

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА И РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ ФИЛОВИРУСОВ. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ИММУНОДИАГНОСТИКИ

Казачинская Е.И., Иванова А.В., Сорокин А.В.,
Качко А.В., Субботина Е.Л., Разумов И.А., Локтев В.Б.

ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
Новосибирская область, р/н Кольцово

Резюме. Панель моноклональных антител (МКА) к VP35, VP40 и NP белкам вирусов Эбола и Марбург была использована для исследования способности МКА к вирусным белкам VP35, VP40 и NP взаимодействовать с их рекомбинантными белками-аналогами. Было установлено, что МКА эффективно распознавали рекомбинантные белки-аналоги филовирусов. Это позволило предложить вариант иммуноферментного анализа на основе МКА для захвата вирусного антигена и МКА меченых биотином, который эффективно и специфически выявлял рекомбинантные и вирусные белки вирусов Эбола и Марбург в пределах от 1 до 150 нг/мл. Это позволило сделать вывод о том, что МКА и рекомбинантные белки VP35, VP40 и NP вирусов Эбола и Марбург перспективны для разработки нового поколения средств иммунодиагностики и для исследования особенностей иммунологии филовиральных инфекций.

Ключевые слова: вирус Марбург (ВМ), вирус Эбола (ВЭ), моноклональные антитела (МКА), рекомбинантные белки, иммунодиагностика.

Kazachinskaya E.I., Ivanova A.V., Sorokin A.V., Subbotina E.L., Kachko A.V., Razumov I.A., Loktev V.B.

MONOCLONAL ANTIBODIES AND RECOMBINANT PROTEINS OF FILOVIRUSES: IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES AND EVALUATION OF THEIR EFFICIENCY FOR IMMUNE DIAGNOSTICS OF MARBURG AND EBOLA VIRUSES

Abstract. A panel of monoclonal antibodies (MAbs) against VP35, VP40 and NP viral proteins of Marburg and Ebola viruses, as well as recombinant VP35, VP40 and NP proteins were generated and tested for their capacity to specific immune reactions. Monoclonal antibodies to appropriate viral proteins effectively recognized the VP35, VP40 and NP recombinant proteins, thus allowing to develop a variant of a MAb-based ELISA analysis with different types of biotin-labeled MAbs, using these antibodies for capturing viral and recombinant antigens of Marburg and Ebola viruses. These techniques were able to detect viral and recombinant proteins in a concentration range between 1 and 150 ng/ml. We conclude that the recombinant VP35, VP40 and NP proteins of filoviruses, as well as MAbs against these viral proteins represent a promising tool for a new generation of immunodiagnostic kits and studying immunological features of filovirus infection. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 3, pp 177-190)

Адрес для переписки:

Локтев Валерий Борисович,
ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»
630559, Новосибирская область, р/н Кольцово.
Тел.: (383) 336-65-92.
Факс: (383) 336-74-09.
E-mail: loktev@vector.nsc.ru

Keywords: Marburg virus (MV), Ebola virus (EV), monoclonal antibodies (MAbs), recombinant proteins, immune diagnostics.

Введение

Вирус Марбург (ВМ) и вирус Эбола (ВЭ) (семейство *Filoviridae*) вызывают у людей одноименные геморрагические лихорадки с очень тяжелым течением заболевания и высоким уровнем летальности, которая может достигать 70-90% [26, 47, 52, 53, 54, 55, 56]. Филовирусы распространяются от человека к человеку через прямой контакт с биологическими жидкостями. Аэрозольный путь передачи также возможен [7, 8, 13, 33]. Ввоз обезьян из стран Африки для зоопарков и лабораторных исследований, а также развитие туризма в данном регионе — возможный путь контакта человека с чрезвычайно патогенными для человека филовирусами [45]. Недавно были получены первые экспериментальные данные, показывающие, что природным резервуаром для филовирусов являются несколько видов фруктовых летучих мышей [25, 36]. Подтверждение этих результатов будет говорить о выявлении новой эпидемиологической цепочки распространения филовирусных инфекций и связанной с контактами человека с фруктовыми летучими мышами и загрязненными ими тропическими фруктами.

Апробированных вакцин против этих инфекций нет. Первые экспериментальные вакцины, полученные на основе инактивированных препаратов филовирусов, оказались неэффективны [20, 28, 37]. Вакцина на основе аденовирусного вектора, несущего гены белков наружного гликопротеина (GP) и матриксного белка VP40 вирионов нескольких штаммов ВМ и ВЭ, оказалась способна вызывать в организме приматов синтез протективных антител [46]. Экспериментальная рекомбинантная вакцина на основе вируса везикулярного стоматита со встройкой гликопротеина GP филовирусов была способна защищать обезьян от летальной инфекции, вызываемой вирусом Марбург и Эбола, при однократной иммунизации [31]. Высокая контагиозность и патогенность филовирусов для человека требует быстрой и дифференциальной диагностики вызываемых ими инфекций. Это тем более важно, так как стремительно развивающиеся геморрагические лихорадки приводят к летальному исходу в течение 5-12 дней, и первичные симптомы филовирусных лихорадок во многом схожи с клинической картиной, характерной для ряда других заболеваний, которые вызываются вирусами, бактериями или простейшими. Это, прежде всего, желтая лихорадка, лихорадка Ласса,

дизентерия, тиф, чума, малярия и целый ряд других инфекционных заболеваний [29], для некоторых из них разработаны вакцины и методы специфического лечения, а точная диагностика в этом случае предопределяет успех лечения [17].

Характерной особенностью филовирусных заболеваний является раннее появление вирусных антигенов в сыворотке крови. Так, антиген ВЭ обнаруживается в сыворотке крови инфицированных морских свинок и обезьян уже через 4 суток, фактически в конце инкубационного периода заболевания [9, 10]. У пациентов ВЭ может быть обнаружен на третий день после начала заболевания и его концентрация в крови достигает 10^6 - 10^8 вирусных частиц в миллилитре [48, 49]. ВМ появляется в крови инфицированных морских свинок и обезьян *Macaca mulatta* на 4 сутки от заражения и может быть обнаружен методом ИФА [6]. Также характерно высокое содержание ВМ в слюне и выделениях лабораторно инфицированных животных [21]. Эта особенность развития заболевания делает высокоэффективными методы иммунологической диагностики, основанные на раннем выявлении вирусных антигенов в биологических жидкостях человека и животных.

Гликопротеин (GP), основной структурный белок оболочки филовирусов, имеет невысокий удельный вес в составе вириона, около 4,7% [27]. Поэтому более перспективно использовать для иммунодиагностики филовирусных инфекций структурные белки — нуклеопротеин (NP), матриксный белок VP40 и кофактор вирусной полимеразы (белок VP35), которые составляют 17, 37, 7 и 24,5% от массы вириона соответственно [27].

Ранее нами была получена коллекция гибридом, стабильно продуцирующих МКА к структурным белкам NP, VP40, VP35 ВМ [14] и к белкам NP и VP35 ВЭ [4]. Целью данной работы было пополнение коллекции гибридом и исследование иммунохимических свойств МКА в конкурентном ИФА для выявления пар МКА способных: а) эффективно «захватывать» вирусные и рекомбинантные антигены ВМ и ВЭ в твердофазном ИФА; б) эффективно выявлять образовавшиеся на твердой фазе иммунные комплексы; а также исследование иммунохимических свойств рекомбинантных белков VP35, VP40 и NP на пригодность их использования для конструирования иммунодиагностических средств.

Материалы и методы

Вирусные препараты. В экспериментах использовали очищенный, концентрированный из культуральной среды инфицированных клеток Vero, инактивированный ВЭ, субтип Заир (штамм Mayinga) [18]. Вирус Марбург (штамм Popp) был получен методом ультрацентрифугирования плазмы крови инфицированных морских свинок по методике, приведенной в [2], инактивирован обработкой 0,17% димером этиленмина с последующей инкубацией при 8-10 °С в течение 24 ч и далее прогреванием при 60 °С в течение 1 часа, как описано в работе [41]. Антиген ВМ был любезно предоставлен доктором Белановым Е.Ф., а антиген ВЭ-доктор Чепурновым А.А.

Рекомбинантные белки ВМ и ВЭ. Белки ВМ были получены в результате экспрессии полноразмерных генов VP35 и VP40 в клетках *E. coli*, по методикам, приведенным в [16]. Рекомбинантные белки VP40 и NP ВЭ получали аналогично по методикам, приведенным в [5].

Сыворотки и иммуноглобулины, специфичные к вирусу Эбола. Препарат очищенных лошадиных иммуноглобулинов (Ig-лошадь-ВЭ) был получен из ВЦ НИИМ МО РФ (г. Сергиев Посад) [1]. Поликлональные антисыворотки (АС-ВЭ) получали путем иммунизации препаратом ВЭ мышей BALB/c (весом 18-20 г) и крыс Lou (весом 180-200 г), как описано [4]. Получение поликлональной антисыворотки кролика против ВЭ описано [19]. Антисыворотки к рекомбинантным белкам получали при иммунизации беспородных белых мышей.

Сыворотки и иммуноглобулины, специфичные к вирусу Марбург. В качестве референс-антисыворотки против ВМ использовали сыворотку человека, переболевшего лихорадкой Марбург [11]. Коммерческий препарат очищенных лошадиных иммуноглобулинов (Ig-лошадь-ВМ) был получен из ВЦ НИИМ МО РФ (г. Сергиев Посад). С целью получения иммунных сывороток (АС-ВМ) проводили иммунизацию инактивированным препаратом ВМ мышей BALB/c и кроликов [14]. Антисыворотки к рекомбинантным белкам получали при иммунизации беспородных белых мышей.

Получение гибридом. Слияние клеток (гибридизацию) проводили, как описано [4], с помощью полиэтиленгликоля по методу, предложенному Gefter M. [30]. Использовали соотношение миеломных клеток NS/1 к иммунным спленоцитам 1:3. Отбор позитивных гибридом, секретирующих специфические МКА к антигену, осуществля-

ли методом ТИФА. Гибридомы, секретирующие специфичные антитела, были дважды клонированы методом предельных разведений. Кривую сохранения гибридных клеточных линий проводили в жидком азоте, как описано [4].

Моноклональные антитела. Нарботку МКА проводили, как описано [4]. Для очистки МКА использовали каприловую кислоту в соответствии с рекомендациями [22] и с последующим осаждением в 50% растворе сульфата аммония (рН 7,0). Типирование классов и подклассов МКА проводили методом ТИФА с использованием моноспецифических мышиных антител («Sigma», США). Концентрацию белков определяли при помощи набора «Bio-Rad Protein Assay» в соответствии с рекомендациями производителя.

Иммунологические методы.

Твердофазный ИФА (ТИФА) проводили в полистироловых планшетах, как описано нами ранее [16]. Для проявления иммунохимической реакции использовали хромоген, 0,1% О-фенилендиамин, в цитратно-фосфатном буфере (0,2 М лимонной кислоты, 0,5 М Na_2HPO_3 , рН 5,0) с 0,03% перекиси водорода. Останавливали реакцию добавлением 100 мкл на лунку 1 NHC1 и измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре «Multiscan» с использованием светофильтра с максимумом пропускания 492 нм. В качестве отрицательного и положительного контроля использовали гомологичные нормальную (неиммунную) и гипериммунную сыворотки соответственно.

Приготовление конъюгатов антител с биотином проводили по методу, описанному [23], используя Biotin N-hydroxysuccinimide ester с FW 341 («Sigma», США) в соотношении 250 мкг/1мг МКА. Процесс включения биотина в МКА контролировали титрованием меченых антител на антигене, иммобилизованном на пластик, с конъюгатом пероксидазы со стрептовидином.

Конкурентный ИФА. В лунках высокосорбционных полистироловых планшетов («Testiks» или «Nunc») сорбировали очищенные МКА в 0,5 М карбонатном буфере (рН 9,0) в объеме 100 мкл при 22 °С в течение 12 часов. Места для неспецифического связывания антител на планшетах насыщали 0,5 % раствором казеина и выдерживали при 37 °С в течение 30 минут. Раствор антигена выдерживали в течение ночи при 4 °С или при 37 °С в течение часа. Затем в лунки планшетов вносили конъюгаты МКА с биотином в рабочих разведениях, выдерживали при 37 °С

в течение часа и после 3-кратной отмывки лунок вносили в них конъюгат стрептавидина с пероксидазой. Специфическое связывание антител, меченных биотином, с конъюгатом выявляли жидкой субстратной системой ТМБ (3,3', 5,5' — Tetramethylbenzidine, «Sigma») по 100 мкл на лунку. Выдерживали планшеты 30 мин в темноте, останавливали реакцию добавлением 100 мкл на лунку 1N соляной кислоты и измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре («Uniscan», Финляндия) при длине волны 450 нм. Положительным считали результат измерения ОП в лунке, превышающий в 2 раза таковой для лунки с отрицательным контролем. Для отрицательного контроля связывания антител с антигеном использовали пару неспецифичных МКА или один вид МКА для «захвата» антигена.

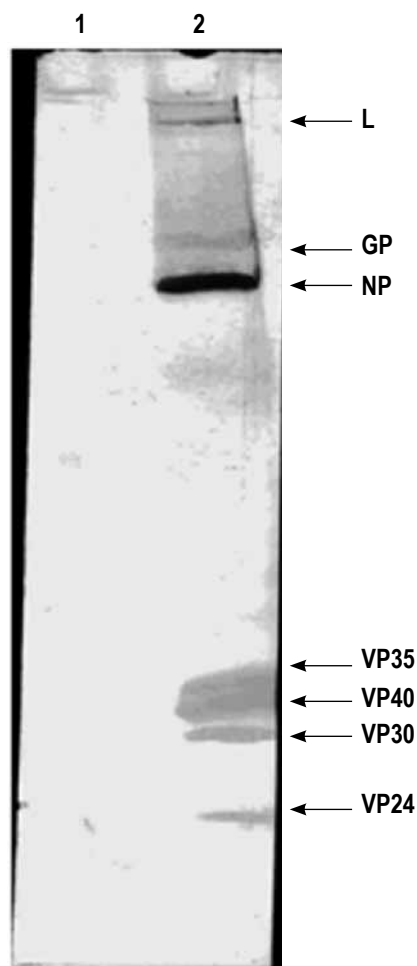


Рисунок 1. Иммуноблот белков вируса Марбург с антителами сыворотки реконвалесцента

Примечание. 1 – нормальная сыворотка человека в разведении 1:1000; 2 – сыворотка человека, переболевшего лихорадкой Марбург [11], в разведении 1:1000. Стрелками обозначено местоположение белков вируса Марбург.

Электрофорез и иммуноблот. Электрофорез проводили по методу, описанному в работе [12] в прерывистой буферной системе с использованием 12-15% полиакриламидного геля с 0,1% додецилсульфата натрия в трис-глициновом буфере. Окраску гелей проводили при помощи Кумасси G-250. Вирусные и рекомбинантные белки после электрофореза переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Millipore, США) на аппарате Transpor («LKB», Швеция). Места неспецифического связывания насыщали 0,5% раствором казеина в буфере ТСБ-Твин (0,145 М хлористого натрия, 20 mM Трис-HCl, 5 mM PMSF («Sigma»), 0,1% Tween-20 (Serva), pH-7,4) при 37 °C в течение 2 часов. Затем отдельные полосы мембраны инкубировали с очищенными МКА 4 часа при 20-22 °C. Специфическое связывание антител, взаимодействующих с вирусными или рекомбинантными белками, выявляли с помощью конъюгата антивидовых антител меченых пероксидазой хрена.

Результаты и обсуждение

Антитела сыворотки человека, переболевшего лихорадкой Марбург в результате случайного лабораторного заражения [11], выявляют все вирусные структурные белки в препарате очищенного и инактивированного ВМ (рис. 1). Наиболее отчетливо выявлялись белки NP, VP35 и VP40, что говорит об их высокой иммуногенности для иммунной системы человека и возможности использования этих вирусных полипептидов в качестве антигена для конструирования иммунодиагностических тест систем.

В таблице 1 представлены данные по способности поликлональных антител различного видового происхождения взаимодействовать с нативными инактивированными антигенами филовирюсов и рекомбинантными белками VP35 и VP40 ВМ, а также с NP и VP40 ВЭ. В этих экспериментах были использованы аффинно-очищенные рекомбинантные белки (рис. 2). Представленные данные показывают, что рекомбинантные белки филовирюсов, полученные в результате экспрессии соответствующих полноразмерных генов в клетках *E. coli*, сохранили свою антигенную структуру и способны специфически взаимодействовать с поликлональными антивирусными антителами различного видового происхождения. Важно отметить, что поликлональные антитела не выявили значимого антигенного

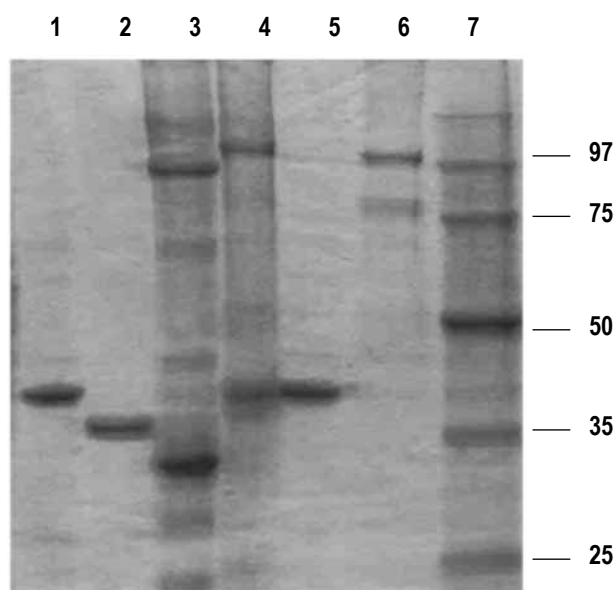


Рисунок 2. Электрофореграмма вирусов Марбург и Эбола и рекомбинантных белков

Примечание. 1 – рекомбинантный белок VP35 вируса Марбург (5 мкл); 2 – рекомбинантный белок VP40 вируса Марбург (5 мкл); 3 – препарат инактивированного вируса Марбург (10 мкл); 4 – препарат инактивированного вируса Эбола (10 мкл); 5 – рекомбинантный белок VP40 вируса Эбола (5 мкл); 6 – рекомбинантный нуклеопротеин вируса Эбола (5 мкл); 7 – белковые маркеры молекулярного веса (10 мкл) (Bio-Rad).

перекреста между рекомбинантными полипептидами ВМ и ВЭ. Это позволяет заключить, что полученные рекомбинантные полипептиды могут быть использованы для конструирования иммунодиагностических методов, дифференцирующих эти две филовирсусные инфекции.

Для иммунохимической характеристики МКА были определены белки-мишени для них в иммуноблоте, титры специфического взаимодействия с инактивированными вирусами и рекомбинантными белками в ТИФА (табл. 2), класс и субклассы гибридных иммуноглобулинов (данные не представлены), взаимодействие с гомологичными вирусами и рекомбинантными белками в иммуноблоте (рис. 4). В результате исследования было показано, что МКА имеют высокий уровень специфического взаимодействия с нативными вирусными белками и их рекомбинантными аналогами и все МКА, кроме одного вида 6G8, специфичных к нуклеопротеину ВЭ, не имеют перекрестной активности с гетерологичными вирусными и рекомбинантными белками. На рисунке 3 представлен результат электрофоретического анализа используемых для исследования очищенных препаратов МКА.

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАЗЛИЧНЫХ АНТИГЕНОВ ВИРУСОВ МАРБУРГ И ЭБОЛА В ТИФА

Антитела	Титр антител (обратные величины) к следующим антигенам:						
	вирус Марбург	рек. VP40 ВМ	рек. VP35 ВМ	PQE	вирус Эбола	рек. VP40 ВЭ	рек. NP ВЭ
ЧС (1990г)	24300	8100	2700	< 100	900	< 100	< 100
ЧС (1996г)	200	400	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Л. IgG-ВМ	218700	72900	218700	< 100	2700	< 100	< 100
МАС-ВМ	24300	24300	8100	< 100	300	< 100	< 100
КАС-ВМ	24300	24300	24300	< 100	< 100	< 100	< 100
МАС-рек. VP35-ВМ*	24300	< 100	656100	< 100	< 100	< 100	< 100
МАС-рек. VP40-ВМ*	72900	1968300	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Л. IgG-ВЭ	24300	< 100	< 100	< 100	656100	656100	656100
КАС-ВЭ	2700	< 100	< 100	< 100	218700	218700	656100
МАС-ВЭ	2700	< 100	< 100	< 100	218700	218700	218700
Кр-АС-ВЭ	8100	< 100	< 100	< 100	218700	218700	218700
МАС-рек. V40-ВЭ*	< 100	< 100	< 100	< 100	656100	1968300	< 100
МАС-рек. NP-ВЭ*	< 100	< 100	< 100	< 100	656100	< 100	1968300
Отрицательные контроли**	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100

Примечание. ЧС – сыворотка человека, переболевшего лихорадкой Марбург [11] (в скобках указана дата забора крови); Л. IgG – очищенные IgG лошадей, иммунизированных инактивированными и инфекционными препаратами Марбург и Эбола (г. Сергиев Посад); МАС – мышинные антисыворотки; КАС – антисыворотка кролика, иммунизированного инактивированным антигеном ВМ или ВЭ; Кр-АС-ВЭ – антисыворотка крысы, иммунизированной инактивированным антигеном ВЭ; PQE – лизат *E. coli* (отрицательный контроль для рекомбинантных белков).

* – проводили обработку (истощение) исследуемых моноспецифических сывороток в присутствии 1% раствора лизата *E. coli* клеток 20 мин при 37 °С; ** – в качестве отрицательного контроля использовали нормальные сыворотки человека (5 сывороток), лошади (1 сыворотка), мыши (5 сывороток); концентрация антигенов 100 нг/лунка.

ТАБЛИЦА 2. ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ПЕРЕКРЕСТНОЙ АКТИВНОСТИ МКА С ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ ВИРУСНЫМИ И РЕКОМБИНАНТНЫМИ БЕЛКАМИ

№ п/п	Название МКА	Специфичность (вирус)	Белок-мишень	Концентрация очищенных МКА в мл	Титры очищенных МКА в ТИФА с вирусными антигенами и рекомбинантными аналогами					
					вирус Марбург	рек. VP40 ВМ	рек. VP35 ВМ	вирус Эбола-IS	рек. VP40 ВЭ	рек. NP ВЭ
1	3F9	ВМ	VP35	11,8	656100	-	729000	-	-	-
2	9D8	ВМ	VP35	5,7	729000	-	656100	-	-	-
3	8G3	ВМ	VP35	6,0	218700	-	72900	-	-	-
4	5G9	ВМ	VP40	7,2	729000	72900	-	-	-	-
5	7H10	ВМ	VP40	8,0	729000	729000	-	-	-	-
6	9G6	ВМ	VP40	6,8	218700	218700	-	-	-	-
7	6B7	ВМ	VP40	6,8	656100	656100	-	-	-	-
8	1C12	ВМ	VP40	3,6	24300	24300	-	-	-	-
9	10E11	ВМ	VP40	5,3	24300	24300	-	-	-	-
10	7D8	ВМ	VP40	5,9	2187000	243000	-	-	-	-
11	5G8	ВМ	VP40	1,4	656100	656100	-	-	-	-
12	7C4	ВМ	VP40	6,7	2187000	729000	-	-	-	-
13	5F11	ВМ	NP	3,6	2187000	-	-	-	-	-
14	9C7	ВМ	NP	8,7	6561000	-	-	-	-	-
15	5H7	ВМ	NP	7,7	2187000	-	-	-	-	-
16	3A5	ВМ	NP (?)	4,3	218700	-	-	-	-	-
17	1C7	ВЭ-IS	VP35	7,8	-	-	-	2187000	-	-
18	6F7	ВЭ -IS	VP35	8,3	-	-	-	729000	-	-
19	1C1	ВЭ-8MC	VP40	14,5	-	-	-	6561000	6561000	-
20	4A2	ВЭ-IS	VP40	7,7	-	-	-	6561000	6561000	-
21	1E6	ВЭ-8MC	VP40	1,5	-	-	-	72900	656100	-
22	3D9	ВЭ-8MC	VP40	7,0	-	-	-	729000	218700	-
23	1B5	ВЭ-8MC	VP40	5,7	-	-	-	72900	656100	-
24	5C10	ВЭ-IS	VP40	6,3	-	-	-	24300	13500	-
25	2E12	ВЭ-IS	VP40	3,6	-	-	-	24300	13500	-
26	1B2	ВЭ-IS	NP	8,9	-	-	-	2187000	-	2187000
27	7B11*	ВЭ-IS	NP	7,2	-	-	-	512000	-	656100
28	1E5	ВЭ-IS	NP	6,3	-	-	-	218700	-	243000
29	4B9	ВЭ-IS	NP	7,4	-	-	-	656100	-	2187000
30	9A7	ВЭ-IS	NP	4,3	-	-	-	24300	-	72900
31	4A8	ВЭ-IS	NP	7,2	-	-	-	2187000	-	121500
32	10B4	ВЭ-IS	NP	9,0	-	-	-	2187000	-	729000
33	6G8	ВЭ-IS	NP	6,8	2700	-	-	24300	-	243000
34	6A8	ВЭ-IS	NP	4,3	-	-	-	72900	-	40500
35	10A8	ВЭ-IS	NP	7,2	-	-	-	218700	-	218700

Примечание. ВЭ-IS – исходный штамм ВЭ-Заир; 8MC – штамм ВЭ-Заир, адаптированный к морским свинкам, на 8 пассаже вызвал гибель животных [50]; МКА 7B11* – продукт секреции гибридомы крысиного происхождения (автор гибридомы – доктор Перебоев А.В.); NP – белок – мишень не определяется в блоте; - – нет реакции в данном методе; концентрация антигенов 100 нг/лунка.

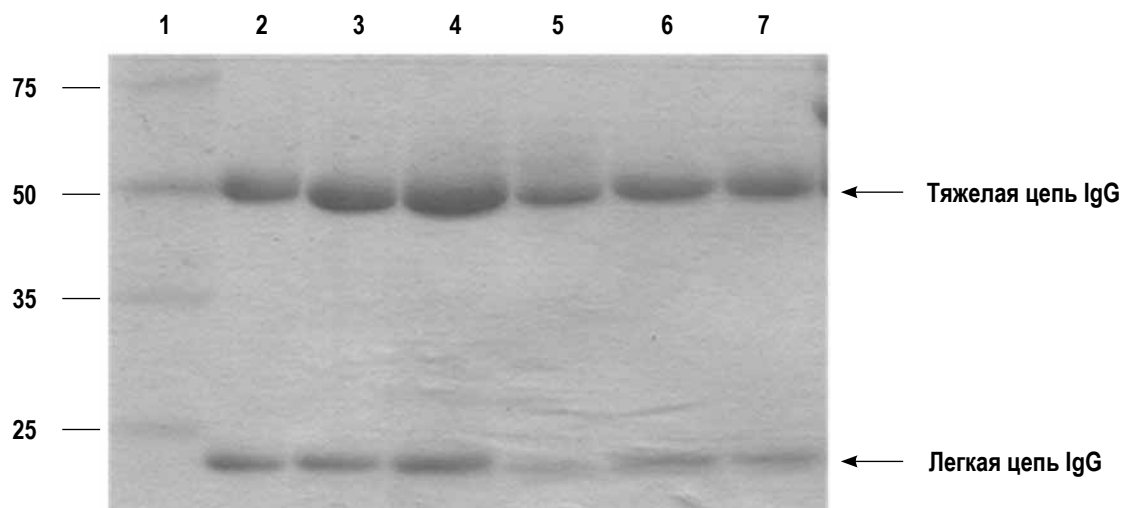


Рисунок 3. Электрофореграмма МКА, очищенных каприловой кислотой

Примечание. 1 – белковые маркеры молекулярного веса (10 мкл) (Bio-Rad); 2, 3, 4 – препараты очищенных мышинных МКА 3F9, 7D8, 7H10, специфичные к ВМ (по 1 мкл); 5, 6, 7 – препараты очищенных мышинных МКА 1C1, 4A2, 1B2, специфичные к ВЭ (по 1 мкл); стрелками обозначены цепи иммуноглобулинов.

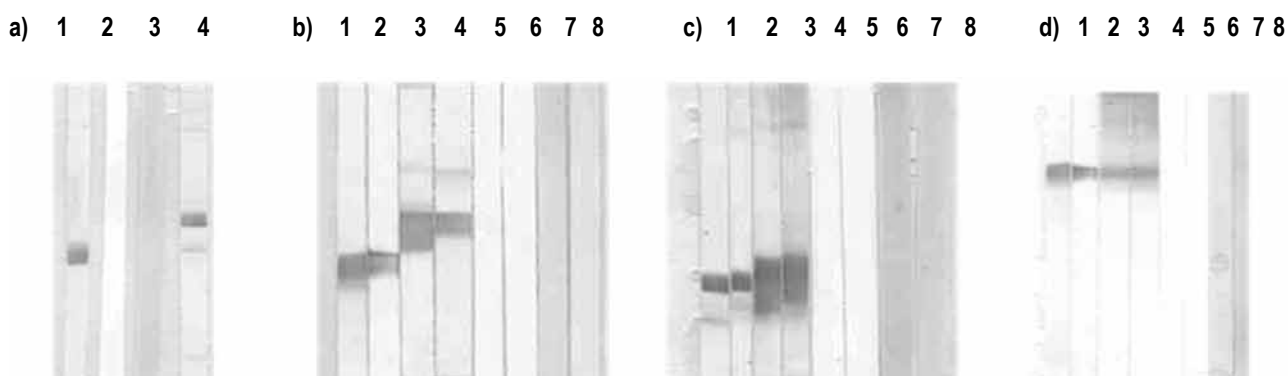


Рисунок 4. Иммуноблот МКА с нативными и рекомбинатными белками вирусов Марбург и Эбола

а) Все полоски мембраны обработаны препаратом очищенных МКА 3F9 в разведении 1:500; 1 – препарат вируса Марбург; 2 – препарат вируса Эбола (отрицательный контроль на антиген); 3 – лизат *E. coli* (отрицательный контроль для рекомбинатного белка); 4 – очищенный рекомбинатный белок VP35.

б) 1 – препарат вируса Марбург, обработан МКА 7H10 в разведении 1:500; 2 – препарат вируса Марбург, обработан МКА 7D8 в разведении 1:500; 3 – рекомбинатный белок VP40, обработан МКА 7H10 в разведении 1:500; 4 – рекомбинатный белок VP40, обработан МКА 7D8 в разведении 1:500; 5 – препарат вируса Эбола, обработан МКА 7H10 в разведении 1:500 (отрицательный контроль); 6 – препарат вируса Эбола, обработан МКА 7D8 в разведении 1:500 (отрицательный контроль); 7 – лизат *E. coli*, обработан МКА 7H10 в разведении 1:500 (отрицательный контроль); 8 – лизат *E. coli*, обработан МКА 7D8 в разведении 1:500 (отрицательный контроль).

с) 1 – препарат вируса Эбола, обработан МКА 4A2 в разведении 1:10 000; 2 – препарат вируса Эбола, обработан МКА 1C1 в разведении 1:10 000; 3 – рекомбинатный белок VP40, обработан МКА 4A2 в разведении 1:10 000; 4 – рекомбинатный белок VP40, обработан МКА 1C1 в разведении 1:10 000; 5 – препарат вируса Марбург, обработан МКА 4A2 в разведении 1:10 000 (отрицательный контроль); 6 – препарат вируса Марбург, обработан МКА 1C1 в разведении 1:10 000 (отрицательный контроль); 7 – лизат *E. coli*, обработан МКА 4A2 в разведении 1:10 000 (отрицательный контроль); 8 – лизат *E. coli*, обработан МКА 1C1 в разведении 1:10 000 (отрицательный контроль).

д) 1 – препарат вируса Эбола, обработан МКА 1B2 в разведении 1:500; 2 – препарат вируса Эбола, обработан МКА 7B11 в разведении 1:500; 3 – рекомбинатный NP, обработан МКА 1B2 в разведении 1:500; 4 – рекомбинатный NP, обработан МКА 7B11 в разведении 1:500; 5 – препарат вируса Марбург, обработан МКА 1B2 в разведении 1:500 (отрицательный контроль); 6 – препарат вируса Марбург, обработан МКА 7B11 в разведении 1:500 (отрицательный контроль); 7 – лизат *E. coli*, обработан МКА 1B2 в разведении 1:500 (отрицательный контроль); 8 – лизат *E. coli*, обработан МКА 7B11 в разведении 1:500 (отрицательный контроль).

Методом конкурентного ИФА (КИФА) МКА были исследованы на способность «захватывать» вирусные и рекомбинантные антигены из раствора и формировать иммунные комплексы на полистироловой поверхности микропланшет. В этом варианте КИФА другой вид МКА, меченных биотином, позволял судить об эффективности реакции захвата антигена. Всего было исследовано 21 вид МКА, специфичных к белкам ВЭ — два к VP35; девять к VP40; десять к нуклеопротеину. Из 16 видов МКА, специфичных к белкам ВМ — три к VP35; девять к VP40; три к нуклеопротеину и один вид МКА не выявлял белка-мишени в иммуноблоте. Было исследовано 399 различных сочетаний пар МКА против ВЭ. Инактивированный антиген ВЭ удовлетворительно выявляли 115 пар МКА (ОП > 1,0), из них 29 пар МКА выявляли рекомбинантные белки (16 пар выявляли VP40; 13 пар — NP). Для выявления антигена ВМ исследовали 224 сочетания пар МКА. Из 74 пар МКА, выявляющих инактивированный антиген ВМ, 15 пар МКА выявляли рекомбинантные белки (11 пар выявляли VP40, 4 пары — VP35). Интересен был факт выявления нативных антигенов парами МКА, специфичных к разным вирусным белкам. Эти данные предполагают сохранение комплексов вирусных белков в препаратах вирусных антигенов после проведения их инактивации. Недавно было показано, что нуклеопротеин ВЭ взаимодействует с матричным белком VP40, и этот процесс обеспечивает формирование вирусной частицы [51]. С помощью конструирования делеционных вариантов рекомбинантного NP ВЭ было определено, что 2-150 а.о. и 601-739 а.о. белка NP обеспечивают это взаимодействие [43]. Известно также несколько экспериментальных иммуоферментных систем на основе поликлональных, моноклональных или сочетанного использования поликлональных и моноклональных антител (МКА) для выявления ВЭ [10, 34, 35, 44]. Только одна группа авторов сообщает о двух экспериментальных системах ИФА на основе «захватывающих» антиген и «индикаторных» МКА, специфичных к GP ВЭ [38] и к VP40 ВЭ [39]. Из описанных в литературе ИФА систем в формате «сэндвич» для выявления ВМ [3, 6, 15] нет системы на основе двух МКА. В некоторых из перечисленных работ показано, что антитела к внутренним структурным вирусным белкам — нуклеопротеину и матричному — успешно выявляли инактивиро-

ванный вирус в биологических пробах экспериментально зараженных животных. Кроме того, при исследовании методом иммуноблота сывороток крови обезьян из возможного ареала распространения филовирюсов, а также людей, переболевших лихорадками Марбург и Эбола, было обнаружено наличие антител к структурным нуклеокапсидным белкам — NP, VP40, VP35, но не к наружному гликопротеину [24]. Интересно отметить, что чувствительность и специфичность ИФА по выявлению филовирюсных антигенов сопоставима с результатами ПЦР [44].

Использование очищенных антигенов и рекомбинантных белков позволяет более точно определять чувствительность выявления индивидуальных антигенов. Так, по литературным данным, очищенный вирусный препарат ВЭ выявляли парой МКА, специфичных к белку VP40, до концентрации 1-2 нг/мл, что соответствовало инфекционному титру 10^3 - 10^4 БОЕ/мл [39]. При использовании МКА для «захвата» антигена была показана возможность выявления рекомбинантного VP40 ВЭ в концентрации приблизительно 2 нг/100 мкл [34] и рекомбинантного NP ВЭ в концентрации 30 нг/100 мкл [42]. Сравнительный анализ чувствительности и специфичности ИФА с использованием МКА, специфичных к рекомбинантному NP ВМ, показал, что результаты ИФА сопоставимы по этим показателям с ПЦР [44]. Кроме того, пара МКА, специфичных к матричному белку VP40, была успешно использована при полевых испытаниях метода иммунофильтрации для выявления вируса Эбола в образцах сыворотки крови, мочи, слюны и пота, собранных во время вспышки ГЛЭ в 2003 г. в Республике Конго [40].

В наших экспериментах удалось выбрать пары МКА, обеспечивающих эффективное выявление антигенов этих двух филовирюсов. Чувствительность выявления рекомбинантных антигенов разными парами МКА колебалась от 150 до 1 нг/мл (данные не представлены). Были выбраны четыре пары МКА, обеспечивающие наиболее высокую чувствительность в нашей системе КИФА. Это МКА 1B2+7B11, специфичные к нуклеопротеину ВЭ; МКА 4A2+1C1, специфичные к белку VP40 ВЭ; МКА 7D8+7H10, специфичные к белку VP40 ВМ; МКА 3F9+3F9, специфичные к VP35 ВМ (рис. 5). Эти сочетания МКА позволяли эффективно выявлять вирусный антиген в концентрации 1-2 нг/мл. Интересно отметить, что

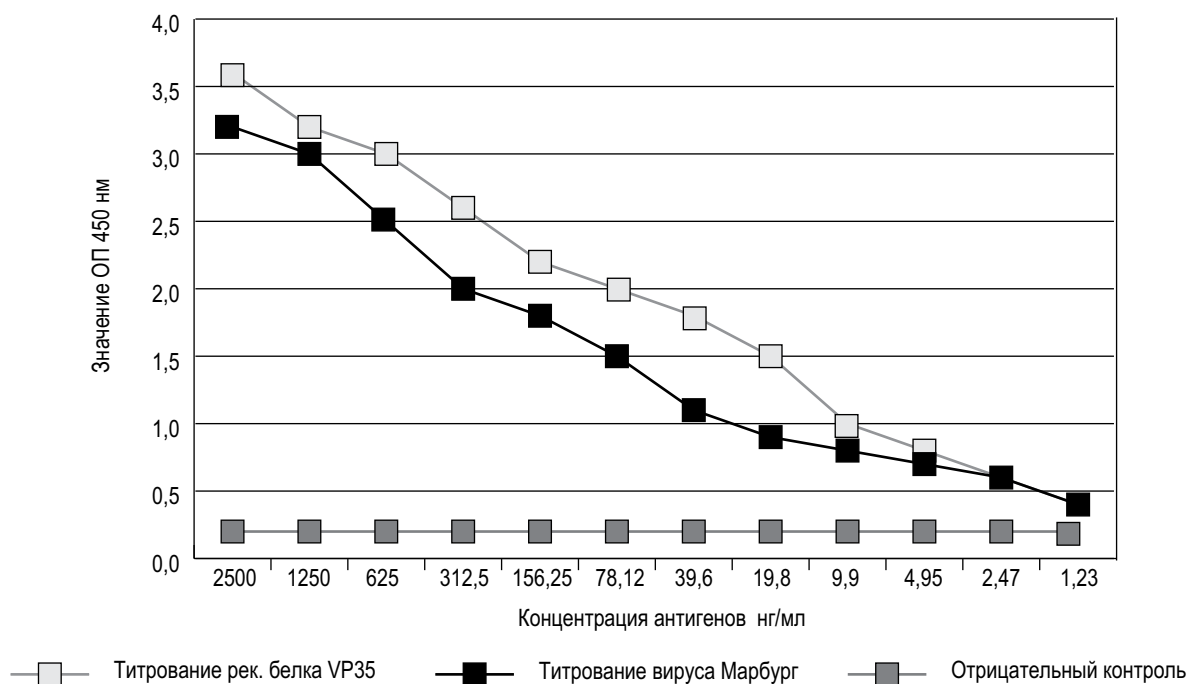


Рисунок 5а. График титрования антигена вируса Марбург и рекомбинантного белка VP35 парой МКА 3F9 и 3F9*

Примечание. В качестве отрицательного контроля использовали захватывающие антиген МКА 1С7, специфичные к белку VP35 вируса Эбола [4].

Исходная концентрация препаратов антигенов по СФ 1 мг/мл, первая точка титрования в разведении 1:400 соответствует концентрации 2500 нг/мл; 3F9*, 7Н10*, 1С1*, 7В11* — индикаторные МКА, меченные биотином.

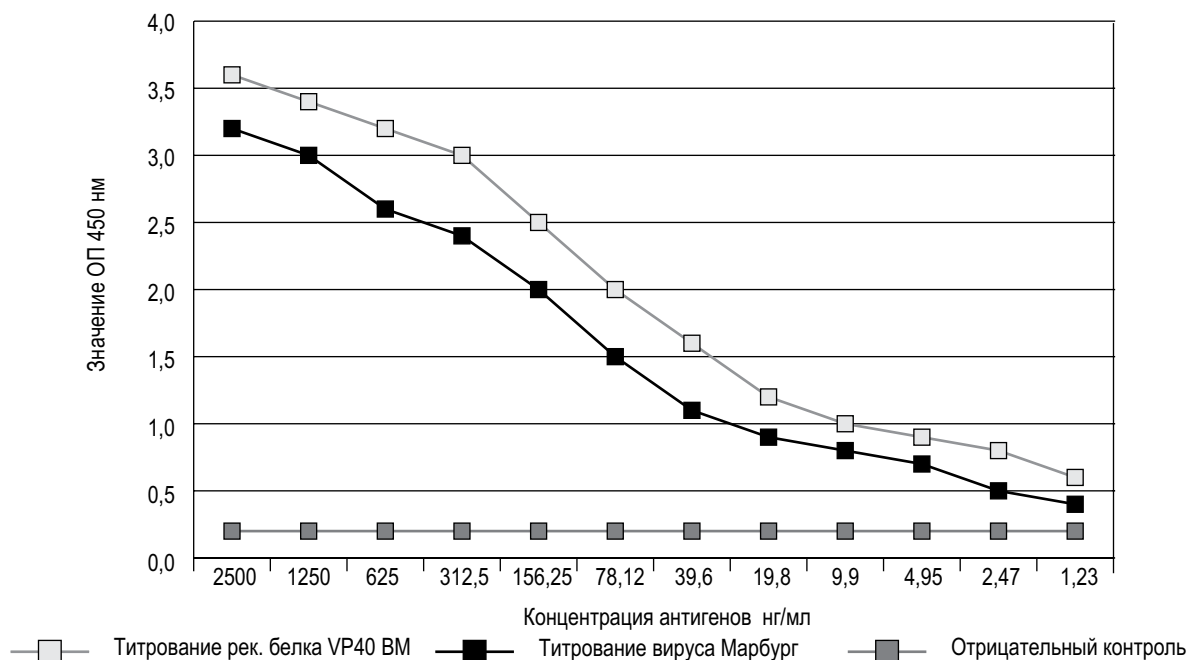


Рисунок 5б. График титрования антигена вируса Марбург и рекомбинантного белка VP40 парой МКА 7D8 и 7Н10*

Примечание. В качестве отрицательного контроля использовали пару МКА 4А2 и 1С1*, специфичные к белку VP40 вируса Эбола.

Исходная концентрация препаратов антигенов по СФ 1 мг/мл, первая точка титрования в разведении 1:400 соответствует концентрации 2500 нг/мл; 3F9*, 7Н10*, 1С1*, 7В11* — индикаторные МКА, меченные биотином.

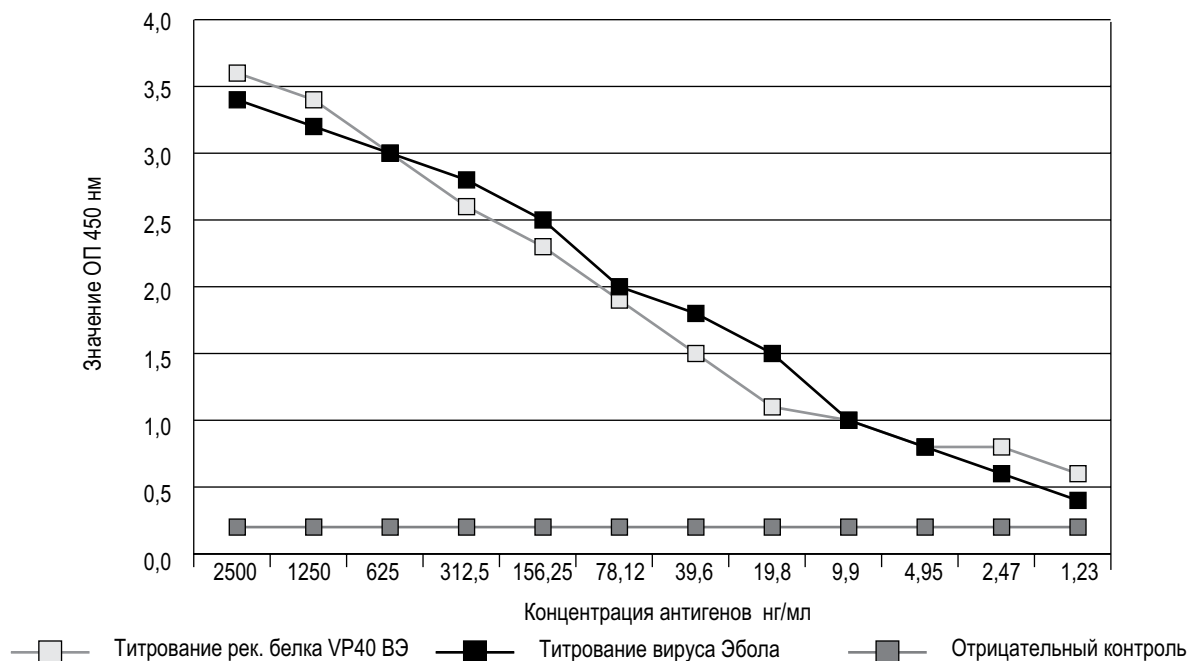


Рисунок 5с. График титрования антигена вируса Эбола и рекомбинантного белка VP40 парой МКА 4A2 и 1C1*

Примечание. В качестве отрицательного контроля использовали пару МКА 7D8 и 7H10*, специфичные к белку VP40 вируса Марбург [14].

Исходная концентрация препаратов антигенов по СФ 1мг/мл, первая точка титрования в разведении 1:400 соответствует концентрации 2500 нг/мл; 3F9*, 7H10*, 1C1*, 7B11* – индикаторные МКА, меченные биотином.

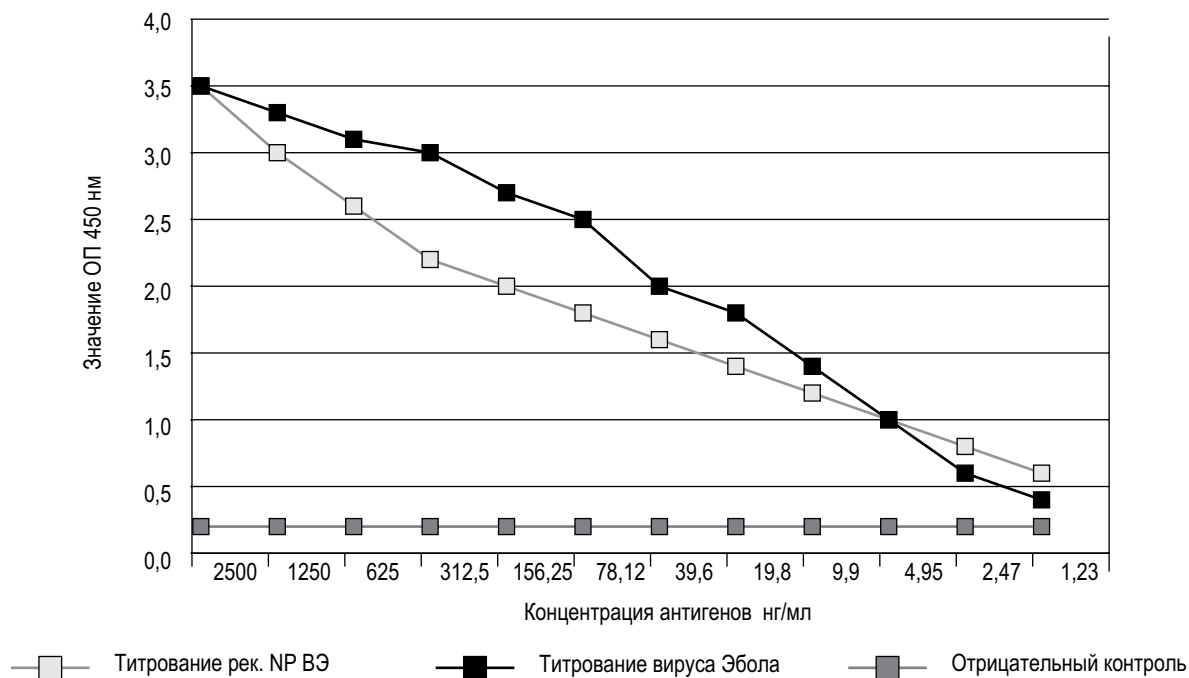


Рисунок 5d. График титрования антигена вируса Эбола и рекомбинантного белка NP парой МКА 1B2 и 7B11*

Примечание. В качестве отрицательного контроля использовали пару МКА 9C7 и 5F11*, специфичных к нуклеопротеину вируса Марбург [14]; концентрация МКА для «захвата» антигенов – 10 мкг/мл; концентрация индикаторных МКА, меченных биотином – 1 мкг/мл.

Исходная концентрация препаратов антигенов по СФ 1мг/мл, первая точка титрования в разведении 1:400 соответствует концентрации 2500 нг/мл; 3F9*, 7H10*, 1C1*, 7B11* – индикаторные МКА, меченные биотином.

МКА 3F9, специфичные к белку VP35 ВМ, можно одновременно эффективно использовать в качестве «захватывающих» антиген, так и в качестве меченных биотином МКА. В двух известных коллекциях мышинных гибридом, продуцирующих МКА к ВМ (штаммы Musoke и Popp) [15, 32], отсутствуют гибридомы, продуцирующие МКА к белку VP35. Это делает МКА 3F9 особенно интересными для дальнейшего практического использования.

Таким образом, выбранные нами пары МКА строго специфичны к внутренним структурным вирусным белкам NP, VP40 и VP35 и не имеют перекрестной реактивности с гетерологичными антигенами и подходят для разработки ИФА тест-систем для выявления филовирюсных антигенов. Это особенно важно, так как ранее нами был обнаружен факт наличия некоторой перекрестной активности поликлональных антител, специфичных к этим двум филовирюсам [4]. Исследование иммунохимических свойств полноразмерных рекомбинантных белков NP, VP40 и VP35 вирусов Эбола и Марбург методами ИФА и иммуноблота показало, что они антигенно подобны нативным вирусным антигенам и могут быть успешно использованы для конструирования иммунодиагностических методов нового поколения. Для их использования не требуется высокого уровня биологической защиты, что совершенно необходимо при работе с филовирюсами.

Благодарности

Исследование поддержано Грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ «Научная школа НШ-387.2008.4» (рук. — д.б.н., профессор Нетесов С.В.).

Список литературы

1. Борисевич В.Н., Михайлов В.В., Краснянский Б.П., Градобоев В.Н., Лебединская Е.В., Потрываева Н.В., Тиманькова Г.Д. Разработка и изучение свойств иммуноглобулинов против лихорадки Эбола // Вопросы вирусологии. — 1996. — № 6. — С. 270-273.
2. Букреев А.А., Скрипченко А.А., Гусев Ю.М., Фролов В.Г., Кандрушин Е.В., Красницкая И.М., Шестопалов А.М. Перспективный метод препаративной наработки и очистки вируса Марбург // Вопросы вирусологии. — 1995. — № 4. — С. 161-165.
3. Владыко А.С., Чепурнов А.А., Быстрова С.И., Лемешко И.Н., Лукашевич И.С. Выявление антигена вируса Марбург методом твердофазного иммуноферментного анализа // Вопросы вирусологии. — 1991. — № 5. — С. 419-421.
4. Казачинская Е.И., Перебоев А.В., Чепурнов А.А., Беланов Е.Ф., Разумов И.А. Моноклональные антитела к вирусу Эбола: получение, характеристика и изучение перекрестной реактивности с вирусом Марбург // Вопросы вирусологии. — 2000. — № 3. — С. 40-44.
5. Казачинская Е.И., Терновой В.А., Рудзевич Т.Н., Нетесов С.В., Чепурнов А.А., Разумов И.А. Исследование антигенной структуры белка VP35 вируса Эбола // Вопросы вирусологии. — 2001. — № 5. — С. 25-31.
6. Кизимов Н.В., Луб М.Ю., Черный Н.Б., Беланов Е.Ф. Использование иммуноферментного анализа (ИФА) для обнаружения антигена вируса Марбург // Межведомственная конференция «Изучение и профилактика особо опасных вирусных инфекций» / Тезисы докладов. 7-8 апреля 1993 г., Кольцово.
7. Луб М.Ю., Сергеев А.Н., Пьянкова О.Г., Пьянков О.В., Петрищенко В.А., Котляров Л.А. Клинико-вирусологические характеристики заболевания морских свинок, аэрогенно инфицированных вирусом Марбург // Вопросы вирусологии. — 1995. — №3. — С. 119-121.
8. Луб М.Ю., Сергеев А.Н., Пьянков О.В., Пьянкова О.Г., Петрищенко В.А., Котляров Л.А. Некоторые патогенетические характеристики заболевания обезьян, аэрогенно инфицированных вирусом Марбург // Вопросы вирусологии. — 1995. — № 4. — С. 158-161.
9. Мерзликин Н.В., Чепурнов А.А., Истомина Н.Н., Офицеров В.И., Воробьева М.С. Разработка и применение иммуноферментных тест-систем для диагностики лихорадки Эбола // Вопросы вирусологии. — 1995. — № 1. — С. 31-35.
10. Мерзликин Н.В. Иммуноферментные тест-системы для изучения лихорадки Эбола: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Кольцово, 1995.
11. Никифоров В.В., Туровской Ю.И., Калинин П.П., Акинфеева Л.А., Каткова Л.Р., Бармин В.С., Рябчикова Е.И., Попкова Н.И., Шестопалов А.М., Назаров В.П., Ведищев С.В.,

Нетесов С.В. Случай лабораторного заражения лихорадкой Марбург // Микробиология. — 1994. — № 3. — С. 104-110.

12. Остерман П.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. — М.: Наука, 1981. — С. 37-64.

13. Пьянков О.В., Сергеев А.Н., Пьянкова О.Г., Перебоева Л.А. Патологические изменения в организме приматов, аэрозольно инфицированных вирусом Эбола // Межведомственная конференция «Изучение и профилактика особо опасных вирусных инфекций»: Тезисы докладов. 7-8 апреля 1993 г., Кольцово.

14. Разумов И.А., Беланов Е.Ф., Букреев А.А., Казачинская Е.И. Моноклональные антитела к белкам вируса Марбург и их иммунохимическая характеристика // Вопросы вирусологии. — 1998. — № 6. — С. 274-279.

15. Ручко С.В., Лебедев В.Н., Пашенко Ю.И., Борисевич Г.В., Семенова И.С., Хамитов Р.А., Максимов В.А., Фирсова И.В., Петровский А.В. Получение и изучение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к структурному гликопротеину вируса Марбург // Вопросы вирусологии. — 2001. — № 6. — С. 21-24.

16. Сорокин А.В., Казачинская Е.И., Качко А.В., Иванова А.В., Букреев А.А., Разумов И.А. Сравнительное исследование антигенных и иммуногенных свойств природного и рекомбинантного белков VP35 вируса Марбург // Вопросы вирусологии. — 1999. — № 5. — С. 206-213.

17. Турьянов М.Х., Царегородцев А.Д., Лобзин Ю.В. Инфекционные болезни — М.: Медицина, 1998.

18. Чепурнов А.А., Мерзликин Н.В., Рябчикова Е.И., Чепурнова Т.С., Волчков В.Е., Истомина Н.И., Кузьмин В.А., Воробьева М.С. Получение очищенного вируса Эбола // Вопросы вирусологии. — 1994. — № 6. — С. 254-257.

19. Чепурнов А.А., Мерзликин Н.В., Чепурнова Т.С., Воробьева М.С. Получение кроличьих антисывороток к вирусу Эбола // Вопросы вирусологии. — 1994. — № 6. — С. 286-288.

20. Чепурнов А.А., Чернухин И.В., Терновой В.А., Кудоярова Н.М., Махова Н.М., Азаев М.Ш., Смолина М.П. Попытка получения вакцины против лихорадки Эбола // Вопросы вирусологии. — 1995. — № 6. — С. 257-260.

21. Чепурнова Т.С., Писанко В.А., Бакулина Л.Ф., Жуков В.А., Чепурнов А.А. Определение содержания вируса Марбург в крови и выделениях экспериментально инфицированных животных // Вопросы вирусологии. — 2000. — № 2. — С. 18-20.

22. Bazin H., Malache I.M, Nisol F., Delaunay T. Rat hybridomas and rat monoclonal antibodies. — Florida: CRC Press. — 1990. — P. 165-201.

23. Bayer EA, Wilchek M. The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology // Methods Biochem. Anal. — 1980. — Vol. 26. — P. 1-45.

24. 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? // J. Med. Microbiol. Immunol. — 1992. — Vol. 181. — P. 43-55.

25. Bente D., Gren J., Strong J.E., Feldmann H. Disease modeling for Ebola and Marburg viruses // Dis. Model Mech. — 2009. — Vol. 2 — P. 12-17.

26. Bowen E.T., Lloyd G., Harris W.J., Platt G.S., Baskerville A., Vella E.E. Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire / Preliminary studies on the aetiological agent // Lancet — 1977. — Vol. 1. — P. 571-573.

27. Elliott L.H., Kiley M.P., McCormick J.B. Descriptive analysis of Ebola virus protein // Virology. — 1985. — Vol. 147. — P. 169-176.

28. Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Streltsova N.A., Kashentseva E.A. Inactivated Marburg virus elicits a nonprotective immune response in Rhesus monkeys // J. of Biotechnology. — 1996. — Vol. 44. — P. 111-118.

29. Gear J.H. Hemorrhagic fevers, with special reference to recent outbreaks in southern Africa // J. Rev. Infect. Dis. — 1979. — Vol. 1. — P. 571-591.

30. Geisbert T.W., Geisbert J.B., Leung A., Daddario-DiCaprio K.M., Hensley L.E., Grolla A., Feldmann H. Single-injection vaccine protects nonhuman primates against infection with Marburg virus and three species of Ebola virus // J. Virol. — 2009. — Vol. 83. — P. 7296-304.

31. Gefler M.L., Margulies D.H., Scharff M.D. A simple method for polyethyleneglycol promoted hybridization of mouse myeloma cells // J. Somat. Cell Genet. — 1977. — Vol. 3. — P. 231-236.

32. Hevey M., Negley D., Geisbert J., Jahrling P., Schmaljohn A. Antigenicity and vaccine potential of Marburg virus glycoprotein expressed by baculovirus

- recombinants // *J. Virology*. — 1997. — Vol. 239. — P. 206-216.
33. Johnson E., Jaax N., White J., Jahrling P. Lethal experimental infection of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus // *Int J. Exp Pathol.* — 1995. — Vol. 76, № 4. — P. 227-236.
34. Kalstrom G., Warfield K.L., Swenson D.L., Mort S., Panchal R.G., Ruthel G., Bavari S., Aman M.J. Analysis of Ebola virus and VLP release using an immunocapture assay // *J. Virological Methods*. — 2005. — Vol. 127, № 1. — P. 1-9.
35. Ksiazek T.G., Rollin P.E., Jahring P.B., Johnson E., Dalgard D.W. Enzyme immunosorbent assay for Ebola virus in tissues of infected primates // *J. of Clinical Microbiology*. — 1992. — Vol. 30, № 4. — P. 947-950.
36. Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., Delicat A., Paweska J.T., Gonzalez J.P., Swanepoel R. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus // *Nature*. — 2005. — Vol. 438. — P. 575-576.
37. Lupton H.W., Lambert R.D., Bumgardner D.L., Moe J.B., Eddy G.A. Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guinea pig model // *Lancet*. — 1980. — Vol. 2. — P. 1294-1295.
38. Luch A., Grunov R., Otterbein C., Moller P., Feldmann H., Becker S. Production of monoclonal antibodies and development of an antigen capture ELISA directed against envelope glycoprotein GP of Ebola virus // *J. Med. Microbiol. Immunol.* — 2004. — Vol. 193. — P. 181-187.
39. Luch A., Grunov R., Moller P., Feldmann H., Becker S. Development, characterization and use of monoclonal VP40-antibodies for the detection of Ebola virus // *J. of Virological Methods*. — 2003. — Vol. 111. — P. 21-28.
40. Luch A., Formenty P., Feldmann H., Gotz M., Leroy E., Batabourila P., Groll A., Feldmann F., Wittmann T., Campbell P., Atsangandoko C., Boumandoki P., Finke E.J., Miethe P., Becker S., Grunow R. Development of an immunofiltration-based antigen-detection assay for rapid diagnosis of Ebola virus infection // *J. Infect. Dis.* — 2007. — Vol. 195. — P. 184-192.
41. Mitchel S.W., McCormick J.B. Physicochemical inactivation of Lassa, Ebola and Marburg viruses and effect on clinical laboratory analyses // *J. Clin. Microbiol.* — 1984. — Vol. 20. — P. 486-489.
42. 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. of Clinical Microbiology*. — 2001. — Vol. 39. — P. 3267-3271.
43. Noda T., Watanabe S., Sagara H., Kawaoka Y. Mapping of the VP40-binding regions of the nucleoprotein of Ebola virus // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81. — P. 3554-3562.
44. Saijo M., Niikura M., Maeda A., Sata T., Kurata T., Kurane I., Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay // *J. Med. Virol.* — 2005. — Vol. 76. — P. 111-118.
45. Science News. Poaching, logging, and outbreaks of Ebola threaten central african gorillas and chimpanzees // *Science Daily* Aug. 31. — 2005.
46. Swenson D., Wang D., Luo M., Warfield K.L., Woraratanadharm J., Holman D.H., Dong J.Y., Pratt W.D. Complete protection of nonhuman primates against multistrain Ebola and Marburg virus infections // *J. Clin. Vaccine Immunol.* — 2008. — Vol. 15. — P. 460-467.
47. Towner J.S., Khristova M.L., Sealy T.K., Vincent M.J., Erickson B.R., Bawiec D.A., Hartman A.L., Comer J.A., Zaki S.R., Ströher U., Gomes da Silva F., del Castillo F., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Nichol S.T. Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola // *J. Virol.* — 2006. — Vol. 80. — P. 6497-6516.
48. Towner J.S., Rollin P.E., Bausch D.G., Sanchez A., Crary S.M., Vincent M., Lee W.F., Spiropoulou C.F., Ksiazek T.G., Lukwiya M., Kaducu F., Downing R., Nichol S.T. Rapid diagnosis of Ebola fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome // *J. Virol.* — 2004. — Vol. 78. — P. 4330-4341.
49. Rowe A.K., Bertolli J., Mukunu R., Muyembe-Tamfum J.J., Bressler D., Williams A.J., Peters C.J., Rodriguez L., Feldmann H., Nichol S.T., Rollin P.E., Ksiazek T.G. Clinical, virologic and immunologic follow up of convalescent Ebola haemorrhagic fever patients and their household contacts, Kikwit Democratic Republic of the Congo // *J. Infect. Dis.* — 1999. — Vol. 179. — P. 28-35.
50. Volchkov V.E., Chepurnov A.A., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Klenk H.D. Molecular characterization of guinea pig — adapted variants

of Ebola virus // Virology. — 2000. — Vol. 277. — P. 147-155.

51. Watanabe S., Noda T., Kawaoka Y. Functional mapping of nucleoprotein of Ebola virus // J. Virol. — 2006. — Vol. 80. — P. 3743-3751.

52. WHO report 1995, 2007. Ebola haemorrhagic fever in Zaire.

53. WHO reports 1996, 1997, 2001, 2002. Ebola haemorrhagic fever in Gabon.

54. WHO reports 2000, 2001, 2007. Ebola haemorrhagic fever in Uganda.

55. WHO reports 2002, 2003, 2005. Ebola haemorrhagic fever in Congo.

56. WHO report 2004. Ebola haemorrhagic fever in Sudan.

поступила в редакцию 01.02.2010

принята к печати 12.02.2010