

于非致死病例,提示该项指标可能与 EVD 致死结局相关^[5-6]。

1.3.2 血清学检查 最早可在患者临床症状出现后 7~10 d,从血清中检出特异性 IgM、IgG 抗体。IgM 抗体的检出期可持续约 3 个月,而 IgG 抗体可维持更长时间。多数患者的病毒抗体出现于起病后 10~14 d,也有重症患者始终未能检出抗体,故 IgG 抗体检测主要用于血清流行病学调查,IgM 抗体则可作为近期感染的血清学检测指标,但不能满足早期诊断的需要。

在 EVD 免疫诊断方法出现早期,一般采用间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence,IFA)检测血清抗体,所用诊断抗原是从病毒感染细胞中提取的病毒抗原^[7]。IFA 不仅用于恢复期患者血清抗体的检测,也用于流行病学调查。由于从病毒感染的细胞中提取抗原存在感染风险,因此必须在生物安全等级 4 级(biosafety level 4,BSL-4)实验室进行,这种要求限制了这类诊断抗原的制备,也影响了相应检测方法的推广应用。因此,有必要用重组抗原替代上述病毒抗原。据报道,以基因重组核蛋白(nucleoprotein,NP)或糖蛋白(glycoprotein,GP)为诊断抗原,用酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)法检测血清 IgG 和 IgM 抗体,结果显示,采用大肠杆菌表达的重组 NP 和采用杆状病毒表达的重组 GP 均与 7 份 EVD 患者血清发生免疫反应,而与 22 份已知阴性对照血清反应呈阴性^[8]。该研究表明,用重组抗原可以建立敏感性和特异性很高的 ELISA 检测方法。由于埃博拉病毒核抗原羧基端肽段具有较强的抗原活性,因此可采用重组表达的 NP 抗原活性区肽段作为诊断抗原,用于血清 IgG 抗体的 ELISA 检测^[9]。

有研究采用基因重组技术将埃博拉病毒 NP 基因通过杆状病毒或表达载体 pKS336 转入 Hela 细胞,使其表达重组 NP,然后采用这种重组 Hela 细胞为固相抗原,用免疫荧光法检测血清抗体,结果显示,这种检测方法具有很高的敏感性和特异性^[10-11]。

此外,有研究应用基因组学方法,研究了病毒基因突变与致死性的关系,发现致死性病毒表型的出现需要病毒 NP 基因突变的作用,首次筛选出能反映埃博拉病毒致死性的分子遗传标志^[12]。另有研究显示,EVD 患者的病情转归与宿主的自然杀伤细胞的表型有关,即 KIR2DS1 和 KIR2DS3 基因激活与致死结局存在相关性^[13]。在诊断埃博拉病毒感染时,检测这些分子标志物对预测疾病严重性和预后具有参考价值。

1.3.3 病原学检测

1.3.3.1 病毒抗原检测 由于 EVD 患者有高滴度的病毒血症,因此可采用检测血清中病毒抗原的方法诊断 EVD。据报道,在感染者血清抗体出现之前,已可检出血清中病毒抗原^[14],因此,检测血清病毒抗原比检测抗体更适用于 EVD 的早期诊断。在 1995~2000 年非洲多次 EVD 流行中,捕捉抗原的 ELISA 检测方法被证实为诊断 EVD 的高效方法^[14]。已研制出多种可用于血清抗原检测的单克隆抗体、血清抗体^[14]和 ELISA 检测系统^[15]。检测的靶抗原包括病毒 NP、病毒基质蛋白 40(virus matrix protein 40,VP40)和 GP。有研究采用抗埃博拉病毒和马尔堡病毒(Marburg virus,MARV)重组抗原重组 NPs 的单克隆抗体建立了丝状病毒感染的 ELISA 检测方法^[15-16]。据报道,埃博拉病毒 NPs 分子中位于羧基端的一半肽段具有抗原活性,尤其是近羧基端长为 110 和 102 个氨基酸的肽段具有较强的抗原性^[17]。所有用于捕捉埃博拉病毒抗原的单克隆抗体均与近羧基端的抗原表位发生反应,但有些抗体结合的是抗原的构象表位,而有些结合的则是线性表位^[15-16]。上述研究表明,以病毒抗原为检测对象的 ELISA 检测方法可准确快速诊断 EVD。

随着纳米技术发展,出现了从痰液或血清等复杂介质中捕捉和鉴定病毒粒子的方法。有研究应用抗体芯片技术,对混有野生型水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus,VSV)、缺陷病毒、埃博拉病毒假型化病毒和马尔堡假型化病毒的血清和全血样本进行检测,结果显示,检测埃博拉病毒和马尔堡假型病毒的敏感性可达 5×10^6 pfu \cdot L⁻¹^[18]。

1.3.3.2 核酸检测 可采用反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)和实时定量 RT-PCR 等方法检测埃博拉病毒核酸分子。一般可在患者发病后 1 周内的血清中检出病毒核酸。RT-PCR 方法是在 1995~2000 年刚果、加蓬和乌甘达等地区的 EVD 流行中发展起来,已被证实具有较好的检测效果^[19]。此后,实时定量 RT-PCR 方法也被用于诊断检测^[19-20]。另有研究采用产生荧光的 TaqMan 探针,5'端用 6-羧基荧光素标记,3'端采用淬灭标签,建立了基于 TaqMan 探针的定量 RT-PCR^[19]。

探索保守性强、特异性高的引物和探针是提高核酸检测方法敏感性和特异性的关键。通过序列比对从埃博拉病毒和 MARV 基因组中筛选出高度保守的序列,分别设计引物及 TaqMan 探针,2 条探针分别用不同的荧光报告基因标记,建立双重实时荧光定量 PCR 反应体系。结果显示,用这种方法检测

2 种病毒阳性标准品的灵敏度分别为 3.05×10^7 pfu · L⁻¹ 和 2.86×10^7 pfu · L⁻¹, 且与日本脑炎病毒、黄热病毒及登革热病毒无交叉反应^[21]。

据报道,分别采用 ELISA 和 RT-PCR 方法检测口腔液和血液样品中特异性 IgG 抗体、病毒抗原和病毒核酸,比较 2 种方法的检测效果,结果显示,血清免疫反应阳性患者的口腔液样本免疫反应呈阴性,而所有患者的血清样本和口腔液样本的 RT-PCR 检测结果一致,表明 RT-PCR 方法的敏感性更高^[22]。

尽管分子生物学诊断技术被证实具有较高的敏感性、特异性和高效性,但假阳性和假阴性始终不能排除,而且同一种检测方法在不同实验室的检测效果也不一致,对此应予以重视。

1.3.3.3 病毒分离 在具备生物安全条件的实验室(BSL-4 实验室),病毒分离是一种基本的、简单而敏感的检测埃博拉病毒感染的方法。可采集发病 1 周内患者血清标本,用 Veto 或 Vero E6 细胞进行病毒分离。病毒主要存在于患者或病猴的血液、肝脏、血清或精液中,取上述材料接种细胞,培养 5 ~ 7 d 后,经免疫荧光染色后镜检,可观察到培养细胞中的病毒抗原。也可将病毒接种至豚鼠腹腔或乳鼠脑内,致动物感染,继而从动物组织中分离和鉴定病毒^[23]。

由于在 EVD 流行区多不具有开展上述实验的生物安全条件,标本只有通过冷链运送到距离较远的发达国家才能进行病毒分离和病原学鉴定,因此诊断 EVD 标准不能限定为分离得到埃博拉病毒。应用多种抗重组核蛋白 NPs 的单克隆抗体,可以对埃博拉病毒分离株进行血清学鉴定^[15-16,19]。

1.3.3.4 组织学检查和电镜技术 组织学检查包括病理组织学检查和免疫组织化学分析等。免疫组织化学分析是敏感的检测方法,特别适用于死后诊断^[24]。而应用电镜技术可对组织中埃博拉病毒进行形态观察和鉴定。此外,由于人类白细胞抗原 B (human leukocyte antigen-B, HLA-B) 基因型与致死性结局存在相关性,因此,检测 HLA-B 基因型对预测患者预后具有参考价值^[25]。

1.4 诊断依据 EVD 的诊断应依据患者临床表现、流行病学和实验室检查结果。实验室检测结果是确诊 EVD 的重要依据。

疑似病例:来自于疫区,或 3 周内疫区旅行史,或有与患者、感染动物接触史,且具有起病急、发热、牙龈出血、鼻出血、结膜充血、淤点和淤斑、血便等出血症状及头痛、呕吐、恶心、腹泻、全身肌肉或关节疼痛等临床表现。

以下任 1 项检测呈阳性者为确诊病例:病毒抗原阳性;血清特异性 IgM 抗体阳性;恢复期血清特异性 IgG 抗体滴度比急性期增高 4 倍以上;从患者标本中检出埃博拉病毒 RNA;从患者标本中分离到埃博拉病毒。

2 埃博拉病毒感染的治疗

目前对 EVD 尚缺乏特效治疗方法,主要采用对症和支持治疗,包括维持水、电解质平衡,预防和控制出血,控制继发感染,治疗肾衰竭、出血和弥散性血管内凝血等并发症。埃博拉病毒感染后抗病毒药物治疗无效。虽然有研究者报道,以每天 600 万单位的白细胞干扰素连续使用 4 d,治疗 1 例实验室感染者,并结合采用 450 mL EVD 恢复期患者血浆治愈了该病例^[26],但一般认为采用干扰素治疗 EVD 无效。

据文献报道,采用一种凝血抑制剂(rNAPc2)治疗被病毒感染的猕猴,可对 33% 猕猴产生保护作用,而 rNAPc2 对人类感染无治疗效果。采用吗啉反义寡核苷酸类药物治疗猕猴埃博拉病毒感染,可使 75% 感染的猕猴存活^[27]。研究显示,一种携带短链干扰 RNAs 的核酸脂质微粒(SNALPs)能阻止病毒在猴体内复制^[28-29]。

病毒蛋白 VP35 能够与双链 RNA 结合,具有多种功能,包括参与病毒复制、对固有免疫的逃避和致病机制。这种蛋白的多功能能为建立抗病毒方法提供了条件。研究发现,在 VP35 C 末端可与 dsRNA 结合的干扰素抑制区(interferon inhibitory domain, IID)中存在保守碱基序列,这些序列对 VP35 介导的干扰素(interferon, IFN)抑制和病毒聚合酶辅助因子功能具有重要作用。有研究制备了一组能够与埃博拉病毒 VP35 IID 特定区域结合的核酸适配子,这些适配子与 VP35 IID 结合时具有很高的亲和力和特异性,能够阻断 eVP35-NP 相互作用,抑制病毒聚合酶复合体的功能,而产生抗病毒感染的作用^[30]。

埃博拉病毒对宿主细胞的入侵依赖组织蛋白酶 L 的作用,病毒 GP 需要经蛋白酶切割才具有与宿主细胞膜融合的活性。有研究筛选出具有抑制组织蛋白酶 L 对病毒多肽分子切割作用的小分子多肽,并证实这种多肽具有广谱抗病毒作用^[31]。

有研究构建了反义磷酸二胺吗啉代寡核苷酸(phosphorodiamidate morpholino oligomers, PMOs) AVI-6002(含 AVI-7357 和 AVI-7539), AVI-7357 可与其靶埃博拉病毒 VP24 基因结合,产生抗埃博拉病毒作用,目前已作为理想的治疗候选药物进入后期临床试验^[32]。

有研究在美国食品药品监督管理局和其他国家批准的药品中筛选具有抗埃博拉病毒作用的药物, 结果发现, 一些选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulators, SERMs), 包括克罗米酚和托瑞米酚, 是埃博拉病毒感染潜在抑制剂。克罗米酚和托瑞米酚抗埃博拉病毒的活性在小鼠感染动物模型中得到证实。研究提示, 这2种药物可能适用于抗丝状病毒感染^[33]。

有研究合成了2种抗体, 这2种抗体可分别与酶切前和酶切后的病毒外膜 GP 结合, 进而抑制病毒进入宿主细胞^[34]。另有研究证实, 经激酶抑制剂木黄酮和酪氨酸磷酸化抑制剂 AG1478 处理的宿主细胞对埃博拉病毒的感染和转导具有抑制作用^[35], 提示这2种激酶抑制剂混合物可以用作广谱抗病毒制剂, 用于埃博拉病毒感染的预防和治疗。据报道, 吡嗪酰胺派生物 T-705(法匹拉韦)在体内和体外具有抗埃博拉病毒效果。T-705 可以抑制在培养细胞中的病毒复制。采用缺乏 I 型干扰素受体的小鼠构建埃博拉病毒感染模型, 在病毒感染小鼠后 6 d 开始施用 T-705, 结果引起了快速的病毒清除反应, 使与疾病严重性相关的生物化学指标异常减小, 使 100% 的实验动物在受攻击感染后免于死亡^[36]。该研究提示 T-705 可作为治疗 EVD 的一种候选药物。

研究显示, 在食蟹猴接受致死性剂量的埃博拉病毒攻击感染 24 h 后, 用 3 种针对埃博拉病毒 GP 的单克隆抗体免疫实验动物, 可使全部动物存活, 且无明显不良反应。而在接受感染后 48 h, 采用相同的免疫剂量, 则可使 4 只实验动物中的 2 只完全恢复正常。在存活动物体内, 产生了抗埃博拉病毒 GP 特异性体液和细胞免疫反应^[37]。该研究提示, 特异性抗体对体内病毒的复制具有重要作用, 可用于丝状病毒感染的治疗。

3 EVD 的预防与控制

3.1 EVD 疫苗研究 疫苗接种是预防传染性疾病流行最有效的措施, 但对 EVD 目前尚无商品化疫苗。EVD 疫苗的研究历经了传统减毒病毒疫苗、亚单位疫苗、基因工程疫苗等阶段。研究显示, 采用传统的埃博拉病毒弱毒疫苗免疫动物, 对实验动物不能产生有效的免疫保护作用, 而且弱毒疫苗的应用还存在安全性问题。而应用基因工程技术敲除毒力基因可制备重组病毒疫苗, 用这种重组弱毒疫苗株免疫小鼠, 可使小鼠对致死剂量病毒感染产生免疫保护效果^[38]。

据报道, 采用狂犬病毒为载体, 构建表达埃博拉病毒 GP 的病毒疫苗, 并分别用有复制能力、无复制

能力和化学灭活的重组疫苗毒株免疫小鼠和非人灵长类动物, 结果显示, 这些疫苗毒株均能诱导有效的免疫反应, 而且产生的抗埃博拉病毒保护性免疫很大程度依赖抗埃博拉病毒 GP 体液免疫反应的性质, 以 IgG1 抗体为主的体液免疫反应和高水平 GP 特异性抗体有益于机体对埃博拉病毒感染的控制^[39]。该研究提示, 成功的埃博拉病毒疫苗必须具有诱导较强的抗埃博拉病毒抗体的功能。

有研究采用鼠源性抗埃博拉病毒 NP 单克隆抗体, 在 NP 近 C 端半部分肽链上检出 7 个具有抗原活性的区域, 其中 2 个活性区在丝状病毒种间具有高保守性^[40]。该研究结果对 EVD 疫苗和诊断研究具有参考价值。

采用腺病毒为载体构建抗埃博拉病毒疫苗, 分别通过肌肉注射、经鼻腔、经口和舌下途径免疫小鼠和荷兰猪, 检测动物免疫反应。结果显示, 经舌下免疫可激发强烈的转基因表达, 吸引 CD11c(+) 抗原递呈细胞至黏膜下, 采用相同免疫的剂量, 舌下免疫诱导的特异性 IFN- γ + T 细胞反应与肌肉注射免疫相似, 前者可诱导较强的抗病毒 GP 特异性 Th1 和 Th2 型免疫反应, 且不受免疫前动物免疫力的影响。对于具有抗腺病毒免疫力的小鼠, 经舌下免疫产生的保护率比肌肉注射更高^[41]。

有研究对外膜 GP 基因序列的密码子进行了优化, 采用携带这种 GP 基因的 DNA 疫苗经电穿孔免疫小鼠, ELISA 检测结果显示, 免疫接种可使小鼠特异性抗体滴度升高, 受到致死性攻击感染后能够存活, 且无感染的临床表现, 免疫组与未免疫对照组小鼠存活率差异有统计学意义^[42]。

埃博拉病毒病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)由病毒基质蛋白 VP40 和 GP 构成。GP 是主要的免疫原, 而 VP40 是形成颗粒结构的必要成分^[43-45]。由于这种颗粒结构可使抗原表位的靶受体交联, 使抗原在抗原递呈细胞内浓缩, 而产生更强激活信号, 因此, 在 VLP 中表达 GP 可以提高免疫效果^[46]。研究证实, 埃博拉病毒 VLP 疫苗在小鼠、豚鼠和非人灵长类动物体内, 可产生抗致死性感染的免疫保护作用^[47-50]。

对基于蛋白抗原的疫苗, 采用安全高效的佐剂非常重要。为提高 VLP 疫苗免疫效果, 减少疫苗抗原的免疫剂量, 可在 VLP 颗粒中添加免疫佐剂。polyICLC 是对核酸酶稳定的 dsRNA 模拟分子, 是模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)的激动剂, 具有作为免疫佐剂的潜力。在 VLP 中加入不同剂量的 polyICLC, 并用于免疫小鼠和豚鼠, 当将 polyICLC 剂量降至 100 ng 时, polyICLC 仍可以显著

提高疫苗免疫效果,包括增强抗原特异性多功能 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞和抗体反应,提高血清细胞因子水平和增强淋巴结中树突状细胞、自然杀伤细胞和 B 淋巴细胞激活反应等。在采用具有佐剂作用的最低剂量条件下,这种激活作用可在 24 ~ 72 h 消退。研究提示,一定剂量的 polyICLC 可在激活非特异性免疫基础上暂时增强特异性免疫反应,可用于埃博拉病毒 VLP 疫苗的构建^[43]。

有研究构建了抗埃博拉病毒 DNA 疫苗,采用携带埃博拉病毒 GP、NP、VP40 和 VP35 基因的 DNA 疫苗免疫实验动物,可对小鼠和豚鼠等啮齿动物产生较好的免疫保护效果,而对非人灵长类动物的保护率较低^[51-53]。但也有研究支持不同观点,据报道,采用病毒 DNA 与编码病毒核蛋白的腺病毒载体联合免疫食蟹猴,并用致死剂量的埃博拉病毒感染,结果显示,未接受免疫的对照组动物全部感染埃博拉病毒,并于 1 周内进入垂死状态或死亡,而免疫动物在超过 6 个月的观察期内无明显症状,病毒检测结果呈阴性,并检出免疫动物体内存在细胞和体液免疫反应^[54],表明在非人灵长类动物体内 DNA 疫苗也具有免疫保护作用。

3.2 EVD 流行的控制

3.2.1 疫情的调查和监控 在曾发生 EVD 流行的地区,应长期对疫情进行监测。疾控人员在接到病例报告后要立即进行流行病学调查,包括调查病例在发病期间的活动史、搜索密切接触者 and 共同暴露者,寻找感染来源,及时隔离控制传染源,防止疫情扩散。对公众进行宣传教育,使公众掌握 EVD 的防治知识,避免疫情引起社会恐慌。密切关注 EVD 的流行动态,加强国际信息交流与合作,以建立和调整疾病防控策略和措施^[55]。

3.2.2 控制传染源 控制传染源是控制 EVD 流行的最重要措施。各级医疗机构一旦发现疑似 EVD 病例后要立即报告,使卫生行政和疾控部门尽早掌握疫情,并采取必要的防控措施。对可疑病例及其接触者,应采取严格的隔离措施,隔离期限一般以最长潜伏期确定。对疑似病例和确诊病例,应收入负压病房隔离治疗。对其排泄物及污染物品均应严格消毒。在非流行区,及时发现和隔离控制输入性病例是控制传染源的关键环节。应加强检验检疫和涉外旅游管理,及时发现输入病例。加强对可能作为埃博拉病毒宿主的非人灵长类动物和蝙蝠等野生动物的检疫工作。

3.2.3 切断传播途径 严格执行标本采集程序,病毒的分离和培养应在 BSL-4 实验室中进行。严格规范污染环境的消毒工作,做好终末消毒和环境处理。

由于埃博拉病毒对氯的消毒剂、脂溶剂、酚类消毒剂、紫外线、 γ -射线、甲醛和苯酚敏感,可用消毒剂或紫外线消毒,但是这种消毒方法只能消毒物质表层,操作需要加大剂量和延长时

间。对患者的排泄物和分泌物可采用化学方法进行严格消毒。对具有传染性的医疗污物可用焚烧或高压蒸汽消毒方法处理。最佳的消毒方式是高温,埃博拉病毒在 60 °C 加温 30 min 会被灭活,1 h 可消灭;煮沸 5 min 可消灭。高温焚烧病毒污染的衣物、食品和医疗用品很容易杀死病毒。患者死亡后,应尽量减少尸体的搬运和转运,尸体应消毒后用密封防漏物品包裹,及时焚烧或就近掩埋。需做尸体解剖时,应严格实施消毒隔离措施。

加强实验室生物安全性管理。所有涉及埃博拉病毒的实验活动应严格按照我国有关规定进行。相关的实验室检查应减少至需要的最低限度。标本采集应注意个人防护,采集后将标本置于塑料袋中,再置于有清晰标志、坚固的防漏容器中直接送往实验室。进行检验的实验室应有相应的生物安全级别。病毒分离与培养只能在 BSL-4 实验室进行。

3.2.4 保护易感人群 加强个人防护,使用防护装备。接触污染物是 EVD 主要传播方式,与患者接触时要戴手套、口罩、眼镜、帽子,穿防护服,必要时,还应戴腿罩与鞋罩,防止直接接触患者的污染物,尤其应避免锐器损伤皮肤。对前往非洲疫区的旅游者和医疗卫生工作人员进行防病知识的宣教,使其避免接触丛林中的灵长类动物,在接触患者时要做好个人防护。

4 问题与展望

目前在 EVD 诊断中存在的突出问题是需要探讨更加经济、简便且敏感性和特异性更高的诊断方法和诊断试剂,以满足经济落后地区的需要。在 EVD 预防方面,疫苗应用是控制传染病流行最有效的措施,但目前对 EVD 仍无商品化疫苗问世。疫苗研制工作发展,不仅受技术条件限制,而且受药品开发商对疫苗商业价值评估的影响。未来 EVD 疫苗研制成功将会对该病防治产生重大促进作用^[56]。在 EVD 治疗方面,目前对这种烈性传染病尚无特效的治疗方法,对症处理的治疗方法很难提高治疗效果,达到减少病死率的目的。通过对埃博拉病毒感染及致病机制的深入研究,研制特效的抗病毒药物,是解决 EVD 治疗问题的主要途径。由于对埃博拉病毒生态学和病原生物学研究的不足,使得对 EVD 传染源、传播途径等流行环节和影响因素的研究难以深入。由于迄今对埃博拉病毒起源和宿主尚不清

楚,必然影响到 EVD 防控策略与措施的建立。此外,非流行区国家卫生部门和普通群众对 EVD 的危害缺乏足够的认识也是 EVD 预防控制中存在的问题,这些地区的卫生人员和群众普遍认为该病只流行于非洲的偏远贫穷地区,似乎离自身很遥远,这成为非流行区影响 EVD 防控的不利因素。然而,尽管存在诸多问题,人类在抗击 EVD 的斗争中仍不断取得进步。据报道,在西非感染埃博拉病毒的 2 名美国医护人员,在接受一种仍处于实验阶段的血清治疗后,病情出现好转,逐渐痊愈。在特殊情况下,将没有经过临床试验 EVD 疫苗试用于这 2 名医务人员,已取得有益效果。这些研究进展为人类最终控制 EVD 这种危害严重的烈性传染病带来希望。

参考文献:

- [1] Buhler S, Roddy P, Nolte E, et al. Clinical documentation and data transfer from Ebola and Marburg virus disease wards in outbreak settings: health care workers' experiences and preferences [J]. *Viruses*, 2014, 6(2): 927-937.
- [2] Heymann D L. Control of communicable diseases manual [M]. 18th ed. Washington DC: American Public Health Association, 2004: 180-182.
- [3] Stahelin R V. Membrane binding and bending in Ebola VP40 assembly and egress [J]. *Front Microbiol*, 2014, 5: 300.
- [4] Bente D, Gren J, Strong J E, et al. Disease modeling for Ebola and Marburg viruses [J]. *Dis Model Mech*, 2009, 2(1/2): 12-17.
- [5] 埃博拉出血热防控方案 [S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. (2014-07-31) [2014-10-17]. <http://www.nhfp.gov.cn/jkj/s3578/201407/530a2d22409249a7a5fbde51f0117b32.shtml>.
- [6] Rollin P E, Bausch D G, Sanchez A. Blood chemistry measurements and D-Dimer levels associated with fatal and nonfatal outcomes in humans infected with Sudan Ebola virus [J]. *J Infect Dis*, 2007, 196(Suppl 2): S364-S371.
- [7] van der Groen G, Kurata T, Mets C. Modifications to indirect immunofluorescence tests on Lassa, Marburg, and Ebola material [J]. *Lancet*, 1983, 1(8325): 654.
- [8] Saijo M, Niikura M, Morikawa S, et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(1): 1-7.
- [9] Ikegami T, Saijo M, Niikura M, et al. Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus [J]. *Epidemiol Infect*, 2003, 130(3): 533-539.
- [10] Ikegami T, Saijo M, Niikura M, et al. Development of an immunofluorescence method for the detection of antibodies to Ebola virus subtype Reston by the use of recombinant nucleoprotein-expressing HeLa cells [J]. *Microbiol Immunol*, 2002, 46(9): 633-638.
- [11] Saijo M, Niikura M, Morikawa S, et al. Immunofluorescence method for detection of Ebola virus immunoglobulin, using HeLa cells which express recombinant nucleoprotein [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(2): 776-778.
- [12] Cilloniz C, Ebihara H, Ni C, et al. Functional genomics reveals the induction of inflammatory response and metalloproteinase gene expression during lethal Ebola virus infection [J]. *J Virol*, 2011, 85(17): 9060-9068.
- [13] Wauquier N, Padilla C, Becquart P, et al. Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection [J]. *Immunogenetics*, 2010, 62(11/12): 767-771.
- [14] Ksiazek T G, Rollin P E, Williams A J, et al. 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]. *J Infect Dis*, 1999, 179(Suppl 1): S177-S187.
- [15] Saijo M, Niikura M, Maeda A, et al. Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Med Virol*, 2005, 76(1): 111-118.
- [16] Ikegami T, Niikura M, Saijo M, et al. Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Reston Ebola virus nucleoprotein [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, 10(4): 552-557.
- [17] Saijo M, Niikura M, Morikawa S, et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(1): 1-7.
- [18] Daaboul G G, Lopez C A, Chinnala J, et al. Digital sensing and sizing of vesicular stomatitis virus pseudotypes in complex media: a model for Ebola and Marburg detection [J]. *ACS Nano*, 2014, 8(6): 6047-6055.
- [19] Bausch D G, Borchert M, Grein T, et al. Risk factors for Marburg hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo [J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(12): 1531-1537.
- [20] Grolla A, Jones S, Kobinger G, et al. Flexibility of mobile laboratory unit in support of patient management during the 2007 Ebola-Zaire outbreak in the Democratic Republic of Congo [J]. *Zoonoses Public Health*, 2012, 59(Suppl 2): 151-157.
- [21] 杨宇, 白琳, 胡孔新, 等. 马尔堡、埃博拉病毒双重荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2012, 26(4): 313-315.
- [22] Formenty P, Leroy E M, Epelboin A, et al. Detection of Ebola virus in oral fluid specimens during outbreaks of Ebola virus hemorrhagic fever in the Republic of Congo [J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 42(11): 1521-1526.
- [23] 鲁会军, 套宁一, 张英. 埃博拉出血热 [J]. *传染病信息*, 2007, 20(2): 97-99.
- [24] Zaki S R, Shieh W J, Greer P W, et al. 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 Epidémies à Kikwit [J]. *J Infect Dis*, 1999, 179(Suppl 1): S36-S47.
- [25] Sanchez A, Wagoner K E, Rollin P E. Sequence-based human leukocyte antigen-B typing of patients infected with Ebola virus in Uganda in 2000: identification of alleles associated with fatal and nonfatal disease outcomes [J]. *J Infect Dis*, 2007, 196(Suppl 2): S329-S336.
- [26] 刘振宇, 郑连群, 王丽, 等. 埃博拉病毒的研究 [J]. *口岸卫生*

- 控制,2004,9(4):33-35.
- [27] Kolokol'tsov A A, Davidovich I A, Strel'tsova M A, *et al.* The use of interferon for emergency prophylaxis of marburg hemorrhagic fever in monkeys [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2001, 132(1): 686-688.
- [28] Björndal A S, Szekely L, Elgh F. *Ebola virus* infection inversely correlates with the overall expression levels of promyelocytic leukaemia (PML) protein in cultured cells [J]. *BMC Microbiol*, 2003, 3:6.
- [29] Modrof J, Mühlberger E, Klenk H D, *et al.* Phosphorylation of VP30 impairs *Ebola virus* transcription [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(36):33099-33104.
- [30] Binning J M, Wang T, Luthra P, *et al.* Development of RNA aptamers targeting *Ebola virus* VP35 [J]. *Biochemistry*, 2013, 52(47): 8406-8419.
- [31] Elshabrawy H A, Fan J, Haddad C S, *et al.* Identification of a broad-spectrum antiviral small molecule against severe acute respiratory syndrome coronavirus and Ebola, Hendra, and Nipah viruses by using a novel high-throughput screening assay [J]. *J Virol*, 2014, 88(8):4353-4365.
- [32] Iversen P L, Warren T K, Wells J B, *et al.* Discovery and early development of AVI-7537 and AVI-7288 for the treatment of *Ebola virus* and *Marburg virus* infections [J]. *Viruses*, 2012, 4(11): 2806-2830.
- [33] Johansen L M, Brannan J M, Delos S E, *et al.* FDA-approved selective estrogen receptor modulators inhibit *Ebola virus* infection [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(190):190ra79.
- [34] Koellhoffer J F, Chen G, Sandesara R G, *et al.* Two synthetic antibodies that recognize and neutralize distinct proteolytic forms of the *Ebola virus* envelope glycoprotein [J]. *ChemBiochem*, 2012, 13(17):2549-2557.
- [35] Kolokoltsov A A, Adhikary S, Garver J, *et al.* Inhibition of *Lassa virus* and *Ebola virus* infection in host cells treated with the kinase inhibitors genistein and tyrphostin [J]. *Arch Virol*, 2012, 157(1): 121-127.
- [36] Oestereich L, Ludtke A, Wurr S, *et al.* Successful treatment of advanced *Ebola virus* infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model [J]. *Antiviral Res*, 2014, 105:17-21.
- [37] Qiu X, Audet J, Wong G, *et al.* Successful treatment of Ebola virus-infected cynomolgus macaques with monoclonal antibodies [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(138):138ra81.
- [38] Feldmann H, Klenk H D. Filoviruses [A]. Baron S. Source medical microbiology [M], 4th ed. Galveston (TX), USA; university of texas medical branch at galveston, 1996; chapter 72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8129/>.
- [39] Blaney J E, Marzi A, Willet M, *et al.* Antibody quality and protection from lethal *Ebola virus* challenge in nonhuman primates immunized with rabies virus based bivalent vaccine [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(5):e1003389.
- [40] Changula K, Yoshida R, Noyori O, *et al.* Mapping of conserved and species-specific antibody epitopes on the *Ebola virus* nucleoprotein [J]. *Virus Res*, 2013, 176(1/2):83-90.
- [41] Choi J H, Schafer S C, Zhang L, *et al.* A single sublingual dose of an adenovirus-based vaccine protects against lethal Ebola challenge in mice and guinea pigs [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(1):156-167.
- [42] Grant-Klein R J, Van Deusen N M, Badger C V, *et al.* A multi-antigen filovirus DNA vaccine delivered by intramuscular electroporation completely protects mice from Ebola and Marburg virus challenge [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2012, 8(11):1703-1706.
- [43] Martins K A, Steffens J T, van Tongeren S A, *et al.* Toll-like receptor agonist augments virus-like particle-mediated protection from *Ebola virus* with transient immune activation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e89735.
- [44] Swenson D L, Warfield K L, Kuehl K, *et al.* Generation of Marburg virus-like particles by co-expression of glycoprotein and matrix protein [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2004, 40(1):27-31.
- [45] Licata J M, Johnson R F, Han Z, *et al.* Contribution of *Ebola virus* glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles [J]. *J Virol*, 2004, 78(14):7344-7351.
- [46] Wahl-Jensen V, Kurz S K, Hazelton P R, *et al.* Role of *Ebola virus* secreted glycoproteins and virus-like particles in activation of human macrophages [J]. *J Virol*, 2005, 79(4):2413-2419.
- [47] Swenson D L, Warfield K L, Negley D L, *et al.* Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections [J]. *Vaccine*, 2005, 23(23):3033-3042.
- [48] Warfield K L, Swenson D L, Olinger G G, *et al.* Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal *Ebola virus* challenge [J]. *J Infect Dis*, 2007, 196(Suppl 2):S430-S437.
- [49] Swenson D L, Wang D, Luo M, *et al.* Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(3):460-467.
- [50] Warfield K L, Olinger G, Deal E M, *et al.* Induction of humoral and CD8⁺ T cell responses are required for protection against lethal *Ebola virus* infection [J]. *J Immunol*, 2005, 175(2):1184-1191.
- [51] Daddario-DiCaprio K M, Geisbert T W, Ströher U, *et al.* Postexposure protection against Marburg haemorrhagic fever with recombinant vesicular stomatitis virus vectors in non-human primates: an efficacy assessment [J]. *Lancet*, 2006, 367(9520):1399-1404.
- [52] Nyamathi A M, Fahey J L, Sands H, *et al.* *Ebola virus*: immune mechanisms of protection and vaccine development [J]. *Biol Res Nurs*, 2003, 4(4):276-281.
- [53] Dolnik O, Kolesnikova L, Becker S. Filoviruses: interactions with the host cell [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(5):756-776.
- [54] Sullivan N J, Sanchez A, Rollin P E, *et al.* Development of a preventive vaccine for *Ebola virus* infection in primates [J]. *Nature*, 2000, 408(6812):605-609.
- [55] Parkes-Ratanshi R, Elbireer A, Mbambu B, *et al.* Ebola outbreak response; experience and development of screening tools for viral haemorrhagic fever (VHF) in a HIV center of excellence near to VHF epicentres [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):e100333.
- [56] MacNeil A, Rollin P E. Ebola and Marburg hemorrhagic fevers: neglected tropical diseases [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6(6):e1546.