka tzw. *L-domain* (*late budding domain*), oddziałuje z białkami komórkowymi formując VLP i wiriony potomne [26, 45, 60]. *L-domain* zawiera charakterystyczne motywy: Pro-Thr-Ala-Pro i Pro-Pro-Glu-Tyr, które oddziałują z ligazą ubikwityny Nedd4 i białkiem Tsg101 (część systemu wydzielniczego komórki); obecność białka Tsg101 wykryto w VLP powstałych w wyniku działania VP40 [45]. Motywy te są homologiczne do motywów w białkach Gag retrowirusów i białkach M rabdowirusów, co może świadczyć o podobieństwie mechanizmów uwalniania cząstek wirusowych z komórki [26]. Jednak najnowsze badania z użyciem wirusa Ebola, z mutacją w obrębie VP40 wykazały, że *L-domain* nie jest niezbędna w cyklu życiowym [58].

Domena N-końcowa (aminokwasy 55–194) odpowiedzialna jest za oligomeryzację; natomiast domena C-końcowa, a szczególnie ostatnie 18 aminokwasów, zaangażowana jest w łączenie białka z błoną cytoplazmatyczną [60, 66, 74]; łączenie zachodzi w określonych obszarach, bogatych w cholesterol, tworzących tzw. „tratwy” (*rafts*). Gromadzenie się VP40 i GP w tych rejonach poprzedza formowanie wirionów lub VLP [60].

W monomerycznej formie białka VP40 domena N-końcowa jest położona blisko C-końcowej. Oligomeryzację białka poprzedzają dwie zmiany konformacyjne: odsunięcie N-końca, zawierającego *L-domain*, oraz domeny C-końcowej od domeny odpowiedzialnej za oligomeryzację. W trakcie oligomeryzacji powstają oktamer, mające formę pierścieni [23, 66]; każdy oktamer zbudowany jest z 4 homodimerów, których podjednostki ułożone są antyrównolegle. Połączenia pomiędzy poszczególnymi homodimerami w pierścieniowej strukturze oktameru stabilizowane są przez krótkie odcinki RNA, które niejako dopasowują się do przestrzennego ułożenia aminokwasów sąsiadujących homodimerów. Wiązanie z RNA jest specyficzne; rozpoznawana jest sekwencja 5'UGA3', a szczególnie zaangażowane są Phe125 i Arg134 [23, 29]. Domeny C-końcowe, jak również sam N-koniec (*L-domain*) lokują się najprawdopodobniej powyżej i poniżej płaszczyzny pierścienia utworzonego przez domeny N-końcowe [23].

Ponieważ oligomeryzacja wydaje się niezbędna do składania i uwalniania wirusów, ewentualny lek mógłby wiązać ze sobą domeny C- i N-końcowe formy monomerycznej, uniemożliwiając ich rozejście się, a – co za tym idzie – także oligomeryzację [74]. Co ciekawe w formowaniu VLP nie jest konieczna obecność RNA, natomiast utworzenie w pełni aktywnych cząstek wirusowych wymaga obecności Phe125 i Arg134 i wiązania RNA, co prawdopodobnie świadczy o dodatkowej, nieznannej jeszcze roli białka VP40 w cyklu życiowym wirusa [29].

Pomocnicze białko matriksowe VP24 (251 aminokwasów) jest słabo poznane; pełni funkcję strukturalną, łącząc otoczkę wirionu z nukleokapsydem; jest zdolne do oligomeryzacji i silnego wiązania się z błoną komórkową; jest także w stanie indukować powstawanie VLP, choć z mniejszą wydajnością niż VP40;

przypisuje mu się więc rolę przy składaniu i uwalnianiu wirusów potomnych [25, 46].

Badania wykazały, że białko VP24 nie jest glikozylowane, mimo że zawiera 3 potencjalne miejsca N-glikozylacji (aminokwasy 84, 185 i 246). W czasie eksperymentów w komórkach ssaków VP24 samoistnie tworzyło tetramery; nie można wykluczyć możliwości powstawania innych form oligomerycznych. W tworzenie oligomerów szczególnie zaangażowana jest N-końcowa część białka. W obrębie aminokwasów 172–175 znajduje się motyw Tyr-X-X-Leu, homologiczny do *L-domain* białka VP40 [25].

Białka nukleokapsydu: VP30, VP35, NP i L

Białko VP30 (288 aminokwasów) jest jednym z 4 białek tworzących nukleokapsyd. Pełni rolę aktywatora transkrypcji genów wirusa; jest zaangażowane we wczesne etapy cyklu życiowego [52, 53, 88]; w późniejszych etapach przyłącza się do kompleksów budowanych przez NP [52].

W N-końcowej części białka znajdują się miejsca fosforylacji (Ser 29–31, 42, 44, 46 i Thr 52); od stopnia fosforylacji zależy rodzaj wykazywanej przez białko aktywności. Słabo ufosforylowane silnie aktywuje transkrypcję, natomiast nie wiąże się z kompleksami NP.; częściowo ufosforylowane zdolne jest zarówno do aktywacji transkrypcji, jak i do wiązania się z kompleksami NP; w pełni ufosforylowane wiąże się z NP, ale nie jest w stanie aktywować transkrypcji. Stopień fosforylacji zależy od aktywności komórkowych fosfataz PP1 i PP2A [52].

VP30 ma zdolność wiązania jonów cynku. W proces ten zaangażowany jest rejon pomiędzy aminokwasami 68–95, zawierający 3 Cys i 1 His. Wiązanie cynku jest niezbędne do aktywacji transkrypcji, nie ma natomiast znaczenia przy łączeniu z kompleksami NP i składaniu wirionów [53].

W aktywacji transkrypcji przez VP30 bierze udział specyficzna struktura pętli w miejscu „start” pierwszej z genów wirusa, hamująca prawdopodobnie przesuwanie się wirusowej polimerazy RNA po nici genomowego RNA; obecność białka VP30 znosi ten efekt i umożliwia transkrypcję [88].

Białko VP35 (340 aminokwasów) jest składnikiem nukleokapsydu; blokuje również wydzielanie interferonów typu I przez zainfekowane komórki – prawdopodobnie przez zablokowanie indukcji promotora IFN- β spowodowanej obecnością dwuniciowego RNA oraz przez zablokowanie fosforylacji IRF-3 (*IFN regulatory factor 3*), odpowiedzialnego za aktywację promotora IFN- α w trakcie infekcji wirusowej – a w efekcie hamuje odpowiedź immunologiczną [6, 7].

Białko VP35 tworzy także w połączeniu z białkami L i NP funkcjonalną RNA-zależną polimerazę RNA [55]. Do zajęcia transkrypcji, replikacji i two-

żenia nukleokapsydu konieczna jest obecność białek VP35, NP i L. VP35 jest odpowiednikiem białka P u innych (–)RNA wirusów [36, 54]

Białko L (2212 aminokwasów) wraz z białkami VP35 i NP tworzy kompleks aktywny transkrypcyjnie – RNA-zależną polimerazę RNA, stanowiąc jego część katalityczną [55]. Analiza sekwencji genu kodującego białko L, wykazała duże podobieństwa do białek *Paramyxoviridae* i innych (–)RNA wirusów. Ma ono wysoką zawartość leucyny i izoleucyny (17,9%) i wysoki ładunek całościowy w obojętnym pH (+57). Zawiera 3 charakterystyczne dla polimeraz RNA z wirusów (–)RNA motywy aminokwasowe: motyw A, wiążący RNA (aminokwasy 553–571), motyw B, rozpoznający sekwencję RNA i/lub tworzący wiązania fosfodiestrowe (aminokwasy 738–744) oraz motyw C, wiążący ATP (aminokwasy 1815–1841). Posiada również 2 Cys (1351–1352), stabilizujące przestrzenną strukturę białka, wysoce konserwowane w wszystkich wirusowych polimerazach RNA [83].

Białko NP (739 aminokwasów) jest głównym składnikiem nukleokapsydu. Jego N-końcowa część jest hydrofobowa, natomiast część C-końcowa ma właściwości hydrofilowe i kwasowe [70].

Białko NP wirusa Marburg, blisko spokrewnionego z Ebolą, wykazuje samoistną zdolność do agregacji w zakażonych komórkach, bez udziału innych białek wirusowych, tworząc TLS (*tubule-like structures*), widoczne w mikroskopie elektronowym, zlokalizowane w pobliżu błon szorstkiego ER. TLS mają w przekroju symetrię heksagonalną i morfologicznie są bardzo zbliżone do nukleokapsydów, powstających w komórkach zainfekowanych wirusem Marburg. Zdolność białek strukturalnych nukleokapsydu do samoistnego formowania struktur morfologicznie podobnych do nukleokapsydu występuje również w rodzinach *Rhabdoviridae* i *Paramyxoviridae* [36].

5. Diagnostyka gorączki krwotocznej Ebola

Znanych jest kilka metod wykrywania wirusa Ebola u osób zakażonych oraz u zmarłych z powodu gorączki krwotocznej.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM – *Transmission Electron Microscopy*) – metoda pozwalająca na wykrycie cząstek wirusa we krwi i płynach ustrojowych pacjenta oraz nukleokapsydów powstających w wyniku namnażania się wirusa w cytoplazmie zainfekowanych komórek. Wadą tej metody jest konieczność posiadania bardzo dobrze wyposażonego laboratorium, co czyni ją właściwie niedostępną w krajach afrykańskich, miejscu występowania wirusa [38].

Izolacja wirusa z tkanek osób chorych i zmarłych, a następnie jego **hodowla** i **serotypowanie** – nie jest

szeroko stosowana, gdyż jest niebezpieczna i wymaga laboratoriów 4 stopnia bezpieczeństwa [37, 38].

Immunohistochemiczny test skóry (IHC – *Immunohistochemical Assay*) – wykrywanie antygenów wirusa w skórze osób zmarłych przy użyciu monoklonalnych przeciwciał; skóra do badań jest konserwowana w formalinie. Metoda czuła, specyficzna i bezpieczna [95].

Testy immunosorbcyjne (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) – łatwe w stosowaniu, czułe testami wykrywające antygeny wirusowe lub przeciwciała anty-EBOV we krwi osób zakażonych i ozdrowieńców (również w przypadkach bezobjawowych) [24, 37–39, 47, 59, 61, 68]. Stosuje się 3 typy testów ELISA:

- ELISA wykrywające antygeny wirusa – wykrywa antygeny wirusa Ebola przez wiązanie ze specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi. Produkcja przeciwciał wymaga uzyskania białek wirusa, co możliwe jest jedynie w laboratoriach 4 stopnia bezpieczeństwa. Najczęściej są to białka NP lub GP [37, 47, 59, 68].
- ELISA wykrywające IgG – wykrywa przeciwciała anty-EBOV klasy IgG przy użyciu rekombinowanych białek wirusa Ebola. Tu również używa się najczęściej białek NP lub GP [61, 68]. Zaletą tej metody jest użycie białek rekombinowanych, co nie wymaga laboratoriów 4 stopnia bezpieczeństwa. Jej ograniczeniem jest częste zjawisko braku wystarczającej produkcji przeciwciał IgG (w ciężkich przypadkach), jak również to, że przeciwciała pojawiają się dopiero w 8–10 dniu od zakażenia. Wszyscy ozdrowieńcy i osoby, które przeszły infekcje bezobjawowe, posiadają przeciwciała IgG anty-EBOV, metoda jest więc skuteczna przy analizie seropozytywności populacji i w poszukiwaniach rezerwuaru wirusa [38, 39, 61].
- ELISA wykrywające IgM – metoda zbliżona do opisanej powyżej; wykrywa przeciwciała anty-EBOV klasy IgM. Pojawiają się one ok. 6 dnia od infekcji i są wykrywalne znacznie krócej niż IgG. Metoda dość skuteczna w szybkiej diagnostyce; ograniczeniem może być brak przeciwciał przy niedostatecznej odpowiedzi immunologicznej ze strony organizmu [38, 39, 61].

Pośredni immunofluorescencyjny test wykrywający przeciwciała (IFAT – *Indirect Immunofluorescence Antibody Test*) – metoda mniej czuła niż ELISA; przeciwciała IgG anty-EBOV obecne w próbce krwi chorego wiązane są przez komórki linii HeLa i Vero ekspresujące rekombinowane antygeny wirusa Ebola (białko NP). Do związanych przeciwciał anty-EBOV przyłączane są w kolejnym etapie drugorzędowe przeciwciała anty-IgG, wyznakowane fluorescencyjnie;

następnie hodowla komórkowa badana jest w mikroskopie fluorescencyjnym. Brak odpowiedzi immunologicznej w przypadku ciężkiego przebiegu choroby obniża czułość tej metody [31, 35, 69].

RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*) – metoda najbardziej czuła; wykrywa RNA wirusa w komórkach jednojądrzastych krwi, także w przypadkach bezobjawowych. Potwierdza 100% dodatnich wyników metody ELISA wykrywającej antygeny i 91% ELISA wykrywającej IgM. Kombinacja tych 3 metod daje 97% czułości w wykrywaniu wirusa. Dodatkowo wyniki RT-PCR udaje się w 83% potwierdzić przy użyciu metody ELISA wykrywającej antygeny i w 67% przy użyciu ELISA wykrywającej IgM [42].

Modyfikacją metody RT-PCR jest określenie podtypu wirusa z zastosowaniem jako sondy **oligonukleotydów znakowanych fluorochromami** na 5'-końcu. Stosuje się mieszaninę 2 różnych oligonukleotydów, z których jeden jest komplementarny do EBO-Z, natomiast drugi do EBO-S. Każdy z oligonukleotydów ma na 5'-końcu kowalencyjnie dołączony związek blokujący fluoryzację barwnika reporterowego, tzw. wygaszacz (ang. *quencher*) TAMRA, natomiast na 3'-końcu fluorochrom reporterowy: FAM (oligonukleotyd dla EBO-Z) lub VIC (oligonukleotyd dla EBO-S). Fluorochromy FAM i VIC różnią się długością emitowanej fali świetlnej. Gdy sonda jest w postaci wolnej, wygaszacz jest blisko do fluorochromu, hamując emisję światła. W czasie reakcji PCR sondy łączą się specyficznie z cDNA (matrycą); hybrydyzacji ulega tylko sonda specyficzna dla danego podtypu. Termostabilna polimeraza DNA (wykorzystując swoją aktywność nukleolityczną) degraduje zhybrydyzowany oligonukleotyd, dzięki czemu fluorochrom może oddalić się od wygaszacza i wyemitować sygnał świetlny. Tym samym można określić podtyp wirusa już w trakcie reakcji PCR (*real-time PCR*). Zaletą tej metody jest czułość i szybkość [15, 22].

Western Blot – używana jako potwierdzenie innych metod; wykrywa antygeny wirusa oraz przeciwciała IgG i IgM anty-EBOV [8, 24, 41].

Test radioimmunoprecypitacyjny (RIPA – *Radioimmunoprecipitation Assay*) – do wykrycia przeciwciał anty-EBOV wykorzystuje znakowany radioaktywnie antygen wirusowy. Kompleksy przeciwciała-antygeny są strącane przy użyciu białka *A Staphylococcus*, a następnie analizowane przez elektroforezę i autoradiografię [65].

6. Leczenie

Do dziś nie jest znana żadna skuteczna metoda leczenia przyczynowego gorączki krwotocznej Ebola. W leczeniu objawowym i wyrównawczym stosuje się

środku przeciwbólowe, różne metody obniżenia gorączki, a przy wystąpieniu skazy krwotocznej uzupełnianie strat płynów, elektrolitów, krwi i osoczowych czynników krzepnięcia. W przypadkach o ciężkim przebiegu nie jest to skuteczne, może jedynie o kilka dni opóźnić śmierć chorego [5, 11, 38, 91, 96, 97]. W kilku przypadkach podejmowano próby zastosowania metod eksperymentalnych stosowano:

- **Osocze ozdrowieńców** (zawiera przeciwciała anty-EBOV) – w 1995 r. w czasie epidemii w Kikwit w Zairze przetoczono osocze 8 chorym z których 7 przeżyło. Biorąc pod uwagę 81% śmiertelność w czasie tej epidemii, wynik był bardzo obiecujący [56].
- **Ludzki interferon α -2b w połączeniu z IgG z osocza hiperimmunizowanych koni, kóz lub owiec** – podane 4 rosyjskim pracownikom laboratoryjnym, narażonym na ekspozycję na wirusa Ebola. Wszyscy przeżyli, co może świadczyć o wysokiej skuteczności. Podobnie jednak jak w poprzednim przypadku, trudno mówić o skuteczności metody, gdy rezultaty uzyskano na tak niewielkiej liczbie chorych. Metodę tę testowano również na świnkach morskich, myszach i małpach; okazała się skuteczna jedynie wobec świnek morskich i myszy [33, 40].

Prowadzone są również badania nad zastosowaniem leków:

- **Cyjanowiryna-N (CV-N)** – białko izolowane z sinic, odkryte w ramach programu poszukiwania naturalnych leków przeciwko wirusowi HIV; blokuje przyłączone do białka GP_{1,2} przez N-glikozylację oligosacharydy, uniemożliwiając fuzję osłonki wirusa z błoną cytoplazmatyczną [4].
- **Analogi nukleozydowe** hamujące aktywność hydrolazy S-adenozyl-L-homocysteiny (AdoHcy), blokujące w sposób pośredni metylację struktury cap na końcu 5' wirusowych cząsteczek mRNA – próby przeprowadzone na myszach dały obiecujące wyniki [10, 30].

7. Eksperymentalne metody uodparniania czynnego

W chwili obecnej nie jest dostępna żadna skuteczna szczepionka dla ludzi, jednak szereg eksperymentów na zwierzętach pozwala przypuszczać, że jej wyprodukowanie i dopuszczenie do użytku to kwestia najbliższych lat. W badaniach testowano kilka typów szczepionek:

- **Szczepionki DNA** – nagie DNA zawierające geny kodujące białka wirusa: NP, GP, sGP (sklonowane w plazmidach). DNA był podawany domięśniowo lub przy użyciu strzelby genowej.

Obiecujące wyniki otrzymano na różnych modelach zwierzęcych [20, 62, 76, 77, 79, 92].

- **Różne wirusy zawierające geny kodujące białka EBOV** – stosowano m.in. adenowirusy, atenuowany wirus końskiego zapalenia mózgu, wirus krowianki. Dla uzyskania wysokiej skuteczności łączono tę metodę z uodparnianiem przez podanie szczepionki DNA [20, 76, 77].
- **Szczepionki podjednostkowe** – zawierające wyizolowane białka wirusa Ebola. Odpowiedź immunologiczną wywoływały białka VP24, VP30, VP35 i VP40 [89].
- **Inaktywowany wirus Ebola** – inaktywacja formaliną; w nowszych pracach podawano liposomy zawierające wirusy inaktywowane przez napromieniowanie. Duże znaczenie w powstaniu trwałej odporności miała obecność lipidu A w liposomach [51, 63, 64].

Najbardziej obiecujące efekty osiągnięto przy zastosowaniu kilku metod uodparniania jednocześnie. Podanie małpom lub myszom szczepionki DNA zawierającej geny kodujące białko NP i trzy rodzaje GP w kilku powtórzeniach i dodatkowa immunizacja adenowirusem zawierającym gen kodujący białko GP dało bardzo dobre wyniki. Jest to prawdopodobnie droga do skonstruowania szczepionki skutecznej i bezpiecznej dla ludzi. Zaletą szczepionek DNA jest ich bezpieczeństwo, a także łatwość przechowywania i trwałość, co ma szczególne znaczenie w państwach afrykańskich, miejscu występowania wirusa Ebola [76, 77].

8. Podsumowanie

W 1976 r. w środkowej Afryce wystąpiły dwie epidemie nieznanego gorączki krwotocznej. Charakteryzowała je ogromna śmiertelność, sięgająca 90%. Wyizolowany wirus nazwano Ebola i zaklasyfikowano jako nowego przedstawiciela rodziny *Filoviridae*. W latach późniejszych zanotowano jeszcze kilka dużych epidemii. Niebezpieczeństwo wynikające z możliwości przypadkowego zawleczenia wirusa do krajów rozwiniętych lub użycia go jako narzędzia ataku biologicznego sprawia, że w wielu ośrodkach na świecie prowadzone są badania nad mechanizmami patogenezы.

Prace te przybliżyły budowę i funkcje białek wirusa; szczególnie dobrze poznano białka GP i VP40. Ich istotna rola w procesie patogenezы i w cyklu życiowym wirusa czyni je pierwszoplanowymi celami działania potencjalnych leków. Poszerzono również wiedzę o immunologicznym podłożu choroby, choć nadal wiele aspektów pozostaje niewyjaśnionych. Pozwoliło to na opracowanie skutecznych metod diagnostycznych, a także na stworzenie leków i szczepionek, będących na razie w fazie prób na zwierzętach.

Niniejsza praca stanowi próbę podsumowania aktualnej wiedzy dotyczącej immunologicznego i molekularnego podłoża gorączki krwotocznej Ebola, diagnostyki oraz prób leczenia i uodparniania.

Piśmiennictwo

- Adam B., Lins L., Stroobant V., Thomas A., Brasseur R.: Distribution of Hydrophobic Residues Is Crucial for the Fusogenic Properties of the Ebola Virus GP2 Fusion Peptide. *J. Virol.* **78**, 2131–2136 (2004)
- Alvarez C.P., Lasala F., Carrillo J., Muñoz O., Corbí A.L., Delgado R.: C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans. *J. Virol.* **76**, 6841–6844 (2002)
- Baize S., Leroy E.M., Georges A.J., Georges-Courbot M.C., Capron M., Bedjabaga I., Lansoud-Soukate J., Mavoungou E.: Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* **128**, 163–168 (2002)
- Barrientos L.G., O'Keefe B.R., Bray M., Sanchez A., Gronenborn A.M., Boyd M.R.: Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein, GP1,2 and inhibits infectivity of Ebola virus. *Antiviral. Res.* **58**, 47–56 (2003)
- Baskerville A., Bowen E.T., Platt G.S., McArdell L.B., Simpson D.I.: The pathology of experimental Ebola virus infection in monkeys. *J. Pathol.* **125**, 131–138 (1978)
- Basler C.F., Wang X., Mühlberger E., Volchkov V., Paragas J., Klenk H.D., García-Sastre A., Palese P.: The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12289–12294 (2000)
- Basler C.F., Mikulasova A., Martinez-Sobrido L., Paragas J., Mühlberger E., Bray M., Klenk H.D., Palese P., Garcia-Sastre A.: The Ebola Virus VP35 Protein Inhibits Activation of Interferon Regulatory Factor 3. *J. Virol.* **77**, 7945–7956 (2003)
- Becker S., Feldmann H., Will C., Slenczka W.: Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide? *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*, **181**, 43–55 (1992)
- Bowen E.T., Platt G.S., Lloyd G., Raymond R.T., Simpson D.I.: A comparative study of strains of Ebola virus isolated from southern Sudan and northern Zaire in 1976. *J. Med. Virol.* **6**, 129–138 (1980)
- Bray M., Driscoll J., Huggins J.W.: Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an *S*-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor. *Antiviral. Res.* **45**, 135–147 (2000)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of Ebola hemorrhagic fever Uganda, August 2000-January 2001. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **9**, 73–77 (2001)
- Chan S.Y., Empig C.J., Welte F.J., Speck R.F., Schmaljohn A., Kreisberg J.F., Goldsmith M.A.: Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell*, **13**, 117–126 (2001)
- Chan S.Y., Speck R.F., Ma M.C., Goldsmith M.A.: Distinct Mechanisms of Entry by Envelope Glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) Viruses. *J. Virol.* **74**, 4933–4937 (2000)
- Dolnik O., Volchkova V., Garten W., Carbonnelle C., Becker S., Kahnt J., Stroher U., Klenk H.D., Volchkov V.: Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *EMBO J.* **19**, 2175–2184 (2004)
- Drosten C., Götting S., Schilling S., Asper M., Panning M., Schmitz H., Günther S.: Rapid Detection and Quantification of RNA of Ebola and Marburg Viruses, Lassa Virus, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Rift Valley Fever Virus, Dengue Virus, and Yellow Fever Virus by Real-Time Reverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2323–2330 (2002)
- Ebola virus infection in imported primates – United States. *Can. Dis. Wkly. Rep.* **27**, 17–18 (1990)
- Elliott L.H., Kiley M.P., McCormick J.B.: Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology*, **147**, 169–76 (1985)
- Ellis D.S., Bowen E.T., Simpson D.I., Stamford S.: Ebola virus: a comparison, at ultrastructural level, of the behaviour of the Sudan and Zaire strains in monkeys. *Br. J. Exp. Pathol.* **59**, 584–593 (1978)
- Feldmann H., Bugany H., Mahner F., Klenk H.D., Drenckhahn D., Schnittler H.J.: Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J. Virol.* **70**, 2208–2214 (1996)
- Geisbert T.W., Pushko P., Anderson K., Smith J., Davis K.J., Jahrling P.B.: Evaluation in Nonhuman Primates of Vaccines against Ebola Virus. *Infect. Dis.* **8**, 503–507 (2002)
- Geisbert T.W., Hensley L.E., Larsen T., Young H.A., Reed D.S., Geisbert J.B., Scott D.P., Kagan E., Jahrling P.B., Davis K.J.: Pathogenesis of Ebola Hemorrhagic Fever in *Cynomolgus* Macaques. *Amer. J. Pathology*, **163**, 2347–2370 (2003)
- Gibb T.R., Norwood Jr. D.A., Woollen N., Henchal E.A.: Development and Evaluation of a Fluorogenic 5' Nuclease Assay To Detect and Differentiate between Ebola Virus Subtypes Zaire and Sudan. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4125–4130 (2001)
- Gomis-Ruth F.X., Dessen A., Timmins J., Bracher A., Kolesnikowa L., Becker S., Klenk H.D., Weissenhorn W.: The Matrix Protein VP40 from Ebola Virus Octamerizes into Pore-like Structures with Specific RNA Binding Properties. *Structure*, **11**, 423–433 (2003)
- Groen J., van den Hoogen B.G., Burghoorn-Maas C.P., Fooks A.R., Burton J., Clegg C.J., Zeller H., Osterhaus A.D.: Serological reactivity of baculovirus-expressed Ebola virus VP35 and nucleoproteins. *Microbes Infect.* **5**, 379–385 (2003)
- Han Z., Boshra H., Sunyer J.O., Zwiers S.H., Paragas J., Harty R.N.: Biochemical and Functional Characterization of the Ebola Virus VP24 Protein: Implications for a Role in Virus Assembly and Budding. *J. Virol.* **77**, 1793–1800 (2003)
- Harty R.N., Brown M.E., Wang G., Huibregtse J., Hayes F.P.: A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: Implications for filovirus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13871–13876 (2000)
- Hensley L.E., Young H.A., Jahrling P.B., Geisbert T.W.: Pro-inflammatory response during Ebola virus infection of primate models: possible involvement of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunol. Lett.* **80**, 169–179 (2002)
- Heymann D.L., Weisfeld J.S., Webb P.A., Johnson K.M., Cairns T., Berquist H.: Ebola hemorrhagic fever: Tandala, Zaire, 1977–1978. *J. Infect. Dis.* **142**, 372–376 (1980)
- Hoenen T., Volchkov V., Kolesnikova L., Mittler E., Timmins J., Ottmann M., Reynard O., Becker S., Weissenhorn W.: VP40 Octamers Are Essential for Ebola Virus Replication. *J. Virol.* **79**, 1898–1905 (2005)
- Huggins J. i wsp.: Antiviral Drug Therapy of Filovirus Infections: *S*-adenosylhomocysteine Hydrolase Inhibitors Inhibit Ebola Virus in Vitro and in a Lethal Mouse Model. *J. Infect. Dis.* **179**, 240–247 (1999)

31. Ikegami T., Saijo M., Niikura M., Miranda M.E.G., Calaor A.B., Hernandez M., Manalo D.L., Kurane I., Yoshikawa Y., Morikawa S.: Development of an immunofluorescence method for the detection of antibodies to Ebola virus subtype Reston by the use of recombinant nucleoprotein-expressing HeLa cells. *Microbiol. Immunol.* **46**, 633–638 (2002)
32. Ito H., Watanabe S., Takada A., Kawaoka Y.: Ebola Virus Glycoprotein: Proteolytic Processing, Acylation, Cell Tropism, and Detection of Neutralizing Antibodies. *J. Virol.* **75**, 1576–1580 (2001)
33. Jahrling P.B., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Swearingen J.R., Bray M., Jaax N.K., Huggins J.W., Le Duc J.W., Peters C.J.: Evaluation of immune globulin and recombinant interferon-alpha2b for treatment of experimental Ebola virus infections. *J. Infect. Dis.* **179**, 224–234 (1999)
34. Jeffers S.A., Sanders D.A., Sanchez A.: Covalent Modifications of the Ebola Virus Glycoprotein. *J. Virol.* **76**, 12463–12472 (2002)
35. Johnson K.M., Elliott L.H., Heymann D.L.: Preparation of polyvalent viral immunofluorescent intracellular antigens and use in human serosurveys. *J. Clin. Microbiol.* **14**, 527–529 (1981)
36. Kolesnikova L., Muhlberger E., Ryabchikova E., Becker S.: Ultrastructural Organization of Recombinant Marburg Virus Nucleoprotein: Comparison with Marburg Virus Inclusions. *J. Virol.* **74**, 3899–3904 (2000)
37. Ksiazek T.G., Rollin P.E., Jahrling P.B., Johnson E., Dalgard D.W., Peters C.J.: Enzyme immunosorbent assay for Ebola virus antigens in tissues of infected primates. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 947–950 (1992)
38. Ksiazek T.G., Rollin P.E., Williams A.J., Bressler D.S., Martin M.L., Swanepoel R., Burt F.J., Leman P.A., Khan A.S., Rowe A.K., Mukunu R., Sanchez A., Peters C.J.: Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Infect. Dis.* **179**, 177–87 (1999)
39. Ksiazek T.G., West C.P., Rollin P.E., Jahrling P.B., Peters C.J.: ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. *J. Infect. Dis.* **179**, 192–198 (1999)
40. Kudoyarova-Zubavichene N.M., Sergeev N.N., Chepurnov A.A., Netesov S.V.: Preparation and use of hyperimmune serum for prophylaxis and therapy of Ebola virus infections. *J. Infect. Dis.* **179**, 218–223 (1999)
41. Leroy E.M., Baize S., Volchkov V.E., Fisher-Hoch S.P., Georges-Courbot M.C., Lansoud-Soukate J., Capron M., Debre P., McCormick J.B., Georges A.J.: Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *Lancet*, **355**, 2210–2215.
42. Leroy E.M., Baize S., Lu C.Y., McCormick J.B., Georges A.J., Georges-Courbot M.C., Lansoud-Soukate J., Fisher-Hoch S.P.: Diagnosis of Ebola haemorrhagic fever by RT-PCR in an epidemic setting. *J. Med. Virol.* **60**, 463–467 (2000)
43. Leroy E.M., Baize S., Debre P., Lansoud-Soukate J., Mavoungou E.: Early immune responses accompanying human asymptomatic Ebola infections. *Clin. Exp. Immunol.* **124**, 453–460 (2001)
44. Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., Délicat A., Paweska J.T., Gonzalez J.P., Robert Swanepoel R.: Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, **438**, 575–576 (2005)
45. Licata J.M., Simpson-Holley M., Wright N.T., Han Z., Paragas J., Harty R.N.: Overlapping Motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola Virus VP40 Protein Function Independently as Late Budding Domains: Involvement of Host Proteins TSG101 and VPS-4. *J. Virol.* **77**, 1812–1819 (2003)
46. Licata J.M., Johnson R.F., Han Z., Harty R.N.: Contribution of Ebola Virus Glycoprotein, Nucleoprotein, and VP24 to Budding of VP40 Virus-Like Particles. *J. Virol.* **78**, 7344–7351 (2004)
47. Lucht A., Grunow R., Otterbein C., Moller P., Feldmann H., Becker S.: Production of monoclonal antibodies and development of an antigen capture ELISA directed against the envelope glycoprotein GP of Ebola virus. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **193**, 181–187 (2004)
48. Malashkevich V.N., Schneider B.J., McNally M.L., Milhollen M.A., Pang J.X., Kim P.S.: Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2662–2667 (1999)
49. Manicassamy B., Wang J., Jiang H., Rong L.: Comprehensive Analysis of Ebola Virus GP1 in Viral Entry. *J. Virol.* **79**, 4793–4805 (2005)
50. Maruyama T., Rodriguez L.L., Jahrling P.B., Sanchez A., Khan A.S., Nichol S.T., Peters C.J., Parren P.W., Burton D.R.: Ebola Virus Can Be Effectively Neutralized by Antibody Produced in Natural Human Infection. *J. Virol.* **73**, 6024–6030 (1999)
51. Mikhailov V.V., Borisevich I.V., Chernikova N.K., Potryvaeva N.V., Krasnianskii V.P.: The evaluation in hamadryas baboons of the possibility for the specific prevention of Ebola fever. *Vopr. Virusol.* **39**, 82–84 (1994)
52. Modrof J., Muhlberger E., Klenk H.D., Becker S.: Phosphorylation of VP30 Impairs Ebola Virus Transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 33099–33104 (2002)
53. Modrof J., Becker S., Muhlberger E.: Ebola Virus Transcription Activator VP30 Is a Zinc-Binding Protein. *J. Virol.* **77**, 3334–3338 (2003)
54. Muhlberger E., Lotfering B., Klenk H.D., Becker S.: Three of the Four Nucleocapsid Proteins of Marburg Virus, NP, VP35, and L, Are Sufficient To Mediate Replication and Transcription of Marburg Virus-Specific Monocistronic Minigenomes. *J. Virol.* **72**, 8756–8764 (1998)
55. Muhlberger E., Weik M., Volchkov V.E., Klenk H.D., Becker S.: Comparison of the Transcription and Replication Strategies of Marburg Virus and Ebola Virus by Using Artificial Replication Systems. *J. Virol.* **73**, 2333–2342 (1999)
56. Mupapa K., Massamba M., Kibadi K., Kuvula K., Bwaka A., Kipasa M., Colebunders R., Muyembe-Tamfum J.J.: Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusions from convalescent patients. International Scientific and Technical Committee. *J. Infect. Dis.* **179**, 18–23 (1999)
57. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: *Biochemia Harpera*. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 1998
58. Neumann G., Ebihara H., Takada A., Noda T., Kobasa D., Jasenosky L.D., Watanabe S., Kim J.H., Feldmann H., Kawaoka Y.: Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture. *J. Virol.* **79**, 10300–10307 (2005)
59. Niikura M., Ikegami T., Saijo M., Kurane I., Miranda M.E., Morikawa S.: Detection of Ebola viral antigen by enzyme-linked immunosorbent assay using a novel monoclonal antibody to nucleoprotein. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3267–3271 (2001)
60. Panchal R.G., Ruthel G., Kenny T.A., Kallstrom G.H., Lane D., Badie S.S., Li L., Bavari S., Aman M.J.: *In vivo* oligomerization and raft localization of Ebola virus protein VP40 during vesicular budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15936–15941 (2003)

61. Prehaud C., Hellebrand E., Coudrier D., Volchkov V.E., Volchkova V.A., Feldmann H., Le Guenno B., Bouloy M.: Recombinant Ebola virus nucleoprotein and glycoprotein (Gabon 94 strain) provide new tools for the detection of human infections. *J. Gen. Virol.* **79**, 2565–2572 (1998)
62. Pushko P., Bray M., Ludwig G.V., Parker M., Schmaljohn A., Sanchez A., Jahrling P.B., Smith J.F.: Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus. *Vaccine*, **19**, 142–153 (2000)
63. Rao M., Matyas G.R., Grieder F., Anderson K., Jahrling P.B., Alving C.R.: Cytotoxic T lymphocytes to Ebola Zaire virus are induced in mice by immunization with liposomes containing lipid A. *Vaccine*, **17**, 2991–2998 (1999)
64. Rao M., Bray M., Alving C.R., Jahrling P., Matyas G.R.: Induction of Immune Responses in Mice and Monkeys to Ebola Virus after Immunization with Liposome-Encapsulated Irradiated Ebola Virus: Protection in Mice Requires CD4⁺ T Cells. *J. Virol.* **76**, 9176–9185 (2002)
65. Richman D.D., Cleveland P.H., McCormick J.B., Johnson K.M.: Antigenic analysis of strains of Ebola virus: identification of two Ebola virus serotypes. *J. Infect. Dis.* **147**, 268–271 (1983)
66. Ruigrok R.W., Schoehn G., Dessen A., Forest E., Volchkov V., Dolnik O., Klenk H.D., Weissenhorn W.: Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J. Mol. Biol.* **300**, 103–112 (2000)
67. Ruiz-Arguello M.B., Goni F.M., Pereira F.B., Nieva J.L.: Phosphatidylinositol-Dependent Membrane Fusion Induced by a Putative Fusogenic Sequence of Ebola Virus. *J. Virol.* **72**, 1775–1781 (1998)
68. Saijo M., Niikura M., Morikawa S., Ksiazek T.G., Meyer R.F., Peters C.J., Kurane I.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to Ebola and Marburg Viruses Using Recombinant Nucleoproteins. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1–7 (2001)
69. Saijo M., Niikura M., Morikawa S., Kurane I.: Immunofluorescence Method for Detection of Ebola Virus Immunoglobulin G, Using HeLa Cells Which Express Recombinant Nucleoprotein. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 776–778 (2001)
70. Sanchez A., Kiley M.P., Holloway B.P., McCormick J.B., Auperin D.D.: The nucleoprotein gene of Ebola virus: cloning, sequencing, and in vitro expression. *Virology*, **170**, 81–91 (1989)
71. Sanchez A., Kiley M.P., Holloway B.P., Auperin D.D.: Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Res.* **29**, 215–240 (1993)
72. Sanchez A., Trappier S.G., Mahy B.W.J., Peters C.J., Nichol S.T.: The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3602–3607 (1996)
73. Sanchez A., Yang Z.Y., Xu L., Nabel G.J., Crews T., Peters C.J.: Biochemical Analysis of the Secreted and Virion Glycoproteins of Ebola Virus. *J. Virol.* **72**, 6442–6447 (1998)
74. Scianimanico S., Schoehn G., Timmins J., Ruigrok R.H., Klenk H.D., Weissenhorn W.: Membrane association induces a conformational change in the Ebola virus matrix protein. *EMBO J.* **19**, 6732–6741 (2000)
75. Ströher U., West E., Bugany H., Klenk H.D., Schnittler H.J., Feldmann H.: Infection and Activation of Monocytes by Marburg and Ebola Viruses. *J. Virol.* **75**, 11025–11033 (2001)
76. Sullivan N.J., Sanchez A., Rollin P.E., Yang Z.Y., Nabel G.J.: Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature*, **408**, 605–609 (2000)
77. Sullivan N.J., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Xu L., Yang Z., Roederer M., Koup R.A., Jahrling P.B., Nabel G.J.: Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature*, **424**, 681–684 (2003)
78. Takada A., Watanabe S., Okazaki K., Kida H., Kawaoka Y.: Infectivity-Enhancing Antibodies to Ebola Virus Glycoprotein. *J. Virol.* **75**, 2324–2330 (2001)
79. Vanderzanden L., Bray M., Fuller D., Roberts T., Custer D., Spik K., Jahrling P., Huggins J., Schmaljohn A., Schmaljohn C.: DNA Vaccines Expressing either the GP or NP Genes of Ebola Virus Protect Mice from Lethal Challenge. *Virology*, **246**, 134–144 (1998)
80. Villinger F., Rollin P.E., Brar S.S., Chikkala N.F., Winter J., Sundstrom J.B., Zaki S.R., Swanepoel R., Ansari A.A., Peters C.J.: Markedly elevated levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-alpha, interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha associated with fatal Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* **179**, 188–191 (1999)
81. Volchkov V.E., Becker S., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Kotov A.N., Netesov S.V., Klenk H.D.: GP mRNA of Ebola Virus Is Edited by the Ebola Virus Polymerase and by T7 and Vaccinia Virus Polymerases. *Virology*, **214**, 421–430 (1995)
82. Volchkov V.E., Feldmann H., Volchkova V.A., Klenk H.D.: Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5762–5767 (1998)
83. Volchkov V.E., Volchkova V.A., Chepurinov A.A., Blinov V.M., Dolnik O., Netesov S.V., Feldmann H.: Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J. Gen. Virol.* **80**, 355–362 (1999)
84. Volchkov V.E., Volchkova V.A., Muhlberger E., Kolesnikova L.V., Weik M., Dolnik O., Klenk H.D.: Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science*, **291**, 1965–1969 (2001)
85. Volchkova V.A., Feldmann H., Klenk H.D., Volchkov V.E.: The Nonstructural Small Glycoprotein sGP of Ebola Virus Is Secreted as an Antiparallel-Orientated Homodimer. *Virology*, **250**, 408–414 (1998)
86. Volchkova V.A., Klenk H.D., Volchkov V.E.: Delta-Peptide Is the Carboxy-Terminal Cleavage Fragment of the Nonstructural Small Glycoprotein sGP of Ebola Virus. *Virology*, **265**, 164–171 (1999)
87. Wahl-Jensen V., Kurz S.K., Hazelton P.R., Schnittler H.J., Ströher U., Burton D.R., Feldmann H.: Role of Ebola Virus Secreted Glycoproteins and Virus-Like Particles in Activation of Human Macrophages. *J. Virol.* **79**, 2413–2419 (2005)
88. Weik M., Modrof J., Klenk H.D., Becker S., Muhlberger E.: Ebola Virus VP30-Mediated Transcription Is Regulated by RNA Secondary Structure Formation. *J. Virol.* **76**, 8532–8539 (2002)
89. Wilson J.A., Bray M., Bakken R., Hart M.K.: Vaccine potential of Ebola virus VP24, VP30, VP35, and VP40 proteins. *Virology*, **286**, 384–90 (2001)
90. Wool-Lewis R.J., Bates P.: Endoproteolytic Processing of the Ebola Virus Envelope Glycoprotein: Cleavage Is Not Required for Function. *J. Virol.* **73**, 1419–1426 (1999)
91. World Health Organization. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bull. WHO*, **56**, 271–293 (1978)
92. Xu L., Sanchez A., Yang Z., Zaki S.R., Nabel E.G., Nichol S.T., Nabel G.J.: Immunization for Ebola virus infection. *Nat. Med.* **4**, 37–42 (1998)

93. Yang Z., Delgado R., Xu L., Todd R.F., Nabel E.G., Sanchez A., Nabel G.J.: Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins. *Science*, **279**, 1034–1037 (1998)
94. Yang Z.Y., Duckers H.J., Sullivan N.J., Sanchez A., Nabel E.G., Nabel G.J.: Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nat. Med.* **6**, 886–889 (2000)
95. Zaki S.R., Peters C.J. i wsp.: A novel immunohistochemical assay for the detection of Ebola virus in skin: implications for diagnosis, spread, and surveillance of Ebola hemorrhagic fever. Commission de Lutte contre les Epidemies a Kikwit. *J. Infect. Dis.* **179**, 36–47 (1999)
96. WHO website, 21 marca 2006 roku. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/index.html>
97. CDC website, 21 marca 2006 roku. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/ebola.htm>
98. NCBI website, 21 marca 2006 roku. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_filov.htm
99. ICTVdB website, 21 marca 2006 roku. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/01.025.htm>