

А.А.Петров, В.Н.Лебедев, Л.Ф.Стовба, Т.Е.Сизикова, Т.М.Плеханова, О.Н.Сидорова, Н.С.Пышная, Д.И.Павельев, С.В.Борисевич

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ГЕНОМА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *EBOLAVIRUS*

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны, Сергиев Посад, Российская Федерация

Рассмотрены молекулярно-генетические особенности структуры генома представителей рода *Ebolavirus*. Отмечено, что эпидемические вспышки лихорадки Эбола в Африке представляют потенциальную угрозу для здравоохранения не только стран этого континента, но и всего мира, вследствие возможности завоза возбудителя в неэндемичные регионы. Представители рода *Ebolavirus* обладают различной патогенностью для человека, что определяет различия показателей смертности и тяжести болезни. Между представителями рода *Ebolavirus* имеется значительная генетическая дивергенция. Изменение патогенного потенциала представителей рода *Ebolavirus* может быть объяснено мутациями в генах структурных белков вируса. Вероятно, некоторые мутации в этих генах могут оказывать влияние на вирулентность штаммов в пределах одного вида вируса. Поскольку наиболее эффективные имеющиеся на сегодняшний день средства экстренной профилактики и лечения имеют строго дифференцированную направленность, генотипирование представляет большое значение при разработке стратегии создания таких препаратов.

Ключевые слова: вирус Эбола, филовирусы, секвенирование, ген, генотипирование.

A.A.Petrov, V.N.Lebedev, L.F.Stovba, T.E.Sizikova, T.M.Plekhanova, O.N.Sidorova, N.S.Pyshnaya, D.I.Paveliev, S.V.Borisevich

The Molecular Genetic Peculiarities of Genomic Structure of Members of the *Ebolavirus* Genus

48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation

The molecular genetic peculiarities of genomic structure of the *Ebolavirus* genus members are viewed in the review. The Ebola virus disease outbreaks in West African countries constitute a threat not only for Africa, but for the whole world in view of possible introduction of the agent in non-endemic regions. The members of the *Ebolavirus* genus have different pathogenicity for humans, thus differ severity and mortality of the disease they cause. There is a significant genetic divergence among members of the *Ebolavirus* genus. The differences of pathogenic potential of members of the *Ebolavirus* genus may be explained as the result of mutations in the genes of virus structural proteins. It is possible, that some of these mutations may affect virulence of strains within one virus species. So far as most effective modern medicines for specific prophylaxis and treatment of Ebola fever are target-oriented, genotyping of the agent will promote elaboration of strategy of such preparations development.

Key words: Ebola virus, filoviruses, sequencing, gene, genotyping.

Лихорадка, вызываемая вирусами, входящими в род *Ebolavirus* семейства *Filoviridae*, является особо опасной вирусной болезнью, характеризующейся шоком, геморрагиями, мультиорганной недостаточностью и заканчивающейся летальным исходом в 50–90 % случаев [8, 17].

Всего на конец апреля 2015 г. зарегистрировано около 26 тыс. случаев болезни, погибли свыше 12 тыс. человек.

В настоящее время считают, что вирус Эбола Заир дивергировал от общего для филовирусов предка около 10000 лет назад [5, 9]. Число нуклеотидных замен за год для различных представителей рода *Ebolavirus*, определенное при анализе 97 полноразмерных геномных последовательностей с применением методологии Vagesian, колеблется от $0,46 \cdot 10^{-4}$ (для вируса Эбола Судан) до $8,21 \cdot 10^{-4}$ (для вируса Эбола Рестон) [6].

Строение генома вируса Эбола сходно с таковыми для других представителей семейства *Filoviridae*.

Вирион содержит нефрагментированную минус РНК, содержащую приблизительно 18900 нуклеотидов и кодирующую 7 структурных и 1 неструктурный белок. Порядок генов на геноме: 3'-концевая лидерная область, гены нуклеопротеина, вирусных белков VP35, VP40, гликопротеина, VP30, VP24, РНК-зависимой РНК-полимеразы (L белок), 5'-конец. Нуклеопротеин, белки VP30, VP35 и L – ассоциированы с вирусной геномной РНК в рибонуклеопротеиновый комплекс. L белок и белок VP35 образуют полимеразный комплекс, который транскрибирует и реплицирует вирусный геном [1].

Вирусные белки играют ключевую роль во взаимодействии вирус-хозяин при лихорадке Эбола, соответствующие гены при этом могут подвергаться селективному давлению. У человека NP и VP40 вызывают сильный иммунный ответ (индуцирование формирования специфических иммуноглобулинов изотипа IgG) [14]. Гликопротеин вируса Эбола индуцирует разрушение эндотелиальных клеток и ци-

тотоксичность в кровеносных сосудах [24] и опосредует входение в хозяйскую клетку [16]. Мутации в гене белка VP24 ассоциированы с адаптацией вируса Эбола к различным хозяевам [23].

H.Ebihara *et al.* [7] провели определение молекулярных детерминант вирулентности вируса Эбола Заир для белых мышей. Изучены исходный штамм Mayanga-76 и адаптированные к белым мышам вариант MA-ZEBOV, созданный с помощью серийных пассажей вируса в данных лабораторных животных, и вариант MA-RG, полученный с помощью методов обратной генетики. В таблице представлено сравнение геномных последовательностей родительского штамма и вариантов на его основе.

Авторы делают вывод, что одиночные замены нуклеотидов (по сравнению с вирусом дикого типа) в генах белков VP35, GP и L обуславливают различия по вирулентности для мышей.

M.Mateo *et al.* [15] установили, что проведенная с помощью методов обратной генетики адаптация вируса Эбола к морским свинкам, приводящая к повышению вирулентности возбудителя для данных лабораторных животных, достигается за счет трех аминокислотных замен в структурном белке VP24 (метионина на изолейцин в позиции 71, лейцина на пролин в позиции 147 и треонина на изолейцин в позиции 187).

Из представленных данных следует, что наиболее перспективными вариабельными участками генома для проведения генотипирования различных штаммов и изолятов вируса Эбола Заир являются гены белков VP35 и VP24.

Оба эти белка обладают ингибирующим эффектом на хозяйский интерферонный ответ типа 1. Кроме того, VP35 функционирует как антагонист интерферона типа 1, блокируя активацию регуляторного фактора 3 интерферона и, таким образом, предотвращает транскрипцию интерферона β [3, 4]. Мутации в гене белка VP35 приводят к адаптации вируса к морским свинкам и белым мышам [7, 18].

Экспрессия VP24 подавляет сигнальные пути интерферона типа 1 [19], а мутация в этом гене связана с адаптацией вируса Эбола к мышам [7] и морским свинкам [22].

Поскольку имеется значительная генетическая дивергенция между представителями рода *Ebolavirus*, то более низкий патогенный потенциал вируса Эбола Судан по сравнению с вирусом Эбола Заир может быть объяснен мутациями в генах вирусных белков. Вероятно, некоторые мутации вируса в генах структурных белков могут оказывать влияние на вирулентность штаммов в пределах одного вида вируса.

При идентификации представителей рода *Ebolavirus*, выделенных в ходе эпидемических вспышек, весьма большое значение имеет проведение генотипирования. Поскольку наиболее эффективные имеющиеся на сегодняшний день средства экстренной профилактики и лечения (гуманизированные моноклональные антитела к гликопротеину вируса Эбола Заир и малые интерферирующие РНК) имеют строго дифференцированную направленность, генотипирование играет определяющую роль при разработке стратегии проведения последующих противоэпидемических мероприятий [2, 10, 12].

В ходе исследований проведен анализ последовательностей геномных РНК представителей рода *Ebolavirus*, депонированных в GenBank. Для вируса Эбола Заир опубликованы 22 полноразмерные последовательности генома. Это образцы, содержащие геномные последовательности изолятов, выделенных во время вспышки в Заире в период с 1976 по 1979 год около г. Ямбуку (3 последовательности), в 1995 г. около г. Киквит (3 последовательности), в 2007–2008 гг. около г. Лубебо (9 последовательностей). Семь последовательностей представляют изоляты от больных лихорадкой Эбола в Габоне с 1995 по 2002 год.

Вспышки в Ямбуку и Киквите были самыми большими из известных зарегистрированных до

Несинонимические и синонимические замены между диким типом вируса Эбола Заир и адаптированными к белым мышам вариантами [7]

Позиция нуклеотида	Ген белка	Нуклеотиды для геномов вируса Эбола Заир			Аминокислотные замены
		штамм Mayanga-76	вариант MA-ZEBOV	вариант MA-RG	
683	NP	U	C	C	Серин→глицин
2425	NP	A	G	A	Нет
3163	VP35	G	A	A	Аланин→валин
5219	VP40	A	G	G	Нет
6231	GP	A	G	G	Серин→пролин
6774	GP	A	G	G	Серин→пролин
7668	GP	A	G	G	Изолейцин→триптофан
9563	VP30 NCR	U	C	C	Нет
10243–10244	VP24 NCR	Делеция	U	U	Вставка
10493	VP24	G	A	A	Триптофан→изолейцин
14380	L	A	C	C	Фенилаланин→лейцин
16174	L	U	C	C	Изолейцин→валин
16755	L	A	C	A	Нет

2014 г. вспышек лихорадки Эбола (более чем 300 случаев каждая). Обе вспышки связаны с зоокоммиальной инфекцией, в результате которой вирус быстро распространялся между пациентами, обслуживающим персоналом и членами их семей. Во время вспышки 1995 г. в г. Киквит проведено секвенирование GP гена из изолятов вируса, полученных в начале и в конце вспышки от больных с летальным и нелетальным исходом заболевания. Оно показало высокую генетическую однородность гена GP различных изолятов [13].

Анализ структуры генов GP, NP, VP40 и VP24 вируса Эбола, выделенных во время вспышки 1995 г. в г. Киквит (Демократическая Республика Конго), показал отсутствие различий между изолятами вируса, выделенными от умерших, выживших и лиц с бессимптомной формой инфекции [20].

Меньшие по масштабу вспышки в Габоне эпидемиологически и генетически связаны с повторяющимися контактами с инфицированными низшими приматами или другими млекопитающими, являющимися резервуаром инфекции [13].

Максимальные нуклеотидные различия между последовательностями в пределах вида Эбола Заир не превышают 3,2 %. Генетическое разнообразие между изолятами в пределах одной вспышки было даже меньшим. Например, расхождение между последовательностями изолятов от пациентов в г. Луебо (Заир), собранных в 2007 и 2008 гг., было менее чем 0,07 %. При разделении геномных последовательностей вируса Эбола Заир на кластеры важную роль играют пространственные (место выделения) и временные (год выделения) факторы. Последние, видимо, имеют более существенное значение. Так, изоляты из г. Луебо более близки к изолятам, выделенным в г. Ямбуку, нежели к изолятам, выделенным в 1995 г. в г. Киквит.

Последовательности вируса Эбола Судан представлены пятью полногеномными последовательностями вируса Судан, по одной из каждой вспышки. Для генетического разнообразия данных последовательностей пространственные факторы играют более важную роль, чем временные. Так, изоляты, выделенные в Судане, были генетически стабильными на протяжении приблизительно 30 лет. Изоляты из Уганды образуют кластер, отличающийся от Суданского. Генетическое разнообразие изолятов в пределах каждого кластера было низким (менее 0,4 % для Судана и приблизительно 0,6 % для Уганды). Максимальное разнообразие изолятов в пределах вида Эбола Судан было также низким, максимальная нуклеотидная дивергенция (5,2 %) выявлена между изолятами, выделенными в Судане в 2004 г. и в Уганде в 2011 г.

E.M.Leroy *et al.* [13] определили полные открытые рамки трансляции генов белков GP, NP, VP40 и VP24 в изолятах вируса Эбола Заир, выделенных от умерших больных, пациентов, выживших после перенесенной болезни с выраженными клиническими симптомами и инфицированных людей, у которых

отсутствовали манифестные признаки болезни при вспышке лихорадки Эбола в 1996 г. в Габоне. Пробы крови получали рандомизированно на протяжении вспышки. Девять подвергшихся исследованию проб получены от трех пациентов, болезнь которых завершилась летальным исходом, трех выживших пациентов с выраженными симптомами болезни и трех инфицированных людей без выраженных симптомов. В каждой группе одна вирусная последовательность определялась в пробе, отобранной в начале эпидемии, а две другие получены из проб на протяжении эпидемии. В результате ПЦР-амплификации получены фрагменты, равные 2174 (GP), 1767 (NP), 1069 (VP40) и 853 (VP24) пар нуклеотидов (п.н.). Различий в нуклеотидных последовательностях гена белка NP трех категорий пациентов не обнаружено. В гене белка VP40 выявлена только одна синонимическая замена (C→T) в изолятах от трех пациентов без клинических симптомов болезни. Анализ гена белка VP24 выявил только одну обратную мутацию G→A в одном изоляте от пациента без клинических симптомов болезни.

Выравнивание последовательностей в секвенированной области GP гена (2174 п.н.) между штаммами Booue-96 и Mayinga-76 вируса Эбола Заир показало только 36 нуклеотидных замен, приводящих к 15 аминокислотным изменениям. Большинство этих мутаций было локализовано в середине GP гена в варибельной области, которая является субтипоспецифической. В этой гиперварибельной области размером 180 нуклеотидов выявлено 14 нуклеотидных замен (включая 10 несинонимических) между штаммами Booue-96 и Mayinga-76. Почти 40 % замен локализованы на участке, составляющем менее чем 9 % последовательностей гена GP.

Два изолята вируса Эбола из Габона образуют субкластер в пределах вируса Эбола Заир. Уровень нуклеотидных замен в GP гене между данными изолятами составляет только 0,39 %, в то время как соответствующий показатель между изолятами из Габона и штаммами Mayinga-76 и Kikwit-95 составляет 0,79 и 1,04 % (8 и 21 замена соответственно). При анализе различий между штаммами из Заира и Габона на аминокислотном уровне выявлен только один сайт, локализованный в гиперварибельной области (замена аспарагиновой кислоты на аланин).

Генетическое разнообразие, наблюдаемое между генами NP белка различных вирусов, входящих в род *Ebolavirus*, было меньшим, чем выявленное при анализе гена GP. Уровень варибельности NP гена вирусов Эбола Заир и Эбола Судан составляет около 30 % по сравнению с 70 % для гена GP. Варибельность между вирусами Эбола Заир и Эбола Судан локализована, в основном, в N-концевой части NP гена. Замены среди изолятов вируса Эбола Заир не локализованы в специфической области, но наблюдались на всем протяжении гена белка NP. Уровень варибельности между штаммами Booue-96 и Gabon-94 вируса Эбола Заир составил 0,91 % (18 нуклеотид-

ных замен) [13].

В результате проведенных исследований не выявлены различия в нуклеотидных последовательностях GP и NP генов среди изолятов, выделенных у погибших, выживших и пациентов без проявления клинических признаков болезни. Авторы идентифицировали только по одной синонимической замене в генах белков VP40 и VP24 между пациентами с симптомами и инфицированными пациентами, у которых болезнь протекала бессимптомно. Гены белков GP, NP, VP40 и VP24 изолятов вируса Эбола Заир от трех категорий пациентов являются идентичными и предполагают, что инфицирующий агент во всех случаях был одним и тем же. Авторы делают вывод, что различия в клинике эболавирусной инфекции у людей не обусловлены вирусными мутациями. Эти данные согласуются с теми, которые наблюдались на протяжении вспышки в Киквите в 1995 г., когда не было идентифицировано замен в самой большой дивергентной области GP гена (249 нуклеотидов) между изолятами от погибших и изолятами от выживших [13].

В отличие от больших РНК-содержащих вирусов возбудитель лихорадки Эбола характеризуется высокой генетической стабильностью, которая может быть обусловлена четырьмя основными факторами: низкой погрешностью специфического действия РНК-полимеразы, достаточно медленной репликацией в природном резервуаре инфекции, ограниченном числе чувствительных природных хозяев и слабым иммунным давлением [1, 2, 5, 6, 8].

Уровень несинонимических замен в NP гене при сравнении двух изолятов вируса Эбола Заир из Габона значительно больше, чем между штаммами Booue-96 и Mayinga-76 и штаммами Booue-96 и Kikwit-95 (1,27 против 0,95 и 0,63 % соответственно) [13].

Для объяснения этого факта предлагаются две основные гипотезы:

- два штамма вируса Эбола Заир из Габона могли дивергировать намного раньше, чем это предполагается на основе данных структуры гена GP [13]. Однако сосуществование двух различных штаммов без раздельной генетической рекомбинации в подобных географических и временных условиях могло быть возможным, если вирусы имели свои собственные экологические ниши;

- данные штаммы дивергировали недавно, но разделение сопровождалось изменением в природном хозяине (виды или гены), приводящим к разнообразным иммунным давлениям на NP ген [21].

Свойства генетической структуры вируса Эбола могут быть применены при создании профилактических и лечебных средств против лихорадки Эбола. Ген NP белка является потенциальной мишенью для антивирусных препаратов. Экстремально высокая генетическая стабильность каждого вируса, входящего в род *Ebolavirus*, может быть использована при разработке вакцин нового поколения.

S.K.Gure *et al.* [11] провели генотипирование 99

изолятов вируса Эбола Заир, выделенных от 78 больных в Сьерра-Леоне с подтвержденным диагнозом «лихорадка Эбола». Между последовательностями геномной РНК изолятов, выделенных во время эпидемической вспышки 2014 г., и уже опубликованными 20 геномными последовательностями вируса Эбола из более ранних вспышек выявлена 341 нуклеотидная замена (35 несинонимических, 173 синонимических и 133 в области некодирующих регионов). При анализе изолятов, выделенных от больных пациентов в ходе вспышки 2014 г., выявлено 55 одонуклеотидных замен (15 несинонимических, 25 синонимических и 15 в области некодирующих регионов).

Секвенирование с глубоким покрытием (более 2000 раз) геномной РНК изолятов, выделенных от пациентов из Сьерра-Леоне, позволило идентифицировать 263 внутривидовых варианта генома с заменой одного нуклеотида (73 несинонимических, 108 синонимических, 70 в области некодирующих регионов и 12 с изменением рамки считывания) [11].

Филогенетическое сравнение изолятов, выделенных в период вспышки 2014 г., со всеми ранее опубликованными последовательностями геномной РНК вируса Эбола показывает, что возбудители, вызвавшие 3 последних вспышки болезни, имеют общего предшественника, а различия между их геномами проявились не ранее 2004 г.

Генетическое подобие секвенированных в 2014 г. изолятов предполагает наличие простой трансмиссии из природного резервуара с последующей передачей от человека к человеку на протяжении вспышки. В то же время анализ полученных результатов дает основание предположить, что вспышка в Сьерра-Леоне произошла из двух генетически различающихся между собой вариантов вируса Эбола, распространившихся из Гвинеи приблизительно в одно и то же время.

Изоляты от первых 12 заболевших лихорадкой Эбола в Сьерра-Леоне распались на два различных кластера. Результаты генотипирования позволяют утверждать, что генетическое расхождение этих изолятов произошло только в конце апреля 2014 г. Повторно эти линии выявлены в Сьерра-Леоне в конце мая. Эти данные дают основание предполагать, что инфицирование последующих больных проходило на похоронных процессиях. При анализе новых вспышек болезни в Сьерра-Леоне неизменно выявляли только эти 2 линии вируса Эбола Заир. Это согласуется с эпидемиологической информацией, полученной в результате отслеживания контактов больных [11].

Наблюдаемые уровни нуклеотидных замен при эпидемии 2014 г. характеризуются как высокие. На протяжении эпидемии чаще проявляются несинонимические мутации. Вопрос о том, являются ли индивидуальные мутации вредными или даже адаптивными, потребует углубленного изучения, однако скорость несинонимических мутаций дает основание предположить, что дальнейшее развитие этой

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

эпидемической вспышки может привести к адаптации вируса, что, в свою очередь, указывает на необходимость как можно более быстрой ликвидации эпидемической вспышки лихорадки Эбола.

Анализ многочисленных генетических изменений изолятов, выделенных при эпидемии 2014 г., не дает ответа на вопрос о том, действительно ли эти изменения связаны с тяжестью вспышки.

Анализ данных литературы по секвенированию генома представителей рода *Ebolavirus* дает возможность сделать следующие выводы:

- уровень геномных различий между отдельными вирусами, входящими в род *Ebolavirus*, дает возможность дифференцировать их с помощью ОТ-ПЦР (при выявлении в последней различных участков генома, например, генов белков L, GP, NP);

- дифференциация геномных различий между изолятами, относящимися к одному и тому же виду вируса, может быть проведена только с помощью генотипирования. Данное обстоятельство имеет особое значение хотя бы потому, что с учетом продолжающейся эпидемии, начавшейся в ряде стран Западной Африки еще в декабре 2013 г., этиологическим агентом лихорадки Эбола более чем в 90 % случаев является вирус Эбола Заир;

- влияние пространственных и временных факторов на изменение структуры генома не дает однозначно трактуемых результатов;

- генотипирование изолятов вируса Эбола Заир, выделенных от больных в Сьерра-Леоне с подтвержденным диагнозом «лихорадка Эбола», позволило выявить общего предшественника эпидемической вспышки 2014 г. и трех предшествующих вспышек;

- данные генотипирования позволяют выявить вероятные источники распространения инфекции в ходе эпидемических вспышек болезни.

Таким образом, представители рода *Ebolavirus* обладают стабильным геномом, сходным с другими вирусами семейства *Filoviridae*. Нуклеотидные различия в пределах вида Эбола Заир не превышают 3,2 %. Генетическое разнообразие нуклеотидных последовательностей для вида Эбола Судан также является низким.

Вирусные белки VP35 и VP24 играют первоначальную роль во взаимодействии вирус-хозяин. Мутации в них оказывают влияние на вирулентность штаммов в пределах вида. Так, нуклеотидные замены в гене белка VP35 обеспечивают, в основном, адаптацию вируса Эбола Заир к белым мышам, а в гене белка VP24 – к морским свинкам. Кроме того, различия в нуклеотидных последовательностях наблюдаются в середине GP гена, причем эта область является субтипоспецифической. Поскольку ген NP белка относительно стабилен, то он является наиболее перспективной мишенью при создании антивирусных препаратов.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

- Albarino C.G., Shoemaker T., Khristova M.L., Wamala J.F., Muyembe J.J., Balinandi S. Genomic analysis of filoviruses associated with four viral hemorrhagic fever outbreaks in Uganda and the Democratic Republic of the Congo in 2012. *Virology*. 2013; 442:97–100.
- Bao Y., Chetverin V., Tatusova T. Pairwise sequence comparison (PASC) and its application in the classification of filoviruses. *Viruses*. 2012; 4:1318–27.
- Basler C., Mikulasova A., Masrtinez-Sobrido L., Paragas J., Muhlberger E., Bray M., Klenk H.D., Pales P., Garcia-Sastre A. The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* 2003; 77:7945–56.
- Basler C., Wang X., Muhlberger E., Volchkov V., Paragas J., Klenk H., Garcia-Sastre A., Palese P. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97:12289–94.
- Biek R., Walsh P.D., Leroy E.M., Real L.A., Recent common ancestry of Ebola Zaire virus found in a bat reservoir. *PLoS Pathog.* 2006; 2:90.
- Carroll S.A., Towner J.S., Sealy T.K., McMullan L.K., Khristova M.L., Burt F.J., Swanepoel R., Rollin P.E., Nichol S.T. Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole-genome sequences. *J. Virol.* 2013; 87:2608–16.
- Ebihara H., Takada A., Kobassa D., Jones S., Neumann G., Theriault S., Bray M., Feldmann H., Kawaoka Y. Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice. *PLoS Pathog.* 2006; 2(7):73.
- Feldmann H., Geisbert T.W. Ebola hemorrhagic fever. *Lancet*. 2011; 377:849–62.
- Grard G., Biek R., Tamfum J.J., Fair J., Wolfe N., Formenty P., Paweska J., Leroy E. Emergence of divergent Zaire Ebola virus strains in Democratic Republic of the Congo in 2007 and 2008. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(3):776–84.
- Grolla A., Lucht A., Dick D., Strong J.E., Feldman H. Laboratory diagnosis of Ebola and Marburg hemorrhagic fever. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2005; 98:205–9.
- Gure S.K., Goba A., Andersen K.G., Sealfon R.S.G., Parc D.J., Kanneh L., Jalloh S., Momoh M., Fullah M., Dudas G., Wohl S., Moses L.M., Yozwiak N.L., Winnicki S., Matranga C.B., Malboeuf C.M., Qu J., Gladden A.D., Schaffner S.F., Yang X., Jiang P.P., Nekoui M., Colubri A., Coomber M.R., Fonnin M., Moigboi A., Gbakie M., Kamara F.K., Tucker V., Yillah M., Kanneh F., Robert F., Massally J.L., Chapman S.B., Bochicchio J., Murphy C., Nusbaum C., Young S., Birren B.W., Grant D.S., Scheffellin L.S., Lander E.S., Happt C., Gevaio S.M., Gnirke A., Rambaut A., Gallo R.F., Khan S.H., Sabeti P.C. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*. 2014; 345:1369–72.
- Lauber C., Gorbalenya A.E. Genetics-Based Classification of Filoviruses Calls for Expanded Sampling of Genomic Sequences. *Viruses*. 2012; 4:1425–37.
- Leroy E.M., Baize S., Mavoungou E., Apetrey C. Sequence analysis of the GP, NP, VP40 and VP24 genes of Ebola virus isolated from deceases, surviving and asymptotically infected individuals during the 1996 outbreak in Gabon: comparative studies and phylogenetic characterization. *J. Gen. Virol.* 2002; 83:56–73.
- Leroy E.M., Baize S., Volchkov V.E., Fisher-Hoch S. P., Georges-Courbot M. C., Lansoud-Soukate J., Capron M., Debre P., McCormick J. B., Georges A. J. Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *Lancet*. 2000; 355:2210–15.
- Mateo M., Carbonelle C., Reynard O., Kolesnikova L., Nemirov K., Page A., Volchkova V.A., Volchkov V.E. VP24 is a molecular determinant of Ebola virus virulence in guinea pigs. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(3):1011–20.
- Mingo R.M., Simmons J.A., Shoemaker C.J., Nelson E.A., Schornberg K.L., D'Souza R., Casanova J.E., White J.M. Ebola virus and severe acute respiratory syndrome Coronavirus display late cell entry kinetics: evidence that transport to NPC1⁺ endolysosomes is a rate-defining step. *J. Virol.* 2015; 89(5):2931–43.
- Pourrut X., Kumulungui B., Wittmann T., Moussavou G., Delic A., Yaba P., Nkoghe D., Gonzalez J.P., Leroy E.M. The natural history of Ebola virus in Africa. *Microbes Infect.* 2005; 7(7–8):1005–14.
- Prins K.S., Delpout S., Leung D.W., Reunard O., Volebkova V.A., Reid S.P., Ramanan P., Cardenas W.B., Amarasinghe G.K., Volchov V.E., Basler C.F. Mutations abrogating VP 35 interaction with double stranded RNA render Ebola virus avirulent in guinea pigs. *J. Virol.* 2010; 84:3004–15.
- Reid S.P., Leung D.W., Hartman A.L., Martinez O., Shaw M.L., Carbonnelle C., Volchov V.E., Nichol S.T., Basler C.F. Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha 1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J. Virol.* 2006; 80:5156–67.
- Rodriguez L., De Roo A., Guimard Y., Trappier S., Sanchez A., Bressler D., Williams A., Rowe A., Bertolli J., Khan A., Ksiazek T., Peters C., Nichol S. Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in the Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Infect. Dis.* 1995; 179:170–6.
- Suzuki Y., Gojobori T. The origin and evolution of Ebola

and Marburg viruses. *Mol. Biol. Evol.* 1997; 14:800–6.

22. Volchov V.E., Chepurnov A.A., Volchova V.A., Ternovoj V.A., Klenk H.D. Molecular characterization guinea pig-adapted variants of Ebola virus. *Virology*. 2000; 277:147–55.

23. Volchov V.E., Feldmann H., Volchkova V.A., Klenk H.D. Processing of Ebola virus glycoprotein by polyprotein convertase furin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1998; 95:5762–67.

24. Yang Z.Y., Duckers H.J., Sullivan N.J., Sanchez A., Nabel E.G., Nabel G.J. Identification of the Ebola virus glycoprotein as main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nat. Med.* 2000; 6:886–9.

References

1. Albarino C.G., Shoemaker T., Khristova M.L., Wamala J.F., Muyembe J.J., Balinandi S. Genomic analysis of filoviruses associated with four viral hemorrhagic fever outbreaks in Uganda and the Democratic Republic of the Congo in 2012. *Virology*. 2013; 442:97–100.

2. Bao Y., Chetvermin V., Tatusova T. Pairwise sequence comparison (PASC) and its application in the classification of filoviruses. *Viruses*. 2012; 4:1318–27.

3. Basler C., Mikulasova A., Masrtinez-Sobrido L., Paragas J., Muhlberger E., Bray M., Klenk H.D., Pales P., Garcia-Sastre A. The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* 2003; 77:7945–56.

4. Basler C., Wang X., Muhlberger E., Volchov V., Paragas J., Klenk H., Garcia-Sastre A., Palese P. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97:12289–94.

5. Biek R., Walsh P.D., Leroy E.M., Real L.A., Recent common ancestry of Ebola Zaire virus found in a bat reservoir. *PLoS Pathog.* 2006; 2:90.

6. Carroll S.A., Townner J.S., Sealy T.K., McMullan L.K., Khristova M.L., Burt F.J., Swanepoel R., Rollin P.E., Nichol S.T. Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole-genome sequences. *J. Virol.* 2013; 87:2608–16.

7. Ebihara H., Takada A., Kobassa D., Jones S., Neumann G., Theriault S., Bray M., Feldmann H., Kawaoka Y. Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice. *PLoS Pathog.* 2006; 2(7):73.

8. Feldmann H., Geisbert T.W. Ebola hemorrhagic fever. *Lancet*. 2011; 377:849–62.

9. Grard G., Biek R., Tamfum J.J., Fair J., Wolfe N., Formenty P., Paweska J., Leroy E. Emergence of divergent Zaire Ebola virus strains in Democratic Republic of the Congo in 2007 and 2008. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(3):776–84.

10. Grolla A., Lucht A., Dick D., Strong J.E., Feldman H. Laboratory diagnosis of Ebola and Marburg hemorrhagic fever. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2005; 98:205–9.

11. Gure S.K., Goba A., Andersen K.G., Sealfon R.S.G., Parc D.J., Kanneh L., Jalloh S., Momoh M., Fullah M., Dudas G., Wohl S., Moses L.M., Yozwiak N.L., Winnicki S., Matranga C.B., Malboeuf C.M., Qu J., Gladden A.D., Schaffner S.F., Yang X., Jiang P.P., Nekoui M., Colubri A., Coomber M.R., Fonnies M., Moigboi A., Gbokie M., Kamara F.K., Tucker V., Yillah M., Kanneh F., Robert F., Massally J.L., Chapman S.B., Bochicchio J., Murphy C., Nusbaum C., Young S., Birren B.W., Grant D.S., Scheiffelin L.S., Lander E.S., Happt C., Gevaio S.M., Gnirke A., Rambaut A., Garry R.F., Khan S.H., Sabeti P.C. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*. 2014; 345:1369–72.

12. Lauber C., Gorbalenya A.E. Genetics-Based Classification of Filoviruses Calls for Expanded Sampling of Genomic Sequences. *Viruses*. 2012; 4:1425–37.

13. Leroy E.M., Baize S., Mavoungou E., Apetrei C. Sequence analysis of the GP, NP, VP40 and VP24 genes of Ebola virus isolated from deceases, surviving and asymptotically infected individuals during the 1996 outbreak in Gabon: comparative studies and phylogenetic characterization. *J. Gen. Virol.* 2002; 83:56–73.

14. Leroy E.M., Baize S., Volchov V.E., Fisher-Hoch S. P., Georges-Courbot M. C., Lansoud-Soukate J., Capron M., Debre P., McCormick J. B., Georges A. J. Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *Lancet*. 2000; 355:2210–15.

15. Mateo M., Carbonelle C., Reynard O., Kolesnikova L., Nemirov K., Page A., Volchkova V.A., Volchov V.E. VP24 is a molecular determinant of Ebola virus virulence in guinea pigs. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(3):1011–20.

16. Mingo R.M., Simmons J.A., Shoemaker C.J., Nelson E.A., Schornberg K.L., D'Souza R., Casanova J.E., White J.M. Ebola virus and severe acute respiratory syndrome Coronavirus display late cell entry kinetics: evidence that transport to NPC1⁺ endolysosomes is a rate-defining step. *J. Virol.* 2015; 89(5):2931–43.

17. Pourrut X., Kumulungui B., Wittmann T., Moussavou G., Delicat A., Yaba P., Nkoghe D., Gonzalez J.P., Leroy E.M. The natural history of Ebola virus in Africa. *Microbes Infect.* 2005; 7(7–8):1005–14.

18. Prins K.S., Delpue S., Leung D.W., Reunard O., Volebkova V.A., Reid S.P., Ramanan P., Cardenas W.B., Amarasinghe G.K., Volchov V.E., Basler C.F. Mutations abrogating VP 35 interaction with double stranded RNA render Ebola virus avirulent in guinea pigs. *J. Virol.* 2010; 84:3004–15.

19. Reid S.P., Leung D.W., Hartman A.L., Martinez O., Shaw M.L., Carbonelle C., Volchov V.E., Nichol S.T., Basler C.F. Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha 1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J. Virol.* 2006; 80:5156–67.

20. Rodriguez L., De Roo A., Guimard Y., Trappier S., Sanchez A., Bressler D., Williams A., Rowe A., Bertoli J., Khan A., Ksiazek T., Peters C., Nichol S. Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in the Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Infect. Dis.* 1995; 179:170–6.

21. Suzuki Y., Gojibori T. The origin and evolution of Ebola and Marburg viruses. *Mol. Biol. Evol.* 1997; 14:800–6.

22. Volchov V.E., Chepurnov A.A., Volchova V.A., Ternovoj V.A., Klenk H.D. Molecular characterization guinea pig-adapted variants of Ebola virus. *Virology*. 2000; 277:147–55.

23. Volchov V.E., Feldmann H., Volchkova V.A., Klenk H.D. Processing of Ebola virus glycoprotein by polyprotein convertase furin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1998; 95:5762–67.

24. Yang Z.Y., Duckers H.J., Sullivan N.J., Sanchez A., Nabel E.G., Nabel G.J. Identification of the Ebola virus glycoprotein as main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nat. Med.* 2000; 6:886–9.

Authors:

Petrov A.A., Lebedev V.N., Stovba L.F., Sizikova T.E., Plekhanova T.M., Sidorova O.N., Pyshnaya N.S., Paveliev D.I., Borisevich S.V. 48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation.

Об авторах:

Петров А.А., Лебедев В.Н., Стомба Л.Ф., Сизикова Т.Е., Плеханова Т.М., Сидорова О.Н., Пышная Н.С., Павельев Д.И., Борисевич С.В. «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны. Российская Федерация, Сергиев Посад.

Поступила 02.07.15.