

Katarzyna Pancer^{1*}, Włodzimierz Gut¹, Bogumiła Litwińska¹

¹Zakład Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego, Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Wpłynęło we wrześniu 2015 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Rys historyczny i charakterystyka. 2. Struktura i zmienność EBOV. 3. Rezerwuwar zwierzęcy filowirusów. 4. Podstawowe etapy cyklu życiowego wirusa Ebola w komórce. 5. Wybrane mechanizmy patogenności wirusa Ebola. 6. Paleowirusologia. 7. Podsumowanie

Filoviruses – viruses existing for millions of years – why do we have such a big outbreak now?

Abstract: Ebola virus, discovered in 1976, caused the largest epidemic among humans in 2014. In this paper, we have discussed the systematic position of *Ebolavirus*, the ecology of these viruses, the essential elements of pathogenesis of infections as well as comparative characteristics of *Filoviruses* infectious biology. According to the paleovirological data, these features were developed during millions of years of the co-evolution process and co-existence of pathogens and hosts. It is likely that changes of Ebola virus biology are not the reason for such substantial changes in the epidemiology of Ebola virus infections. Analysis of factors associated with the characteristics of the present epidemic (size, region) indicate that the main reason for such big epidemic may be the changes related to both humans activity, mainly transformation of the environment, and the ability of bats (natural hosts of *Filoviruses*) to adapt to the new ecological conditions. These processes may cause more outbreaks in the future, also on a large scale, and require taking appropriate actions to reduce the risks.

1. History and characteristics of filoviruses. 2. The structure and variability of EBOV. 3. Animal reservoir of *Filoviruses*. 4. Basics of the Ebola virus life cycle in the cell. 5. Selected mechanisms of pathogenicity of Ebola virus. 6. *Filovirus* paleovirology. 7. Summary

Słowa kluczowe: rezerwuwar i ekologia filowirusów, budowa wirusa a patogenezę zakażeń wirusem Ebola, paleowirusologia filowirusów
Key words: reservoir and ecology of *Filoviruses*, *Ebolavirus* structure and pathogenesis of infection, *Filovirus* paleovirology

1. Rys historyczny i charakterystyka

W 1967 r. opisano pierwsze ognisko gorączki krwotocznej wywołanej przez filowirusy, w tym przypadku przez wirus Marburg [10]. Ognisko gorączki Marburg (MVD) wystąpiło w 3 miastach w Niemczech (Frankfurt, Hamburg, Marburg) oraz w Belgradzie (obecnie Serbia), a źródłem były zakażone małpy (*Chlorocebus aethiops*) przywiezione z Ugandy. Kolejne zachorowania/ogniska MVD obserwowane były głównie w Afryce, szczególnie w Ugandzie oraz Demokratycznej Republice Konga [10, 49]. Najczęściej w ogniskach MVD odnotowywano niewielką liczbę chorych. Wyjątek stanowi ognisko w Angoli w 2005 r., w którym u 374 chorych potwierdzono MDV, a umieralność wynosiła aż 88% [10].

Pierwsze ognisko zachorowań wywołanych przez wirus Ebola (EVD) opisano w 1976 r. w Zairze (obecnie Demokratyczna Republika Konga; DRC); czynnik etiologiczny nazwano *Zaire ebolavirus* (ZEBOV). Kolejne ognisko EVD stwierdzono w tym samym roku w Sudanie wywołane przez *Sudan ebolavirus* (SEBOV/SUDV¹). W 1989 r. opisano kolejny gatunek należący do rodzaju Ebola – *Reston ebolavirus* (REBOV/RSTV),

który wywoływał zachorowania u świń i małp, ale nie u ludzi [10]. Kolejnym gatunkiem był *Ivory Coast ebolavirus* (CIEBOV), obecnie zwany *Tai Forest ebolavirus* (TEBOV/TAFV), który spowodował zachorowania wśród szympanсів w rezerwacie Tai Forest na Wybrzeżu Kości Słoniowej w 1994 r., oraz pojedyncze zachorowania u ludzi [30, 49]. Ostatnim opisanym gatunkiem rodzaju Ebola jest *Bundibugyo ebolavirus* (BEBOV/BDBV), który w 2007 r. był przyczyną zachorowań w Ugandzie [42]. Łącznie, do 2013 r. WHO zanotowało 23 ogniska EVD, a spośród 2329 zgłoszonych zachorowań 1562 zakończyły się zgonem pacjenta czyli średnia umieralność wynosiła 67% [31, 49].

W Europie, w XX wieku, wystąpiły nieliczne i wyłącznie importowane zakażenia filowirusami. Jednak w 2002 r. stwierdzono, że w Południowej Europie występuje wirus zaliczany do filowirusów, *Lloviu cuevavirus* (LLUV), który w Południowej Francji wywołał zachorowania u nietoperzy *Miniopterus schreibersii* [34]. Do tej pory nie stwierdzono u ludzi zakażeń wywołanych tym wirusem.

Aktualnie do rodziny *Filoviridae* zaliczanych jest 7 gatunków wirusów. Aktualna systematyka filowirusów przedstawia się następująco:

¹ Obecnie brak jest ujednoliconych skrótów nazw gatunkowych filowirusów. W pracy przedstawiono 2 najczęściej stosowane przez naukowców z ośrodków referencyjnych.

* Autor korespondencyjny: Laboratorium BSL3 oraz Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 22 5421308; e-mail: kpancer@pzh.gov.pl

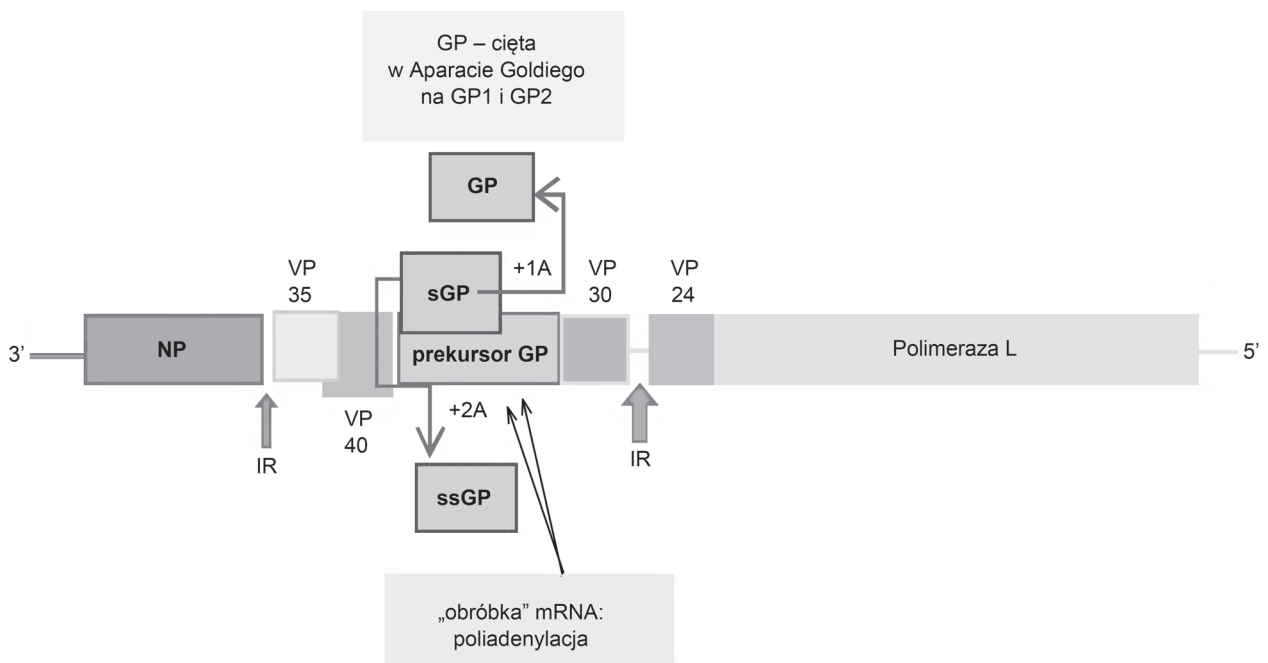
Rząd: *Mononegavirales*
Rodzina: *Filoviridae*
Rodzaj: *Ebolavirus*
 Gatunek: *Zair ebolavirus* (ZEBOV),
 Gatunek: *Sudan ebolavirus* (SEBOV),
 Gatunek: *Tai Forest ebolavirus* (TAFV) dawniej
Coted'Ivoire ebolavirus (CIEBOV)
 Gatunek: *Bundibugyo ebolavirus* (BEBOV)
 Gatunek: *Reston ebolavirus* (REBOV)
Rodzaj: *Marburgvirus*
 Gatunek: *Marburg marburgvirus* (MARV)
Rodzaj: *Cuevavirus*
 Gatunek: *Lloviu Cuevavirus* (LLUV)

2. Struktura i zmienność EBOV

W mikroskopie elektronowym filowirusy widoczne są jako charakterystyczne, nitkowate formy. Długość cząstki wirusa może być różna (od 900 nm do 14 000 nm), ale średnica jest stała: ok. 80 nm dla *Ebolavirus* oraz 100 nm – dla *Marburgvirus*. Filowirusy są to wirusy osłonkowe, a ich genom stanowi pojedyncza, niesegmentowana, ujemnie spolaryzowana nić RNA o długości ok. 19 000 nukleotydów. W genomie filowirusów zawarta jest informacja dla 7 białek strukturalnych: nukleoproteiny (NP), białek matriksu (VP40 i VP24), kofaktora polimerazy (VP35), aktywatora transkrypcji (VP30), glikoproteiny (GP1 i GP2) oraz na końcu 5' – duży gen kodujący RNA-zależną polimerazę

RNA (L). Geny VP35 i VP40 nakładają się na siebie. Ponadto wyróżnia się dwie sekwencje międzygenowe (IR): długą, 144 nukleotydową pomiędzy VP30/VP24 oraz krótką (4–5 nukleotydów) pomiędzy genami NP/VP35. Skrócenie długiego odcinka sekwencji IR nie wpływa na transkrypcję wirusa, ale znacząco redukuje liczbę powstałych cząstek potomnych. Ponadto, kodowana jest informacja dla białka niestrukturalnego, tzw. wolnej (rozpuszczalnej) glikoproteiny (sGP oraz ssGP) [9, 31] (Rys. 1).

Badania sekwencji nukleotydowej wirusów wyizolowanych podczas epidemii EBOV w 2014 r. w Afryce Zachodniej wykazały, że wirus ten jest najbardziej zbliżony do wirusa, który wywołał zachorowania w 2004 r. w Demokratycznej Republice Konga (DRC) [7]. W czasie ostatniej epidemii wykazano również, że występują różnice w sekwencjach nukleotydowych wirusów pochodzących od różnych chorych, jak również pochodzących z różnych tkanek od tego samego pacjenta, co obrazuje zmienność wirusa. Ta cecha wirusów, zaobserwowana w 2014 r., odbiega od uprzednio opisywanych i może być wynikiem zadziałania kilku czynników. Jako jeden z nich rozważana jest zmiana charakteru epidemii z „leśnej” na „miejską”, czyli występowanie zakażeń w populacji ludzi znacznie bardziej zróżnicowanych pod względem genetycznym w porównaniu do osób żyjących w małych osadach [18]. Innym powodem obserwacji wzrostu zmienności wirusa podczas epidemii w 2014 r. może być izolowanie kwasu nukleinowego wirusa i badanie sekwencji nukleotydowej



Rys. 1. Schemat genomu wirusa Ebola; białka strukturalne i niestrukturalne (opracowanie własne)

Objaśnienia: białka strukturalne: NP – nukleoproteina; VP 35 – kofaktor polimerazy; VP 40 – białko matriksu; GP – translacyjna glikoproteina; VP 30 – kofaktor transkrypcji; VP 24 – białko matriksu; L – polimeraza RNA zależna od RNA. Białka niestrukturalne: sGP – rozpuszczalna glikoproteina, ssGP – bardzo mała glikoproteina. IR – sekwencje międzygenowe.

wej bezpośrednio z próbek materiału klinicznego, a nie z zastosowaniem etapu preselekcji jakim jest izolacja wirusa w liniach komórkowych.

Ze względu na biologię RNA wirusów, charakteryzują się one bardzo wysoką zmiennością genetyczną, jednak nie wszystkie zmiany mają istotne znaczenie dla przeżycia wirusa. Ze względu na właściwości kodu genetycznego, niektóre zmiany w sekwencji nukleotydów nie prowadzą do zmiany aminokwasu w sekwencji powstającego w procesie translacji białka – są to mutacje synonimiczne. Ponadto, także pośród zmian aminokwasu w syntezywanej cząsteczce białka (mutacje niesynonimiczne), możliwe są zmiany nie mające wpływu na właściwości tego białka (np. zamiana leucyny na izoleucynę w obszarze hydrofobowym). Analiza sekwencji wykazała, że w stosunku do szczepów wirusa Ebola Zair izolowanych podczas poprzednich epidemii, występuje 341 mutacji punktowych, w tym 35 mających wpływ na kodowany aminokwas (tzw. niesynonimicznych), 173 nie mających wpływu (tzw. synonimiczne) oraz 133 w sekwencjach niekodujących. Ponadto wśród izolatów wirusa Ebola uzyskanych od tego samego pacjenta, ale w różnym okresie choroby, stwierdzono występowanie polimorfizmu dotyczącego 55 nukleotydów (15 niesynonimicznych, 25 synonimicznych i 15 w obszarach niekodujących). Dokładna analiza zmian pozwoliła na ustalenie, że liczba dozwolonych zmian, które nie mają znaczenia dla przeżycia wirusa, wynosi 263 w tym 73 niesynonimiczne, 108 synonimiczne, 70 w obszarach niekodujących i 12 zmian ramki odczytu. Zaobserwowano także kumulację zmian w przebiegu zakażenia w obrębie genu glikoproteiny (GP). Szybkość mutacji obliczona dla EBOV wynosi $0,8 \times 10^{-3}$ na nukleotyd/na rok [18].

Niejednoznaczność kodu genetycznego, w którym większość aminokwasów może być związana z więcej niż jednym kodonem, oferuje ewolucyjną możliwość dostrojenia wydajności i dokładności wytworzenia białka, przy jednoczesnym zachowaniu tej samej sekwencji aminokwasów. Różne kodony odpowiadające tym samym aminokwasom są często uważane za „synonimiczne” (analogicznie do pojęcia mutacji synonimicznych). Należy zauważyć, że odpowiadające „synonimicznym kodonom” tRNA mogą występować w danej komórce w różnych stężeniach, a zatem wpływać na dynamikę syntezy białka. Wykorzystanie przez wirusa kodonów nie zmieniających właściwości białka często odzwierciedla wynik doboru naturalnego, służącego głównie do dostrajania wydajności i dokładności translacji. W badaniach wykazano istnienie różnych preferencji kodonów w genach EBOV i genach człowieka. Stwierdzono, że ZEBOV nie wykorzystuje tRNA występującego w ludzkich komórkach w najwyższych stężeniach, co sugeruje uniknięcie konkurencji o tRNA podczas syntezy aminokwasów wirusa [12].

3. Rezerwuar zwierzęcy filowirusów

Poszukiwania rezerwuaru zwierzęcego dla filowirusów ciągle trwają. Prowadzone są badania serologiczne w celu wykazania kontaktu badanych zwierząt z filowirusami, badania metodą RT-PCR (PCR z etapem odwrotnej transkrypcji) w celu poszukiwania genomu wirusa (RNA) w tkankach żywych lub padłych zwierząt, a także poszukuje się wirusa w tkankach zakażonych zwierząt (izolacja wirusa). Za najbardziej wiarygodne uznaje się wyniki poszukiwania genomu filowirusów metodą RT-PCR oraz izolację aktywnego wirusa. Obecnie uważa się, że obecność przeciwciał w surowicy zwierząt wskazuje na kontakt z filowirusami [35, 37, 41], ale z uwagi na możliwość występowania reakcji krzyżowych, konieczne są dalsze oznaczenia umożliwiające potwierdzenie i/lub różnicowanie zakażenia wywołanego przez poszczególne filowirusy. Krzyżowe reakcje są często obserwowane gdy stosuje się testy do poszukiwania przeciwciał przeciw VP40 oraz nukleoproteinie (NP) [26]. Stosując te antygeny można uzyskać informację o zakażeniu filowirusem, ale nie można określić którym. Prawdopodobnie zjawisko to jest także przyczyną wykrycia przeciwciał IgG skierowanych przeciw nukleoproteinie EBOV w surowicy niektórych nietoperzy owocożernych (*Rousettus leschenaultii*) w Bangladeszu, z jednoczesnym brakiem izolacji genomu wirusa Ebola lub samego wirusa [35].

Dane epidemiologiczne, wyniki badań molekularnych oraz serologicznych wskazują na nietoperze owocożerne, jako najbardziej prawdopodobnego gospodarza filowirusów [33, 36, 43]. W tabeli I przedstawiono gatunki nietoperzy owocożernych najczęściej wskazywane jako rezerwuar tych wirusów. Należy zwrócić uwagę, że osobniki należące do jednego gatunku mogą być rezerwuarem dla więcej niż jednego gatunku filowirusów. Ponadto, zasięg występowania poszczególnych gatunków nietoperzy jest bardzo różny, począwszy od niewielkiego obszaru dla *Rhinolophus eloquens*, aż do bardzo szerokiego, obejmującego kilka kontynentów, dla *Rousettus aegyptiacus*. Niektóre gatunki nietoperzy występują w ściśle określonych warunkach terenowych np. *Epomops franqueti* występuje w niewielkich grupach w nizinnych i wilgotnych lasach tropikalnych oraz terenach trawiastych niedaleko zbiorników wodnych, a inne zamieszkują bardzo różnorodne środowiska – np.: *Hypsignathus monstrosus* występujący począwszy od nizinnych, wilgotnych lasów tropikalnych, poprzez łągi, lasy bagienne namorzynowe czy palmowe do wilgotnej sawanny, aż do wysokości terenu 1800 m n.p.m. Innym ważnym czynnikiem ryzyka jest ekologia tych zwierząt. Niektóre występują w małych grupach, inne, jak np. *Eidolon helvum*, w ogromnych koloniach liczących co najmniej 100 tys. osobników. Ponadto, niektóre nietoperze wędrują w poszukiwaniu pożywienia

Tabela I
Nietoperze owocożerne jako rezerwuary filowirusów [3, 26, 33, 35, 37, 40, 50]

Gatunek nietoperza	Rezerwuarius wirusa	Występowanie nietoperzy
<i>Hypsignathus monstrosus</i> ^{*,**}	EBOV +++ MARV ++	Szeroko rozpowszechniony w Zachodniej i Centralnej Afryce
<i>Epomops franqueti</i> ^{**}	EBOV +++ MARV ++	Szeroko rozpowszechniony w Afryce Zach. i Centr. z nielicznymi stanowiskami w Afryce Wschodniej
<i>Rousettus aegyptiacus</i> ^{*,#} (Rudawka nilowa)	EBOV +++ MARV +++ REBOV+	Bardzo szeroki zasięg występowania: Afryka, (z wyj. Sahary), Bliski Wschód, aż po Pakistan i Płn. Indie. Cypr, Śródziemn. Turcja, Liban, Izrael; Płw. Arabski
<i>Myonycteris torquata</i> ^{**}	EBOV +++	Rozpowszechniony w Zach. Afryce oraz w Afryce Środkowej. Także Angola, Płn. Zambia, Rwanda
<i>Epomorphorus gambianus</i>	EBOV +	Afryka: pas począwszy od Senegalu na zachodzie poprzez obszary Afryki Centralnej aż do Etiopii na wschodzie
<i>Eidolon helvum</i>	EBOV+	Znaczne obszary Afryki od sub-saharyjskiej oraz Zach i Centr. aż po Pd-Wschodnią. Także Płw. Arabski i Madagaskar
<i>Rhinolophus eloquens</i> [*]	MARV++	niewielki obszar Centr. i Wsch. Afryki
<i>Miniopterus inflatus</i> [*]	MARV++	Afryka sub-saharyjska oraz Zach., Centr. Wsch. i Południowa (Namibia, Zimbabwe i Mozambik)
<i>Miniopterus schreibersii</i> ^{***}	LLUV++ REBOV+	Począwszy od Pd-Zach. Europy, poprzez Płn. i Zach. Afrykę aż po Bliski Wschód i Kaukaz

* wykrycie genomu MARV; ** wykrycie genomu EBOV; *** wykrycie genomu LLUV; # izolacja wirusa MARV

pokonując duże odległości (np. *Epomorphorus gambianus*), a u innych charakterystyczną cechą jest migracja młodych samców (np. *Myonycteris torquata*). Większość spośród badanych gatunków nietoperzy owocożernych wykazuje znaczne zdolności adaptacyjne i spotykane są także na terenach rolniczych lub w parkach miejskich (np. *H. monstrosus*, *E. franqueti*, *R. aegyptiacus*, *M. torquata*, *E. gambianus* oraz *Miniopterus schreibersii* w Europie) [33, 34]. Oznacza to, że można spodziewać się zwiększonej liczby kontaktów między tymi zwierzętami a człowiekiem, a tym samym wzrostu ryzyka zakażeń. Niektórzy autorzy szacują, że ok. 2,5% osobników danej kolonii nietoperzy może być zakażonych filowirusami, a najbardziej narażone na zakażenie są młode osobniki, które nie posiadają odporności na infekcje wywołane tymi wirusami. Zaobserwowano związek między cyklem rozwojowym nietoperzy a występowaniem zakażeń wirusem Marburg u ludzi. Ogniska u ludzi były związane w czasie z pojawianiem się na danym terenie młodych nietoperzy [26, 34, 36, 40, 41, 50].

Obecnie uważa się, że do pierwotnego zakażenia wirusem Ebola dochodzi przede wszystkim poprzez kontakt z wydaliniami zakażonego nietoperza. Zakażeniu mogą ulec zarówno małpy naczelne, jak i afrykańskie antylopy leśne (dujkery) żywiące się owocami. Istotnym problemem, na który wielu autorów zwraca uwagę jest fakt, że wiele zwierząt, w tym szympany i goryle są nieraz dziesiątkowane w wyniku zakażenia wirusem Ebola [23, 37, 40]. W przeglądo-

wej pracy, która ukazała się w 2012 r. autorzy przeprowadzili staranną analizę danych dotyczących zakażeń filowirusami u zwierząt [37]. W analizie uwzględniano nie tylko metodę badania, wykrycie wirusa czy badanie obecności przeciwciał, ale również brano pod uwagę czy materiał do badań pochodził od odłowionych żywych zwierząt czy też były to znalezione zwłoki. Łącznie przeanalizowano informacje o 13 440 zwierzętach należących do 158 gatunków. W grupie żywych zwierząt najczęściej badano nietoperze i gryzonia i u 0,2% badanych (13/5309) stwierdzono genom wirusa EBOV. Przeciwciała dla tego wirusa wykryto u 2,2% badanych zwierząt (u 180/8050 badanych), przy czym były to przede wszystkim zwierzęta domowe, a gatunkiem u którego najczęściej wykrywano obecność przeciwciał były psy. W przypadku badań martwych zwierząt większość stanowiły zwłoki naczelników, a w okresach epidemii u ludzi obecność wirusa Ebola stwierdzono u ponad 32% badanych zwierząt [37]. Zarówno analiza epidemiologiczna jak i badania genomu wirusów wykazały istotną rolę nietoperzy jako głównego źródła pierwotnych zakażeń człowieka [17, 43], chociaż do zakażenia człowieka dochodzi prawdopodobnie rzadziej i dość przypadkowo np. poprzez kontakt ze skażonymi owocami, zakażonymi zwierzętami lub padliną [3, 33, 36, 40]. Wykazano, że po przekroczeniu bariery międzygatunkowej, choroba rozprzestrzenia się między ludźmi na drodze bezpośredniego kontaktu z osobą zakażoną. Jednak już w 1976 roku zauważano, że w trakcie epidemii leś-

nych w Sudanie ok. 5% chorych nie miało bezpośredniego kontaktu fizycznego z chorym na EVD ani z ciałami zakażonych zwierząt. Podobnie, w trakcie epidemii „miejskiej” w Kikwicie w 1995 roku (Demokratyczna Republika Kongo, dawniej Zair) zaobserwowano, że odsetek takich przypadków sięgał 17,4%. Te obserwacje sugerowały możliwość innej, niż bezpośredni kontakt, drogi transmisji wirusa. Zaczęto analizować możliwość transmisji zakażenia drogą kropelkową lub poprzez kontakt z zakażonym zwierzęciem z innych gatunków niż naczelnie i antylopy leśne. W badaniach eksperymentalnych udało się w pewnych, określonych warunkach uzyskać transmisję zakażenia drogą kropelkową, ale nie potwierdzono jej nigdy wśród ludzi [33, 38, 49].

Analizując możliwość przeniesienia zakażenia przez inne zwierzęta zwrócono uwagę na psy, które towarzyszą ludziom a żywią się często resztkami i padliną. Do tej pory u psów nie udokumentowano zachorowań wywołanych przez wirusa Ebola, natomiast badania serologiczne wskazują na możliwość zakażenia psów filowirusami oraz sugerują, że psy mogłyby być wskaźnikiem zagrożenia. Oznaczono obecność przeciwciał klasy IgG dla EBOV u psów w Afryce na terenach, na których sporadycznie występowały zakażenia u ludzi oraz tam gdzie odnotowano ogniska EVD oraz u 100 psów we Francji. Stwierdzono wysoce znamiennej zależność między obecnością IgG swoistych dla filowirusów u psów oraz częstością zakażeń u ludzi. Najwyższy odsetek wyników dodatnich u psów stwierdzono na terenach, na których odnotowano epidemie EVD (ok.25%), następnie wśród psów na terenie gdzie występowały pojedyncze zachorowania u ludzi (15%) oraz u 9% psów z miast gdzie nie odnotowano zachorowań. U psów badanych we Francji, gdzie spodziewano się uzyskać wynik bliski 0% – u 2% zwierząt wykryto przeciwciała dla EBOV [2]. Wynik ten można wytłumaczyć odkryciem w 2002 r. *Lloviu cuevavirus* na południu Francji i występowaniem reakcji krzyżowych pomiędzy przeciwciałami skierowanymi przeciw różnym filowirusom [34].

Zespół Pigott i wsp. przeanalizował zgłoszone przypadki zakażeń wirusem Ebola wśród ludzi i zwierząt (naczelnie i nietoperze) w okresie 1976–2014 w Afryce w celu określenia niszy zoonotycznej dla EVD – czyli obszaru na którym może wystąpić ryzyko zakażeń/zachorowań [40]. Wykazali oni, że zachorowania wśród ludzi często poprzedzone były przypadkami zachorowań wśród zwierząt lub występowały one równocześnie na tym samym obszarze. Analiza zasięgu występowania gatunków zwierząt, które podatne są na zakażenie (np. goryle czy szympansy) oraz gatunków nietoperzy uważanych za rezerwuuar wirusa pozwoliła autorom na stwierdzenie, że w obszarze istotnego ryzyka zamieszkuje obecnie 22 miliony ludzi. Obszar

ryzyka obejmuje przede wszystkim Afrykę Środkową oraz Zachodnią. Do tej pory ogniska EVD u ludzi zgłaszano w Sudanie, DRC, Kongu, Gabonie, Ugandzie oraz na Wybrzeżu Kości Słoniowej, Liberii, Gwinei i Sierra Leone. Zgodnie z analizą Pigotta i wsp. do krajów ryzyka należy także zaliczyć: Etiopię, Tanzanię, Mozambik, Angolę, Rep. Środkowej Afryki, Kamerun, Nigerię, Togo i Ghanę oraz Madagaskar [40]. Z tej perspektywy epidemia w Zachodniej Afryce jest zaledwie początkiem problemów [33].

4. Podstawowe etapy cyklu życiowego wirusa Ebola w komórce

Podobnie jak w przypadku innych wirusów w procesie replikacji wirusa Ebola można wyróżnić szereg etapów. Pierwszym z nich jest adsorpcja EBOV do receptorów komórki poprzez wirusową glikoproteinę GP1. Receptory komórkowe mogą być różne w zależności od typu komórek, ale istotną rolę w procesie wnikańia wirusa do komórki odgrywają lektyny oraz mucyny. Uważa się, że na szerzenie się wirusa w zakażonym organizmie ma wpływ ekspresja lektyn wiążących wirusową GP [14, 22]. Obecność lektyn jest zależna od typu komórek. Ich obecność została potwierdzona na makrofagach i komórkach dendrytycznych (DC-SIGN, hMGL), hepatocytach (ASGPR-1) oraz komórkach endotelium wątroby i węzłów chłonnych (DC-SIGNR, LSECtin). Częsteczki TIM-1 (T cell Ig mucin 1), czyli trans-membranowej glikoproteiny zawierającej domeny IgV i mucyno-podobne, wchodzi w reakcję z glikoproteiną wirusa Ebola w procesie wnikańia wirusa do komórki [22, 24, 28, 48]. Zaobserwowano, że stężenie TIM-1 na powierzchni różnych komórek jest wyraźnie skorelowane z podatnością tych komórek na zakażenie filowirusami [28].

Kolejnym etapem replikacji EBOV jest internalizacja wirusa na drodze mikropinocytozy. Proces ten jest zależny od katepsyny L i B oraz wymaga niskiego pH [13], GP1 ulega w nim cięciu do małych, 19-kDa fragmentów co z kolei pozwala na wiązanie GP1 do NPC1 (białko Niemann-Picka typu C, związane z transportem cholesterolu). Jest to szczególnie istotne w przypadku namnażania EBOV w komórkach dendrytycznych [22, 45, 49].

Następnie, w warunkach niskiego pH oraz po związaniu GP1 z NPC1, dochodzi do fuzji błony komórkowej endosomu z osłonką wirusa. Powoduje to zmianę konformacyjną GP2, co prowadzi do uwolnienia genomu wirusa oraz związanych z nim białek do cytoplazmy komórki gospodarza. Od tego momentu obserwuje się supresorowe działanie VP35 i VP24 na system odpornościowy gospodarza, polegające przede wszystkim na hamowaniu syntezy IFN [16, 22].

Uwolniony kompleks rybonukleoproteinowy (polimeraza L, nukleoproteina, VP35 i VP30) wirusa rozpoczyna transkrypcję mRNA na bazie wirusowego RNA [47]. Wirusowa polimeraza RNA zależna od RNA przeprowadza proces poliadenylacji wirusowego mRNA. Przyłączenie przy kodonach stop fragmentów poliA umożliwia tworzenie na tej samej sekwencji genomu różnych białek wirusowych. Insercja +2A prowadzi do powstania z sGP bardzo małej tzw. ssGP (super small secreted glycoprotein), insercja +1A – do utworzenia transbłonowej glikoproteiny (GP) o pełnej długości, natomiast brak insercji adeniny powoduje powstanie sGP czyli małej rozpuszczalnej glikoproteiny (small secreted glycoprotein). Obie glikoproteiny, ssGP oraz sGP, ogrywiają istotną rolę w patogenezie zakażeń EBOV [16].

Regulacja poziomu procesu transkrypcji i replikacji następuje poprzez fosforylację VP30. W utrzymaniu równowagi między transkrypcją a replikacją biorą także udział białka matriksu: VP24 i VP40. Replikacja rozpoczyna się w momencie gdy jest odpowiednia liczba cząsteczek nukleoproteiny i innych białek chroniących nowo syntezowany kwas rybonukleinowy [25].

W kolejnym etapie z nukleoproteiny, VP40, VP24 oraz VP35 formowany jest nukleokapsyd w postaci ciasno zwiniętej spirali, o stałej średnicy ok. 80 nm (*Ebolavirus*) lub 100 nm (*Marburgvirus*) [1, 32]. Po utworzeniu nukleokapsydów potomne cząstki wirusa są uwalnianie z komórki na drodze pączkowania. W tym procesie istotną rolę pełnią białka matriksu, szczególnie białko VP40, które na drodze mechanizmu ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) wchodzi w reakcję z błoną plazmatyczną [1]. Mechanizm ESCRT w niezakażonej komórce jest wykorzystywany do pełnienia takich funkcji biologicznych jak: odtwarzanie błon komórkowych, tworzenie pęcherzyków, procesów fagocytozy oraz dojrzewania cytokin.

5. Wybrane mechanizmy patogenności wirusa Ebola

Proces patogenezy u osób zakażonych wirusem Ebola stanowi doskonały przykład wykorzystywania przez wirusa wzajemnych relacji gospodarz – patogen. W czasie cyklu replikacyjnego wirusa wybrane procesy obrony organizmu przed zakażeniem są modulowane w taki sposób aby maksymalnie „oszukać” układ immunologiczny gospodarza. Ich celem jest wypracowanie warunków ułatwiających wirusowi zakażenie kolejnych komórek, tkanek i narządów, zanim uruchomione będą skuteczne mechanizmy swoistej obrony [6, 13, 14, 16, 25].

Jednym z bardzo istotnych czynników, który ułatwia rozprzestrzenianie się wirusa w zakażonym orga-

nizmie, jest zdolność wirusowego białka VP35 do hamowania syntezy i działania interferonu IFN typu I (beta/alfa). Zjawisko to pozwala na intensywne namnażanie wirusa Ebola. Oddziaływanie białka VP35 dotyczy przede wszystkim mechanizmu zależnego od RIG-1 związanego z produkcją IFN typu I oraz cytokin. RIG-1 wykazuje aktywność helikazy i należy do grupy cytoplazmatycznych receptorów (m.in. Mda-5, LGP-2) wykrywających RNA wirusowe [6, 16, 45, 46]. Po związaniu dwuniciowego RNA przez RIG-1 następuje transkrypcja IFN typu I oraz IL-6 i IL-12. Poprzez wiązanie z kompleksem replikacyjnym wirusa białko VP35 maskuje obecność dwuniciowego RNA, a tym samym nie dopuszcza do degradacji genomu przez RNAazy rozpoznające dsRNA. Ponadto VP35 ogranicza ekspresję genów związanych z produkcją małych interferujących cząstek RNA będących kolejnym mechanizmem obronnym komórki eukariotycznej przed wirusowym RNA. Białko VP35 blokując aktywność kinazy PKR (aktywowanej przez dsRNA) o przeciwwirusowej aktywności, oddziałuje ujemnie także na systemy fosforylacji np. na IRF-3, IRF-7 (interferon regulatory factor) stanowiące jeden z mechanizmów obrony komórki po aktywacji interferonem. Natomiast zjawisko supresji IFN typu I oraz II wywołane jest oddziaływaniem białka VP24, które hamuje akumulację fosforylowanego STAT 1 (aktywator transkrypcji) w jądrze zakażonej komórki. W ten sposób dochodzi do ogólnego zablokowania powstawania interferonu alfa/beta oraz gamma. W przypadku *Marburgvirusa* zdolność do supresji interferonów wykazuje VP40 [25].

Równoległe do zablokowania produkcji interferonu typu I oraz II przez oddziaływanie białek VP35 i VP24, dochodzi do akumulacji GP1 i GP2 w retikulum endoplazmatycznym. To z kolei prowadzi do aktywacji NFkappaB oraz ROS. W końcowych etapach zakażenia wirusem Ebola, wysokie stężenia GP1 i GP2 są czynnikiem obniżającym stężenie wielu białek na powierzchni komórek gospodarza, istotnych dla odpowiedzi immunologicznej i adhezji komórek. Proces ten dotyczy szeregu integryn w tym ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGAV i ITGB1. Szczególnie istotne jest oddziaływanie GP1,2 na integryny $\alpha_v\beta_3$ (receptora dla wironektyny), które pełnią ważną rolę jako receptory przy fagocytozie przez komórki makrofagowe i dendrytyczne [6].

W wyniku namnażania się wirusa w makrofagach i monocytach dochodzi do wysokiej produkcji prozapalnych cytokin i chemokin oraz ROS, co z kolei, prowadzi do dysfunkcji komórek śródbłonna, wykrzepiania wewnątrznaczyniowego i zapaści krążeniowej. ROS są to cząstki zawierające w swoim składzie atomy tlenu z niesparowanym elektronem (rodniki) lub wiązania O-O, które biorą udział w reakcjach che-

micznych odgrywających znaczącą rolę w metabolizmie i tarzeniu się organizmów żywych. Namnażanie wirusa w komórkach dendrytycznych prezentujących antygen oraz apoptoza limfocytów w wyniku aktywacji (tzw. trans infection) powoduje natomiast zaburzenia odporności, szczególnie przy wytwarzaniu EBOV-specyficznych CD8+ i CD4+ limfocytów T [4].

Niezwykle interesującą rolę w procesach patogenezy związanej z zakażeniem wirusem Ebola pełni białko sGP [4, 14]. Białko to powstaje jako dodatkowy produkt genu kodującego wirusową glikoproteinę. U wszystkich gatunków Ebola sGP powstaje w formie prekursora przekształcanego w formę dojrzałą poprzez potranslacyjne modyfikacje w systemie Golgiego.

W rezultacie tych procesów z zakażonych komórek uwalniana jest glikoproteina w postaci wolnego i niezwiązanego z wirionem homodimeru. W porównaniu do innych białek powstających w wyniku ekspresji genu glikoproteiny (GP_{1,2} i ssGP) białko to powstaje w niezwykle dużych ilościach. W warunkach replikacji w hodowli Vero proporcja powstającego sGP do GP_{1,2} i ssGP wynosi odpowiednio 74 do 24 do 5. Pod względem antygenowości białko indukuje powstawanie i reaguje z większością przeciwciał dla GP_{1,2}, z wyjątkiem przeciwciał neutralizujących wirusa Ebola [14, 16]. Można więc powiedzieć, że białko sGP stanowi swego rodzaju „cel pozorny” przekierowując odpowiedź humoralną zakażonego w kierunku przeciwciał nieefektywnych dla procesu eliminacji wirusa i zdrowienia. Inne funkcje przypisywane białku sGP to działanie na funkcjonalność systemu naczyniowego, aktywacja limfocytów niezakażonych, indukcja apoptozy limfocytów, czy blokowanie aktywności neutrofilii. Związana z receptorami dla wirusa Ebola na powierzchni wrażliwych komórek sGP, poprzez blokowanie wnikania cząstek wirusowych, może być czynnikiem regulującym szybkość rozprzestrzeniania się wirusa w zakażonym organizmie. Większość z tych oddziaływań pozostaje w sferze hipotez wymagając szczegółowego rozpracowania mechanizmów tych zjawisk [4, 6, 44].

W wyniku wszystkich przedstawionych w tym rozdziale działań wirusa dochodzi do hamowania procesów fagocytozy i zablokowania wytwarzania cytokin stanowiących ważny element nieswoistej odpowiedzi przeciwwirusowej. Cytokiny te (głównie IFN typu I i II, IL-6, IL-12) biorą udział zarówno w indukcji swoistej odpowiedzi przeciwwirusowej poprzez aktywację limfocytów B oraz T jak również w stymulacji nieswoistych czynników przeciwwirusowych. W wyniku rozregulowania systemu wytwarzania cytokin dochodzi do nadmiernej produkcji prozapalnych cytokin, co prowadzi do uszkodzenia naczyń i wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, a tym samym do uszkodzenia narządów i zapaści krążeniowej, często prowadzących do śmierci chorego [4].

6. Paleowirusologia

Paleowirusologia jest to nauka, która w historii ewolucji życia zajmuje się badaniem relacji świata wirusów i ich gospodarzy. Wykorzystuje ona między innymi informacje zawarte w endogennych wirusowych elementach (EVE), dziedziczonych przez genom gospodarza powstałych w wyniku transferu fragmentów genów wirusowych (HGT-horizontal gene transfer). Dzięki zsekwencjonowaniu licznych genomów gospodarzy oraz technikom bioinformatycznym, EVE można obecnie identyfikować i przypisywać do odpowiednich grup taksonomicznych gospodarzy i wirusów. Najnowsze badania pokazują, że niektóre EVE zostały dokooptowane jako geny komórkowe, których produkty działają często jako inhibitory namnażania się wirusów. Stanowią one pozostałość historycznych „bitew” pomiędzy patogenem a gospodarzem, których strategia doprowadziła do możliwości wykorzystywania w przyszłości informacji genetycznej wirusa w walce przeciwko spokrewnionemu wirusowi [11, 15, 21, 22, 27, 39].

Szczególnie interesującym kierunkiem badań jest poszukiwanie odpowiedzi na pytanie jakie są korzyści dla gospodarzy wynikające z obecności EVE i jakie są mechanizmy, które pozwalają na uzyskanie tych korzyści. Dowodem na ich istnienie jest fakt, że w niektórych przypadkach, długie otwarte ramki odczytu dla genów wirusowych zostały zachowane w genomie gospodarza przez miliony lat, a ich obecność koreluje z bezobjawowym przebiegiem zakażenia wywołanego przez dany gatunek/rodzaj wirusa u gospodarza posiadającego konkretny gen wirusowy. Przykład może stanowić zakażenie nietoperzy wywołane przez filowirusy. W przyszłości dalsze badania pozwolą nie tylko na wyjaśnienie dlaczego niektóre gatunki nietoperzy wydają się być „odporne na zakażenie”, ale mogą również pozwolić na identyfikację nowych, nieznanych jeszcze filowirusów [8].

Znaczenie EVE dla procesów ewolucyjnych zostało niezwykle interesująco przedstawione w pracy Aswada i Katzorakis'a, którzy z punktu widzenia patogenezy zakażenia wirusowego, przedstawili udział EVE pochodzących z filowirusów w tym procesie [5]. Wskazali oni, że prawie wszystkie EVE wskazujące homologię z genomem RNA wirusów o jednoniciowym genomie odpowiadają wirusowemu genowi nukleoproteiny, a więc genowi odpowiadającemu za syntezę białka zabezpieczającego genom wirusa przed degradacją.

W popularnej literaturze homologi genów wirusa zawarte w genomach gospodarzy określa się jako wirusowe skamieniałości [21]. Najbardziej zaskakujące skamieniałości wirusowe nie dotyczą DNA wirusów czy retrowirusowego RNA, ale RNA wirusów, które w swoim cyklu replikacyjnym nie są zdolne do

przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji. W genomie gospodarzy stwierdzono odcinki cDNA odpowiadające genom RNA wirusów zakwalifikowanych do różnych rodzin takich jak: *Bornaviridae* [8, 15], *Flaviviridae* [8], *Orthomyxoviridae* [8], *Bunyaviridae* (Phleboviruses) [7] oraz *Rhabdoviridae* [8]. Dotyczy to również filowirusów, dla których naturalnymi gospodarzami są nietoperze. Zakażenie u tych zwierząt ma łagodny lub bezobjawowy charakter. Cechą charakterystyczną nietoperzy jest posiadanie wbudowanego w genom fragmentu cDNA przepisane z RNA genomu filowirusów. Obserwacja ta nie tylko potwierdziła hipotezę o roli nietoperzy w przenoszeniu zakażeń wywołanych przez różne gatunki *Mononegavirales*, ale otworzyła dwa niezwykle ciekawe kierunki badań. Pierwszy z nich to analiza udziału cząsteczek mikro-RNA w obronie gospodarza przed patogenem [5]. Drugi nowy kierunek badań to analiza naturalnej historii wirusów i ich relacji z gospodarzami [39].

W badaniach prowadzonych na układzie nietoperze – filowirusy okazało się, że relacja ta oparta jest na wbudowaniu do genomu nietoperzy fragmentu cDNA homologicznego do fragmentu genomu filowirusów. Wbudowany fragment cDNA odpowiada genowi białka nukleoproteiny (NP) lub białka VP35. Są to więc fragmenty cDNA homologiczne do części genomu filowirusów kodującej białka związane z hamowaniem odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie. W przypadku cDNA wbudowanego w genom gospodarza komplementarnego do wirusowego genu VP35, transkrypt tego genu jest antagonistą wirusowego genu białka VP35, które odpowiedzialne jest za hamowanie produkcji interferonu u gospodarza we wczesnym okresie zakażenia. Zablokowanie syntezy białka VP35 powoduje, że wirus nie może hamować syntezy interferonu, a wysoki poziom interferonu we wczesnym okresie zakażenia powoduje, że w znacznym stopniu hamowana jest replikacja wirusa. Wydaje się, że dzięki temu zakażenie nietoperzy filowirusami jest znacznie ograniczone i złagodzone do postaci bezobjawowej ale połączonej z wydalaniem zakaźnego wirusa. Uważa się, że istotną rolę odgrywają tu cząsteczki mikroRNA interferujące z produktami genomu wirusa [25, 34, 45].

Wyjątkowe EVE występuje u torbaczy i odpowiada fragmentowi kodującemu polimerazę RNA zależną od RNA (L). Niezależnie od mechanizmu działania taki dobór EVE wskazuje na tendencję do opóźniania procesów namnażania wirusa aż do momentu uruchomienia swoistych mechanizmów obrony pozwalających na uzyskanie przez gospodarza ochrony przed powtórными zakażeniami. Odbiega to w istotny sposób od strategii użycia interferujących RNA zastosowanej w leczeniu zakażeń wirusem Ebola, gdzie lekiem jest homolog wirusowej glikoproteiny [52].

7. Podsumowanie

Podsumowując, wypracowany poprzez miliony lat system współistnienia filowirusów i ich gospodarzy opiera się na hamowaniu tempa replikacji patogenu poprzez antagonistyczne oddziaływanie zintegrowanych z genomem gospodarza homologów genów wirusa, szczególnie istotnych dla procesu replikacji wirusa w zakażonych komórkach gospodarza. Taki układ daje czas gospodarzowi na wytworzenie swoistej odpowiedzi immunologicznej przeciwko określonemu wirusowi, która nie tylko eliminuje bieżące zakażenie, ale również zabezpiecza przed konsekwencjami przyszłych kontaktów z danym patogenem.

W przypadku człowieka oraz małp naczelnych, nie stwierdzono w ich genomach obszarów homologicznych dla genów filowirusów. Powoduje to, że wymienione patogeny mogą bez przeszkód namnażać się we wrażliwych komórkach gospodarza. Taka intensywna replikacja wirusa, poprzedzająca wytworzenie skutecznej, swoistej odpowiedzi na zakażenie prowadzi, w wielu przypadkach, do zgonu gospodarza. Przykładem tego jest wyjątkowych rozmiarów epidemia EVD w Afryce Zachodniej, która rozpoczęła się najprawdopodobniej w grudniu 2013 roku i do końca 2015 r. nie została wygaszona [20, 44, 51]. Na tak duży rozmiar epidemii niewątpliwie wpłynęło wiele czynników, ale głównych przyczyn można dopatrywać się w połączeniu kulturowych i społecznych zachowań, nie pomijając uwarunkowań gospodarczych. Przeprowadzona przez Grotto i Ricci metaanaliza wskazuje, że głównymi czynnikami wpływającymi na powstanie aktualnej epidemii są zarówno zmiany populacyjne wśród zwierząt, jak i wyniki takich działań człowieka jak deforestacja, łowiectwo oraz formy sprawiania i wykorzystania pozyskanej zwierzyny do celów spożywczych [19]. Obserwowane przekształcenia ekosystemu wpływają na większe prawdopodobieństwo kontaktu człowieka z wirusem, a nakładające się na te zmiany słabość służby zdrowia i czynniki kulturowe [31] powodują nie tylko rozległość aktualnej epidemii EVD, ale wskazują na zwiększanie się ryzyka powstawania nowych ognisk. Sygnałem ostrzegawczym była epidemia zakażeń wirusem Marburg w Angoli, która wielkością odpowiadała epidemiom gorączki Ebola [49]. Zasięg epidemii EVD w Afryce Zachodniej wskazuje na konieczność uruchomienia czułych systemów umożliwiających identyfikację i przerwanie szerzenia się choroby w bardzo krótkim okresie od momentu zakażenia przypadku „0”, niezależnie od charakteru źródła tego zakażenia.

Piśmiennictwo

1. Adu-Gyamfi E., Soni S.P., Jee C.S., Digman M.A., Gratton E., Stahelin R.V.: A loop region in the N-terminal domain of Ebola

- virus VP40 is important in viral assembly, budding, and egress. *Viruses*, **6**, 3837–3854 (2014)
2. Allela L., Bourry O., Pouillot R., Délicat A., Yaba P., Rouquet B.K.P., J-P. Gonzalez, Leroy E.M.: Ebola virus antibody prevalence in dogs and human risk. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 385–390 (2005)
 3. Amman B.R., Towner J.S. i wsp.: Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile *Rousettus aegyptiacus* bats coincide with periods of increased risk of human infection. *PLoS Pathog.* **8**: e1002877 (2012)
 4. Ansari A.A.: Clinical features and pathobiology of Ebolavirus infection. *J. Autoimmun.* **55**, 1–9 (2014)
 5. Aswad A., Katzourakis A.: Paleovirology and virally derived immunity. *Trends Ecol. Evol.* **27**, 627–636 (2012)
 6. Basler C.F.: Innate immune evasion by filoviruses. *Virology*, DOI: 10.1016/j.virol.2015.03.030 (2015)
 7. Ballinger M.J., Bruenn J.A., Kotov A.A., Taylor D.J.: Selectively maintained paleoviruses in Holarctic water fleas reveal an ancient origin for phleboviruses. *Virology*, **446**, 276–282 (2013)
 8. Belyi V.A., Levine A.J., Skalka A.M.: Unexpected Inheritance: Multiple integrations of ancient bornavirus and Ebolavirus/Marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathog.* **6**, e1001030 (2010)
 9. Brauburger K., Boehmann Y., Tsuda Y., Hoenen T., Olejnik J., Schümann M., Ebihara H., Mühlberger E.: Analysis of the highly diverse gene borders in Ebola virus reveals a distinct mechanism of transcriptional regulation. *J. Virol.* **88**, 12558–12571 (2014)
 10. Brauburger K., Hume A.J., Mühlberger E., Olejnik J.: Forty-five years of Marburg virus research. *Viruses*, **4**, 1878–1927 (2012)
 11. Chiba S., Kondo H., Tani A., Saisho D., Sakamoto W., Kanematsu S., Suzuki N.: Widespread endogenization of genome sequences of non-retroviral RNA viruses into plant genomes. *PLoS Pathog.* **7**, e1002146 (2011)
 12. Cristinaa J., Morena P., Moratorio G., Mustoc H.: Genome-wide analysis of codon usage bias in Ebolavirus. *Virus Res.* **196**, 87–93 (2015)
 13. Dahlmann F., Hofmann-Winkler H. i wsp.: Analysis of Ebola virus entry into macrophages. *J. Infect. Dis.* DOI: 10.1093/infdis/jiv140 (2015)
 14. de la Vega M.-R., Wong G., Kobinger G.P., Xiangguo Qiu: The multiple roles of sGP in Ebola pathogenesis. *Viral. Immunol.* **28**, 3–9 (2015)
 15. Emerman M., Malik H.S.: Paleovirology – modern consequences of ancient viruses. *PLoS Biol.* **8**, e1000301 (2010)
 16. Feldmann H., Geisbert T.W.: Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*, **377**, 849–862 (2011)
 17. Formenty P., Boesch C., Wyers M., Steiner C., Donati F., Dind D., Walker F., Le Guenno B.: Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Côte d'Ivoire. *J. Infect. Dis.* **179 Suppl 1**, 120–126 (1999)
 18. Gire S.K., Sabeti P.C. i wsp.: Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*, **345**, 1369 (2014)
 19. Grotto E and Ricci D: Identification and analysis of the main drivers for Ebola virus.spillover. *SciencesPo MediaLab.* 1–40 (2015)
 20. Gut W., Pancer K.: Filowirusy – wybrane problemy na te epidemii wywołanej wirusem Ebola. *Przegl. Epidemiol.* **69**, 15–22 (2015)
 21. Harmon K.: Ancient “Fossil” virus shows infection to be millions of years old. *Scientific American*, <http://www.scientificamerican.com/article/fossil-virus-bird-genome> (31.12.2015)
 22. Hofmann-Winkler H., Kaup F., Pöhlmann S.: Host cell factors in filovirus entry: novel players, new insights. *Viruses*, **4**, 3336–3362 (2012)
 23. Huijbregts B., De Wachter P., Ndong Obiang S., Akou Ella M. Ebola and the decline of gorilla Gorilla gorilla and chimpanzee Pan troglodytes populations in Minkebe forest, northeastern Gabon. *Oryx*, **37**, 437–443 (2003)
 24. Hunt C.L., Lennemann N.J., Maury W.: Filovirus Entry: A novelty in the viral fusion world. *Viruses*, **4**, 258–275 (2012)
 25. Ilinykh P.A., Lubaki N.M., Widen S.G., Renn L.A., Theisen T.C., Rabin R.L., Wood T.G., Bukreyev A.: Different temporal effects of Ebola virus VP35 and VP24 proteins on the global gene expression in human dendritic cells. *J. Virol.* **89**, 7567–7583 (2015)
 26. Kamata T., Natesan M., Warfield K., Aman M.J., Ulrich R.G.: Determination of specific antibody responses to the six species of Ebola and Marburg viruses by multiplexed protein microarrays. *Clin. Vaccine Immunol.* **21**, 605–612. (2014)
 27. Katzourakis A., Gifford R.J.: Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet.* **6**, e1001191 (2010)
 28. Kondratowicz A.S., Maury W. i wsp.: T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8426–8431 (2011)
 29. Kuroda M., Takada A. i wsp.: The interaction between TIM-1 and NPC1 is important for the cellular entry of Ebola virus. *J. Virol.* **89**, 6481–6493 (2015)
 30. Le Guenno B., Formenty P., Wyers M., Gounon P., Walker F., Boesch C.: Isolation and partial characterization virus. *Lancet*, **345**, 1271–1274 (1995)
 31. Leroy E.M., Gonzalez J-P., Baize S.: Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but a relatively minor public health threat for Africa. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 964–976 (2011)
 32. Mehedi M., Falzarano D., Seebach J., Hu X., Carpenter M.S., Schnittler H.J., Feldmann H.: A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing. *J. Virol.* **85**, 5406–5414 (2011)
 33. Moratelli R., Calisher C.H.: Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **110**, 1–22 (2015)
 34. Negrodo A., Tenorio A. i wsp.: Discovery of an ebolavirus-like filovirus in Europe. *PLoS Pathog.* **7**, e1002304 (2011)
 35. Olival K.J., Daszak P. i wsp.: Ebola virus antibodies in fruit bats, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 270–273 (2013)
 36. Olival K.J., Hayman D.T.: Filoviruses in bats: current knowledge and future directions. *Viruses*, **6**, 1759–1788 (2014)
 37. Olson S.H., Reed P., Cameron K.N., Ssebide B.J., Johnson C.K., Morse S.S., Karesh W.B., Mazet J.A.K., Joly D.O.: Dead or alive: animal sampling during Ebola hemorrhagic fever outbreaks in humans. *Emerg. Health Threats J.* **5**, 9134 (2012)
 38. Osterholm M.T., Kobinger G.P. wsp.: Transmission of Ebola viruses: what we know and what we do not know. *mBio*, **6**, e00137–15 (2015)
 39. Patel M.R., Emerman M., Malik H.S.: Paleovirology – ghosts and gifts of viruses past. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 304–309 (2011)
 40. Pigott D.M., Hay S.I. i wsp.: Mapping the zoonotic niche of Ebola virus disease in Africa. *Elife*, **3**, e04395 (2014)
 41. Pourrut X., Souris M., Towner J.S., Rollin P.E., Nichol S.T., Gonzalez J.P., Leroy E.: Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus*. *BMC Infect. Dis.* **9**, 159 (2009)
 42. Roddy P., Borchert M, i wsp.: Clinical manifestations and case management of Ebola haemorrhagic fever caused by a newly identified virus strain, Bundibugyo, Uganda, 2007–2008. *PLoS One*, **7**, e52986 (2012)
 43. Saéz A.M., Leendertz F.H. i wsp.: Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. *EMBO Mol. Med.* **7**, 17–23 (2015)

44. Stahelin R.V.: The Ebolavirus: from basic research to a global crisis. *PLoS Pathog.* **11**, e1005093 (2015)
45. Tang Y., Leao I.C., Coleman E.M., Broughton R.S., Hildreth J.E.: Deficiency of Niemann-Pick type C-1 protein impairs release of human immunodeficiency virus type 1 and results in Gag accumulation in late endosomal/lysosomal compartments. *J. Virol.* **83**, 7982–7995 (2009)
46. Taro Kawai and Shizuo Akira: “Toll-like receptor and RIG-1-like receptor signaling” *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1143**, 1–20 (2008)
47. Trunschke M., Conrad D., Enterlein S., Olejnik J., Brauburger K., Mühlberger E.: The L-VP35 and L-L interaction domains reside in the amino terminus of the Ebola virus L protein and are potential targets for antivirals. *Virology*, **44**, 1135–1145 (2013)
48. White J.M., Schornberg K.L.: A new player in the puzzle of filovirus entry. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 317–322(2012)
49. World Health Organization: EBOLA STRATEGY. Ebola and Marburg virus disease epidemics: preparedness, alert, control, and evaluation, 10.2014, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/130160/1/WHO_HSE_PED_CED_2014.05_eng.pdf?ua=1&ua=1 (31.12.2015)
50. World Health Organization: What we know about transmission of the Ebola virus among humans. Ebola situation assessment, 06.10.2014, <http://www.who.int/mediacentre/news/ebola/06-october-2014> (31.12.2015)
51. Wróblewska M., Pancer K.: Zakażenia wirusem Ebola – epidemiologia, postępowanie z pacjentem i diagnostyka laboratoryjne zakażeń, *Zakażenia*, **4**, 19–29 (2014)
52. Yan J., Gao G.F.: MicroRNAs: the novel targets for Ebola drugs. *China Life Sci.* **57**, 985–986 (2014)