

Е.И.Казачинская^{1,3}, Ю.В.Никонорова¹, В.Б.Локтев^{1,2,3}

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА И РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ ИММУНОДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ЭБОЛА

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Российская Федерация; ²ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Российская Федерация; ³Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Российская Федерация

В обзоре обобщены литературные данные по исследованию вирусных антигенов и антител, специфичных к вирусу Эбола, пригодных для разработки тест-систем для иммунодиагностики вызываемого им заболевания. Представлены результаты работ авторов по получению гибридомных моноклональных антител (МКА), специфичных к структурным вирусным белкам NP, VP40 и VP35, рекомбинантных белков NP, VP40 и VP35 в прокариотической системе *E. coli*, а также возможность использования панелей МКА для выявления вирусных и рекомбинантных белков ВЭ в иммуноферментном анализе.

Ключевые слова: вирус Эбола, рекомбинантные белки, моноклональные антитела, иммунодиагностика.

E.I.Kazachinskaya^{1,3}, Yu.V.Nikonorova¹, V.B.Loktev^{1,2,3}

Monoclonal Antibodies and Recombinant Proteins for Immune-Diagnostics of Ebola Virus Disease

¹State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation; ²Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics of the RAS Siberian Branch, Novosibirsk, Russian Federation; ³Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

The review summarizes the literature data on the studies of viral antigens and antibodies, specific to Ebola virus, suitable for the development of a test-system for immune-diagnostics of the disease caused by them. Represented are the results of investigations on the obtainment of hybridoma monoclonal antibodies (MCA), specific to structural viral proteins NP, VP40, and VP35; recombinant proteins NP, VP40, and VP35 in prokaryotic system of *E. coli*; as well as the possibility to utilize MCA panels for EV viral and recombinant proteins' detection in ELISA.

Key words: Ebola virus, recombinant proteins, monoclonal antibodies, immune-diagnostics.

В декабре 2013 г. в Африке (Либерия, Гвинея, Сьерра-Леоне, Нигерия) началась очередная вспышка болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ). ВОЗ 8 августа 2014 г. объявила вспышку БВВЭ важнейшей угрозой для общественного здравоохранения мира. На 24 июня 2015 г. зарегистрировано 27479 случаев болезни, из которых 11217 закончились летально. Изучение молекулярной эпидемиологии этой вспышки БВВЭ показало, что ее возникновение было связано с передачей вируса Эбола (ВЭ) от летучей мыши двухлетнему мальчику, и далее ВЭ распространялся от человека к человеку [14, 16]. Быстрая и точная индикация ВЭ стала принципиально важным условием для успешной борьбы с этой опасной вирусной болезнью.

Номенклатура, классификация, инфекционный агент. Вирус Эбола (род *Ebolavirus*) относится к семейству *Filoviridae*, как и род *Marburgvirus* (МВ). К роду *Ebolavirus* относятся четыре вида вирусов: *Zaire ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Reston ebolavirus*, *Ivory Coast ebolavirus* и недавно описанный *Bundibugyo ebolavirus*. За время, прошедшее с обнаружения ВЭ в 1976 г., было зафиксировано несколько вспышек болезни с высоким уровнем летальности. Вспышки возникали, в основном, в таких африканских странах как Заир, Судан, Конго, Уганда, Гвинея, Сьерра-Леоне, Либерия, Нигерия. Также зафиксировано не-

сколько завозных случаев болезни и лабораторного заражения ВЭ. БВВЭ характеризуется тяжелым течением болезни и высоким уровнем летальности, которая может достигать 90 %. Эпидемиологическая опасность филовирусов связана с их способностью распространяться через прямой контакт с биологическими жидкостями и воздушно-капельным путем. Специфические иммуно- и генодиагностические препараты на момент возникновения вспышки фактически отсутствовали или существовали в виде экспериментальных лабораторных прописей. Это делало диагностику БВВЭ фактически недоступной для широкого использования органами общественного здравоохранения.

Организация генома, структура и функции белков. Вирионы филовирусов имеют сложную структуру: вирусная частица покрыта наружной липидной оболочкой, в которой локализуется 2 структурных белка (VP24 и гликопротеин (GP)), а нуклеокапсид сформирован белками NP, VP30, VP40, VP35 и L (РНК-зависимая РНК-полимераза). Геном филовирусов представлен несегментированной негативной одноцепочечной РНК, которая составляет 1,1 % от массы вириона. Геном ВЭ состоит из 18959 нуклеотидов и содержит 7 расположенных по порядку генов: 3'leader-NP-VP35-VP40-GP-P30-VP24-L-5'-trailer, кодирующих соответствующие белки – NP, VP35, VP40,

GP, VP30, VP24, L [11]. Ген GP ВЭ кодирует 3 белка с различными функциями: GP₁ (33–501 а.о.) ответствен за рецепторное связывание и является мишенью для специфических антител; GP₂ (502–676 а.о.) содержит мембранносливающий и иммуносупрессивный домены; секреторный гликопротеин sGP (1–295 а.о.), идентичный GP на 90 % [38]. Гликопротеин формирует шипики на поверхности вириона, которые опосредуют проникновение вируса в чувствительные клетки путем рецепторного связывания и слияния с мембраной клеток [45]. Длина белковой цепи GP ВЭ составляет 676 а.о., молекулярная масса около 150 кДа. В составе белка GP выявлено наличие иммуногенных эпитопов, связывающих нейтрализующие антитела [42, 43]. Процентное содержание белка GP ВЭ в вирионе невысокое – 4,7 %, но различия в структуре и антигенности GP позволяют выделять субтипы филовирусов, и он является одним из основных вирусных белков, на котором сконцентрированы современные исследования по получению вакцины против БВВЭ [13], sGP исследовали на возможность его использования для разработки вакцинного препарата [15]. В крови пациентов с БВВЭ и экспериментально зараженных животных обнаружено большое количество белков GP и sGP [17]. Нуклеопротеин (NP) филовирусов является одним из мажорных структурных белков, его содержание в вирионе составляет 17 %. Длина белка 739 а.о., рассчитанная молекулярная масса 83 кДа, однако фосфорилирование и O-гликозилирование, необходимое для формирования нуклеокапсидного комплекса, увеличивают его электрофоретическую подвижность до 115 кДа. При исследовании вклада филовирусных белков в формирование вирусоподобных частиц (VLPs) показано, что NP ВЭ самостоятельно, без помощи VP40, не выходит из клеток, поэтому предположили формирование комплекса этих белков. Комбинация VP40 с GP или NP в 5 раз увеличивала выход VLPs. Обнаружено лучшее сочетание для экспрессии: VP40+GP+NP [25]. Во взаимодействии предположительно участвуют 2–150 и 601–739 а.о., что показано при использовании делеционных вариантов рекомбинантного белка NP ВЭ. Район 1–450 а.о. нуклеопротеина важен для образования белковых агрегатов из молекулы NP [34]. NP принципиально важен для диагностики вследствие его высокого содержания в вирионе и выраженной антигенности [20]. Матриксный белок VP40 филовирусов является мажорной молекулой, что соответствует значительному содержанию его в вирионе – 37,7 %. Длина белка составляет 326 а.о., молекулярная масса – 40 кДа, имеет гидрофобный аминокислотный профиль [11]. По аналогии с матриксными белками других вирусов, филовирусный VP40 содействует формированию вириона в плазматической мембране, являясь посредником между нуклеокапсидными белками (NP и VP30) и оболочечными (GP и VP24). VP40 играет ключевую роль в процессе сборки вирионов [8]. Он самостоятельно формирует VLPs и выходит из клеток, но совместная экспрессия с другими белками повышает количе-

ственный уровень выхода вирусоподобных частиц из трансфицированных клеток [25].

Белок VP35 филовирусов является одним из трех мажорных компонентов, составляя 24,5 % от массы вириона. Длина белка 340–351 а.о., молекулярная масса 35 кДа. Являясь ко-фактором полимеразы, белок VP35 играет важную роль в процессе транскрипции, репликации и инкапсидации ВЭ [11]. Предполагается, что белок VP35 может быть важен для проявления вирулентности филовирусов, блокируя синтез интерферона в зараженных клетках [12]. Мутации в гене VP35 приводят к потере вирулентности ВЭ, что показано на модели морских свинок [37]. Многофункциональность VP35 (ко-фактор полимеразы, ингибитор интерферона, наличие домена на С-конце для связывания РНК) указывает на его значимость в качестве мишени для терапевтических средств [10] и вакцинный потенциал [47]. Минорный нуклеопротеин VP30 локализован в рибонуклеокапсидном комплексе, выполняет функцию инкапсидации совместно с NP [12]. Процентное содержание белка в вирионе – 6,6. Незначительные изменения в структуре белка VP30 (в кластере для взаимодействия с нуклеопротеином) снижают вирулентность ВЭ [19]. L-белок (РНК-зависимая РНК полимеразы) – компонент рибонуклеинового комплекса [30] – самый большой белок (180–205 кДа) филовирусов, но присутствующий в наименьшем количестве (2 % от массы вириона). Функция мембранно-ассоциированного белка VP24 пока неясна, но единичные аминокислотные замены влияют на изменение патогенных свойств дикого типа ВЭ.

Маркеры и методы для лабораторной диагностики БВВЭ. Список болезней, которые могут вызывать симптомы, подобные филовирусным лихорадкам, довольно велик [32]. Это малярия, тифозная лихорадка, шигеллез, менингококковый сепсис, чума, лептоспироз, сибирская язва, возвратный тиф, риккетсиозы, желтая лихорадка, лихорадка Чикунгунья, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, Крымская лихорадка Конго, лихорадка Ласса и фульминантные вирусные гепатиты. В связи с этим для подтверждения диагноза необходимы данные лабораторных исследований. Получение данных вирусологических и иммунологических исследований исключительно важно еще и потому, что при геморрагических лихорадках в качестве средства специфической терапии (а иногда и ранней серопротекции) могут быть применены препараты иммунной плазмы или сыворотки, содержащие специфические антитела. Классическим методом детекции ВЭ является его выявление в чувствительной культуре клеток Vero с последующей идентификацией вируса методом иммунофлуоресценции, а также для первичной изоляции могут быть использованы мыши сосунки [9]. Недостатком этих методов является длительность проведения исследования – 5–7 сут, что ограничивает их значение как быстрого и эффективного диагностического инструмента.

Сыворотки крови пациентов, заболевших лихорадкой Эбола в Киквике в 1995 г., исследованы на наличие антигена и специфических IgG и IgM в ИФА. Вирусный антиген обнаружен фактически у всех пациентов в течение острого периода, в то время как антитела иногда обнаруживались даже перед смертью. В сыворотках выживших IgG и IgM появлялись приблизительно в одно время от начала болезни (8–10-е сутки), но IgM сохранялись более короткое время. IgG обнаруживали в сыворотках переболевших и через два года хранения. Авторы делают вывод, что обнаружение вирусной РНК методом ПЦР и вирусного антигена служит надежным средством для постановки диагноза у пациентов с подозрением на БВВЭ [24]. Поэтому в настоящее время метод ПЦР успешно развивается и используется для выявления генетического материала филовирюсов. При ПЦР-индикации ВЭ чаще используют специфические праймеры для фрагмента гена NP [21].

ИФА является важным инструментом при изучении различных аспектов инфекционного процесса: для обнаружения возбудителя в различных органах и физиологических жидкостях, времени его появления и концентрации, динамики появления и накопления специфических антител. При определении специфических антител к ВЭ установлено, что они могут быть выявлены в реакции связывания комплемента (РСК) на 12-е сутки болезни. В ИФА специфические антитела в низких титрах выявляются уже на 8–9-е сутки, что позволяет подтвердить диагноз и наблюдать динамику накопления специфических антител [6].

Высокая концентрация антигенов ВЭ в крови больных позволяет эффективно выявлять вирусные антигены в ИФА [6, 44]. Поликлональные или моноклональные антитела являются основой для разработки методов иммунологической детекции ВЭ. Для скрининга специфичных антивирусных антител могут быть использованы рекомбинантные белки NP, VP40, VP35 и VP30 в связи с тем, что антитела к этим белкам появляются в крови переболевших обезьян и людей. Первая тест-система иммуноферментная для выявления ВЭ в тканях инфицированных приматов описана в 1992 г. Пул из восьми видов МКА, специфичных к ВЭ-Заир и ВЭ-Судан, использовали для «захвата» антигена. Порог ее чувствительности составил 10^2 – 10^3 БОЕ/мл. [24]. Эту же тест-систему авторы использовали в исследованиях образцов сывороток крови, собранных от пациентов при вспышках БВВЭ и кори в 2004 г. в Судане [35]. Для обнаружения очищенного и концентрированного антигена ВЭ-Заир разработали экспериментальную ИФА-тест-систему с использованием поликлональных специфических антител кролика [6]. Ее применение дало возможность установить специфический диагноз на 5–6-е сутки после инфицирования, фактически в конце инкубационного периода и до развития основных клинических симптомов болезни. МКА, полученные к рекомбинантному NP ВЭ-Заир, узнающие антигенный сайт, использовали в ИФА

для обнаружения различных штаммов ВЭ в материалах от лабораторно инфицированных обезьян. Чувствительность анализа составила 30 нг/100 мкл рекомбинантного NP-Заир [33]. Тест-система успешно апробирована для выявления ВЭ-Рестон в архивных замороженных образцах печени, селезенки и сыворотках крови, собранных во время вспышки БВВЭ среди обезьян на Филиппинах в 1996 г. [22]. ИФА с использованием двух видов МКА, специфичных к белку VP40 ВЭ, обеспечила выявление вирусного антигена в концентрации 1–2 нг/мл по очищенному антигену или по инфекционному титру 10^2 БОЕ/мл. Эти же МКА были успешно использовали при полевом испытании метода иммунофильтрации для выявления ВЭ в образцах сывороток крови, мочи, слюны и пота, собранных во время вспышки БВВЭ в 2003 г. в Республике Конго [27, 28]. Совместное использование МКА и поликлональных антител к белку VP40 также обеспечивало высокую чувствительность выявления вирусного антигена, в том числе в плазме крови лабораторно инфицированных обезьян [23].

Рекомбинантные белки вируса Эбола. Рекомбинантные NP вируса Эбола, экспрессированные в виде полноразмерных копий в бакуловирусной системе и в виде С-концевых фрагментов в *E. coli*, обладали антигенностью и были использованы в ИФА для обнаружения IgG в сыворотках переболевших людей. Специфичность определения IgG была 100 %, без ложноположительных результатов. Кроме того обнаружено, что рекомбинантный NP ВЭ, полученный на основе гена NP ВЭ-Заир, можно использовать для выявления IgG к другим штаммам вируса Эбола: Судан, Рестон и Берег Слоновой Кости [39]. Эти же белки использовали в качестве положительного контроля при разработке ИФА для выявления антигена на основе МКА [33]. В качестве антигена при разработке лабораторной ИФА-тест-системы для выявления специфических антител использовали рекомбинантный NP белок [36]. Получение рекомбинантного белка VP40 ВЭ для целей иммунодиагностики также описано [23, 25, 26]. Рекомбинантный белок VP35 ВЭ-Заир получен в бакуловирусной системе экспрессии гена VP35 [18] и успешно использован для тестирования сывороток крови обезьян и человека. Его использование обеспечило 100 % чувствительность и специфичность. Для исследования вирулентности ВЭ получен рекомбинантный белок VP35 при трансфекции клеток 293Т плазмидами с мутациями в гене VP35 [37]. Способ получения рекомбинантного белка VP35 ВЭ в клетках *E. coli* описан в работе L.Zinzula *et al.* [50].

Рекомбинантный GP может быть также использован в составе ИФА тест-системы для определения титров специфических антител в сыворотках реконвалесцентов [27, 36]. Описан эпитоп-блокирующий лабораторный тест ИФА для выявления антител в сыворотках крови людей, обезьян и мышей на основе МКА и рекомбинантного белка GP, полученного при

трансфекции клеток 293Т плазмидами, кодирующими ген GP [31]. Также известен способ получения рекомбинантной плазмидной ДНК, обеспечивающей экспрессию гена GP ВЭ и получение рекомбинантного белка GP в клетках *E. coli* [36]. Рекомбинантный sGP, полученный с использованием вируса осповакцины со встройкой соответствующего гена [46] и при трансфекции клеток 293Т плазмидой, кодирующей GP-ВЭ-Заир, узнавался МКА в иммуноблоттинге [48].

Коллекции МКА, специфичных к вирусу Эбола.

Высокая специфичность МКА и их доступность, в отличие от поликлональных антител, является большим преимуществом для развития иммунодиагностики. Метод ИФА на основе МКА для раннего выявления антигенов ВЭ и подтверждения результатов ПЦР просто необходим [26]. В 1999 г. по технологии фагового дисплея была получена панель рекомбинантных человеческих МКА, специфичных к белкам sGP и GP ВЭ (субтип Заир), эффективно нейтрализующих вирус в культуре клеток и полностью защищающих морских свинок от заражения [29]. Следующее сообщение было о получении мышинных МКА, специфичных к пяти уникальным эпитопам рекомбинантного GP ВЭ (Заир), способных обеспечивать защиту мышей при введении через 2 дня после заражения [47]. МКА, полученные в результате иммунизации животных плазмидами, кодирующими рекомбинантный GP ВЭ-Заир, были двух типов: нейтрализующие вирус и усугубляющие течение инфекции у инфицированных животных, что ставит серьезные вопросы об использовании МКА к GP в профилактике и терапии, а также возможности получения вакцины против БВВЭ [41]. МКА, полученные к рекомбинантному NP ВЭ-Заир, узнавали антигенный сайт, состоящий из 26 аминокислотных С-концевых остатков. Эти МКА использовали для обнаружения антигенов разных штаммов ВЭ-Заир, Рестон и Судан в ИФА [33]. Известны МКА к белку GP ВЭ, используемые в составе ИФА-тест-системы при индикации и идентификации ВЭ, обеспечивающие аналитическую чувствительность тест-системы на их основе приблизительно $1,0 \cdot 10^3$ БОЕ/мл. Интересное исследование посвящено характеристике и использованию МКА, специфичных к матричному белку VP40 ВЭ-Заир (штамм Mayinga), инактивированного 1,5 % тритоном X100. Из 9 МКА, взаимодействующих с белком VP40 в иммуноблоттинге, четыре взаимодействовали и с рекомбинантным белком, полученным при инфицировании клеток HeLa рекомбинантным вирусом вакцины MVA-T7 с плазмидами, содержащими ген VP40. Два вида МКА использовали для формирования ИФА-тест-системы в формате «сэндвич» [26]. Другая работа этих же авторов посвящена получению и использованию МКА, специфичных GP, для разработки ИФА-тест-системы в формате «сэндвич» для выявления антигена ВЭ-Заир [27]. Для изучения отличий наружного вирусного белка разных штаммов ВЭ и использования их в качестве диагностических реагентов получены МКА к пепти-

дам GP [49]. Описано получение МКА при иммунизации мышей вирусоподобными частицами, несущими фрагменты вирусных белков. 17 видов МКА были специфичны: два – к разным эпитопам белка VP40, три – к секреторному гликопротеину (sGP) и двенадцать – к GP₁. Авторы предлагают использовать МКА, специфичные к VP40, в качестве потенциальных кандидатов для быстрой диагностики, а МКА, специфичные к разным эпитопам GP, могут найти применение для терапии БВВЭ [40]. При иммунизации мышей рекомбинантным GP получены восемь видов нейтрализующих МКА, один вид специфичен к эпитопу 1–295 а.о. sGP [38].

В ГНЦ ВБ «Вектор» получены гибридные клеточные линии, продуцирующие МКА, специфичные к белку VP35. 2 клеточных линии: к VP40 – 20 гибридом и к NP – 15 гибридом [3, 4, 5]. Для их получения мыши и крысы – доноры селезеночных лимфоцитов – были иммунизированы вирулентным штаммом ВЭ-Заир (ВЭ-IS) или адаптированным к морским свинкам штаммом 8МС ВЭ-Заир. Панель очищенных МКА была исследована в ИФА в формате «сэндвич» на способность «захватывать» вирусные и рекомбинантные антигены из раствора и формировать иммунные комплексы на полистироловой поверхности микропланшетов, а МКА, конъюгированные с биотином, на способность выявлять образовавшийся иммунный комплекс. Всего исследовано 19 наиболее высокотитражных МКА, специфичных к белкам ВЭ: два – к VP35, семь – к VP40, десять – к нуклеопротеину. Из них сформировано 399 различных сочетаний пар МКА. Инактивированный антиген ВЭ удовлетворительно выявляли 115 пар МКА (ОП в диапазоне от 1,0 до 3,5), 29 из них выявляли рекомбинантные белки: 16 – выявляли рек. VP40 и 13 – рек. NP. Интересен был факт выявления инактивированного ВЭ парами МКА, специфичными к разным вирусным белкам. Эти данные предполагают высокую стабильность комплексов белков в вирусном препарате после его очистки и инактивации. Использование очищенных антигенов и рекомбинантных белков позволяет более точно определять чувствительность выявления индивидуальных антигенов. Чувствительность выявления рекомбинантных антигенов разными парами МКА колебалась от 1 до 150 нг/мл. Наиболее высокую чувствительность обеспечивали МКА 1B2+7B11* (конъюгат с биотином), специфичные к нуклеопротеину ВЭ, и МКА 4A2+1C1* (конъюгат с биотином), специфичные к белку VP40. Эти виды МКА позволяли эффективно выявлять антигены в концентрации 1–2 нг/мл [5].

Рекомбинантные белки ВЭ в ГНЦ ВБ «Вектор». Для получения рекомбинантных аналогов вирусных белков нами изолирована вирусная РНК из инактивированного очищенного препарата ВЭ, штамм Mayinga. Полноразмерный ген белка VP35 ВЭ был получен полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с вирусспецифической кДНК с использованием специфических праймеров. Полученный ПЦР-

фрагмент клонировали в составе плазмиды pQE-31 (Qiagen). Рекombинантная плазмидная ДНК pQE-VP35 обеспечивает экспрессию гена VP35 ВЭ с 3128 по 4148 нуклеотид, который кодирует белок VP35 ВЭ длиной 340 а.о. с полигистидиновым (6xHis) трактом на N конце. Электрофоретическая подвижность в 15 % SDS-ПААГ синтезируемого рекомбинантного белка 35 кДа совпадала с литературными данными и нашими теоретическими расчетами (36,941 кДа) [3, 7]. Геномные фрагменты, кодирующие белки NP и VP40, получили методом ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров для этих генов. Гибридные плазмиды содержали открытые рамки трансляции, кодирующие белки длиной 751 аминокислотный остаток для NP и 338 аминокислотных остатков для VP40. Подлинность полученных плазмид проверяли рестриктным картированием и секвенированием. Для экспрессии рекомбинантных белков использовали штамм *E. coli* JM 103, трансформированный плазмидной ДНК pQE-VP40 и pQE-NP. Уровень синтеза рекомбинантных полипептидов оценивался до 70 мг на 1 л культуральной среды с выходом целевого белка 25 и 40 % от суммарного клеточного белка. Рекombинантные белки исследовали на антигенную специфичность и иммуногенность в ИФА и иммуноблоте (ИБ). Рекombинантные аналоги вирусных белков обладали иммуногенностью, вызывая синтез антител до титра 1:2000000 в организме иммунизированных аутбредных мышей линии ICR. Рекombинантные белки NP, VP40 и VP35 ВЭ эффективно взаимодействуют с антителами сыворотки крови мышей, иммунизированных инактивированным вирусом и, что наиболее важно, с антителами кроликов и лошадей, иммунизированных инфекционным вирусом [1]. В ИФА и иммуноблоттинге показано, что очищенные в денатурирующих условиях рекомбинантные белки NP, VP40 и VP35 ВЭ распознаются моноклональными антителами. Таким образом, иммунохимическое исследование рекомбинантных белков NP, VP40 и VP35 ВЭ показало, что они антигенно подобны структурным белкам ВЭ. Полученные рекомбинантные антигены и МКА могут быть использованы для конструирования иммунодиагностических тест-систем [2, 3]. В нашей лаборатории продолжают работы по пополнению клонотеки филовиральных генов, необходимых для получения профилактической вакцины против БВВЭ и коллекции МКА, возможно нейтрализующих вирус, которые смогут стать основой для получения терапевтических препаратов гуманизированных антител.

В настоящее время полученные панели МКА и рекомбинантные белки используются для разработки быстрого (время анализа 15–20 мин) и простого иммунохроматографического экспресс-метода для выявления антигенов ВЭ в полевых условиях без использования сложного оборудования.

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

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. *Вопр. вирусол.* 1996; 6:270–3.
2. Иванова А.В., Казачинская Е.И., Качко А.А., Субботина Е.Л., Сорокин А.В., Разумов И.А., Нетесов С.В., Локтев В.Б. Получение и иммунологическая характеристика рекомбинантных белков VP40 и NP филовирусов. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 106:32–3.
3. 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. *Вопр. вирусол.* 2001; 5:25–31.
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. *Вопр. вирусол.* 2000; 3:40–4.
5. Казачинская Е.И., Иванова А.В., Сорокин А.В., Качко А.А., Субботина Е.Л., Разумов И.А., Локтев В.Б. Моноклональные антитела и рекомбинантные белки филовирусов. Иммунохимические свойства и оценка возможности их использования для иммунодиагностики. *Мед. иммунол.* 2010; 3(12):177–90.
6. 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. *Вопр. вирусол.* 1995; 40(1):31–5.
7. Рудзевич Т.Н., Терновой В.А., Казачинская Е.И., Разумов И.А., Чепурнов А.А., Локтев В.Б., Нетесов С.В. Выявление антигенных детерминант на N – конце белка VP35 вируса Эбола с помощью коротких рекомбинантных фрагментов этого белка. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2003; 2:38–41.
8. Aman M., Bosio C.M., Panchal R.G., Burnett J.C., Schmaljohn A., Bavari S. Molecular mechanisms of filovirus cellular trafficking. *Microbes Infect.* 2003; 5(7):639–49.
9. Bente D., Gren J., Strong J.E., Feldmann H. Disease modeling for Ebola and Marburg viruses. *Dis. Model. Mech.* 2009; 2(1–2):12–7.
10. Binning J.M., Wang T., Luthra P., Shabman R.S., Borek D.M., Liu G., Xu W., Leung D.W., Basler C.F., Amarasinghe G.K. Development of RNA aptamers targeting Ebola virus VP35. *Biochemistry.* 2013; 52(47):8406–19.
11. Bukreyev A.A., Volchkov V.E., Blinov V.M., Netesov S.V. The VP35 and VP40 proteins of filoviruses. Homology between Marburg and Ebola viruses. *FEBS Lett.* 1993; 322(1):1–6.
12. Bukreyev A.A. Characteristics of Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses. *Naturwissenschaften.* 1999; 6:8–17.
13. Bukreyev A., Rollin P.E., Tate M.K., Yang L., Zaki S.R., Shieh W.J., Murphy B.R., Collins P.L., Sanchez A. Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus. *J. Virol.* 2007; 81(12):6379–88.
14. Carroll M.W., Matthews D.A., Hiscox J.A., Elmore M.J., Pollakis G., Rambaut A., Hewson R., Garcia-Dorival I., Bore J.A., Koundouno R., Abdellati S., Afrough B., Aiyepada J., Akhilmann P., Asogun D., Atkinson B., Badusche M., Bah A., Bate S., Baumann J., Becker D., Becker-Ziaja B., Bocquin A., Borremans B., Bosworth A., Boettcher J.P., Cannas A., Carletti F., Castilletti C., Clark S., Colavita F., Diederich S., Donatus A., Duraffour S., Echichoya D., Ellerbrok H., Fernandez-Garcia M.D., Fizet A., Fleischmann E., Gryseels S., Hermelink A., Hinzmann J., Hopf-Guevara U., Ighodalo Y., Jameson L., Kelterbaum A., Kis Z., Kloth S., Kohl C., Korva M., Kraus A., Kuisma E., Kurth A., Liedigk B., Logue C.H., Lütcke A., Maes P., McCowen J., Mély S., Mertens M., Meschi S., Meyer B., Michel J., Molkenthin P., Muñoz-Fontela C., Muth D., Newman E.N., Ngabo D., Oestereich L., Okosun J., Olokot T., Omiunu R., Omomoh E., Pallasch E., Pályi B., Portmann J., Pottage T., Pratt C., Priesnitz S., Quartu S., Rappe J., Repits J., Richter M., Rudolf M., Sachse A., Schmidt K.M., Schudt G., Strecker T., Thom R., Thomas S., Tobin E., Tolley H., Trautner J., Vermoesen T., Vitoriano I., Wagner M., Wolff S., Yue C., Capobianchi M.R., Kretschmer B., Hall Y., Kenny J.G., Rickett N.Y., Dudas G., Coltart C.E., Kerber B., Steer D., Wright C., Senyah F., Keita S., Drury P., Diallo B., de Clerck H., Van Herp M., Sprecher A., Traore A., Diakite M., Konde M.K., Koivogui L., Magassouba N., Avšič-Zupanc T., Nitsche A., Strasser M., Ippolito G., Becker S., Stoecker K., Gabriel M., Raoul H., Di Caro A., Wölfel R., Formenty P., Günther S. Temporal and spatial analysis of the 2014–2015 Ebola virus outbreak in West Africa. *Nature.* 2015 Jun 17; doi: 10.1038/nature14594.
15. de La Vega M.A., Wong G., Kobinger G.P., Qiu X. The multiple roles of sGP in Ebola pathogenesis. *Viral Immunol.* 2015; 28(1):3–9.
16. Dhama K., Malik Y.S., Malik S.V., Singh R.K. Ebola from emergence to epidemic: the virus and the disease, global preparedness and perspectives. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2015; 9(5):41–55.
17. Dolnik O., Volchkova V., Garten W., Carbonnelle C., Becker S., Kahnt J., Ströher U., Klenk H.D., Volchkov V. Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *EMBO J.* 2004; 23:2175–84.

18. Groen J., van den Hoogen B.G., Burghoorn-Maas C.P., Fooks A.R., Burton J., Clegg C.J., Zeller H., Osterhaus A.D. Serological reactivity of baculovirus-expressed Ebola virus VP35 and nucleoproteins. *Microbes Infect.* 2003; 5(5):379–85.
19. Hartlieb B., Muziol T., Weissenhorn W., Becker S. Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104(2):624–9.
20. Huang Y., Wei H., Wang Y., Shi Z., Raoul H., Yuan Z. Rapid detection of filoviruses by real-time TaqMan polymerase chain reaction assays. *Viol. Sin.* 2012; 27(5):273–7.
21. Huang Y., Zhu Y., Yang M., Zhang Z., Song D., Yuan Z. Nucleoprotein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) for detecting antibodies specific to Ebola virus and Marburg virus. *Viol. Sin.* 2014; 29(6):372–80.
22. Ikegami T., Niikura M., Saijo M., Miranda M.E., Calaor A.B., Hernandez M., Acosta L.P., Manalo D.L., Kurane I., Yoshikawa Y., Morikawa S. Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Reston Ebola virus nucleoprotein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):552–7.
23. Kalstrom G., Warfield K.L., Swenson D.L., Mort S., Panchal R.G., Ruthel G., Bavari S., Aman J. Analysis of Ebola virus and VLP release using an immunocapture assay. *J. Virol. Meth.* 2005; 127(1):1–9.
24. Ksiazek T.G., Rollin P.E., Jahrling P.B., Johnson E., Dalgard D.W., Peters C.J. Enzyme immunoassay for Ebola virus antigens in tissues of infected primates. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(4):947–50.
25. Licata J.M., Johnson R.F., Han Z., Hartly R.N. Contribution of ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. *J. Virol.* 2004; 78(14):7344–51.
26. Luch A., Grunov R., Moller P., Feldman H., Becker S. Development, characterization and use of monoclonal VP40-antibodies for the detection of Ebola virus. *J. Virol. Meth.* 2003; 111:21–8.
27. Luch A., Grunov R., Otterbein C., Moller P., Feldman H., Becker S. Production of monoclonal antibodies and development of an antigen capture ELISA directed against envelope glycoprotein GP of Ebola virus. *Med. Microbiol. Immunol.* 2004; 193:81–7.
28. Lucht A., Formenty P., Feldmann H., Gotz M., Leroy E., Bataboukila P., Grolla A., Feldmann F., Wittmann T., Campbell P., Atsangandoko C., Boumandoki P., Finke E.J., Miethe P., Becker S., Grunov R. Development of an immunofiltration-based antigen-detection assay for rapid diagnosis of Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(2):184–92.
29. Maruyama T., Rodriguez L.L., Jahrling P.B., Sanchez A., Khan A.S., Nichol S.T., Peters C.J., Parren P.W., Burton D.R. Ebola virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection. *J. Virol.* 1999; 73(7):6024–30.
30. Muhlberger E., Lotfering B., Klenk H.-D., Becker S. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J. Virol.* 1998; 72(11):8756–84.
31. Nakayama E., Yokoyama A., Miyamoto H., Igarashi M., Kishida N., Matsuno K., Marzi A., Feldmann H., Ito K., Saijo M., Takada A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of filovirus species-specific antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(11):1723–8.
32. Ndayimirije N., Kindhauser M.K. Marburg hemorrhagic fever in Angola-fighting fear and a lethal pathogen. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352(21):2155–7.
33. Niikura M., Ikegami T., Saijo M., Kurane I., Miranda M.E., Morikawa S. Detection of Ebola viral antigen by enzyme-linked immunosorbent assay using a novel monoclonal antibody to nucleoprotein. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9):3267–71.
34. Noda T., Watanabe S., Sagara H., Kawaoka Y. Mapping of the VP40-binding regions of the nucleoprotein of Ebola virus. *J. Virol.* 2007; 81(7):3554–62.
35. Onyango C.O., Opoka M.L., Ksiazek T.G., Formenty P., Ahmed A., Tukei P.M., Sang R.C., Ofula V.O., Konongo S.L., Coldren R.L., Grein T., Legros D., Bell M., De Cock K.M., Bellini W.J., Towner J.S., Nichol S.T., Rollin P.E. Laboratory diagnosis of Ebola hemorrhagic fever during an outbreak in Yambio, Suda, 2004. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(2):193–8.
36. Prehaud C., Hellebrand E., Coudrier D., Volchkov V.E., Volchkova V.A., Feldmann H., Le Guenno B., Bouloy M. Recombinant Ebola virus nucleoprotein and glycoprotein (Gabon 94 strain) provide new tools for the detection of human infections. *J. Gen. Virol.* 1998; 79(11):2565–72.
37. Prins K.C., Delpeut S., Leung D.W., Reynard O., Volchkova V.A., Reid S.P., Ramanan P., Cárdenas W.B., Amarasinghe G.K., Volchkov V.E., Basler C.F. Mutations abrogating VP35 interaction with double-stranded RNA render Ebola virus avirulent in guinea pigs. *J. Virol.* 2010; 84(6):3004–15.
38. Qiu X., Alimonti J.B., Melito P.L., Fernando L., Stroher U., Jones S.M. Characterization of Zaire ebolavirus glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Clin. Immunol.* 2011; 141(2):218–27.
39. Saijo M., Niikura M., Morikawa S., Ksiazek T.G., Meyer R.F., Peters C.J., Kurane I. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(1):1–7.
40. Shahhosseini S., Das D., Qiu X., Feldmann H., Jones S.M., Suresh M.R. Production and characterization of monoclonal antibodies against different epitopes of Ebola virus antigens. *J. Virol. Methods.* 2007; 143(1):29–37.
41. Takada A., Watanabe S., Okazaki K., Kida H., Kawaoka Y. Infectivity-Enhancing Antibodies to Ebola virus glycoprotein. *J. Virol.* 2001; 75(5):2324–30.
42. Takada A., Feldmann H., Stroher U., Bray M., Watanabe S., Ito H., McGregor M., Kawaoka Y. Identification of protective epitopes on ebola virus glycoprotein at the single amino acid level by using recombinant vesicular stomatitis viruses. *J. Virol.* 2003; 77(2):1069–74.
43. Takada A., Feldmann H., Stroher U., Bray M., Watanabe S., Ito H., McGregor M., Kawaoka Y. Identification of protective epitopes on ebola virus glycoprotein at the single amino acid level by using recombinant vesicular stomatitis viruses. *J. Virol.* 2003; 77(2):1069–74.
44. Towner J.S., Sealy T.K., Khristova M.L., Albariño C.G., Conlan S., Reeder S.A., Quan P.L., Lipkin W.I., Downing R., Tappero J.W., Okware S., Lutwama J., Bakamutumaho B., Kayiwa J., Comer J.A., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Nichol S.T. Newly Discovered Ebola Virus Associated with Hemorrhagic Fever Outbreak in Uganda. *PLoS Pathog.* 2008; 4(11):e1000212.
45. Volchkov V.E., Volchkova V.A., Slenczka W., Klenk H.D., Feldmann H. Release of viral glycoproteins during Ebola virus infection. *Virology.* 1998; 245(1):110–9.
46. Volchkova V.A., Klenk H.D., Volchkov V.E. Delta-peptide is the carboxy-terminal cleavage fragment of the nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus. *Virology.* 1999; 265(1):64–71.
47. Wilson J.A., Bray M., Bakken R., Hart M.K. Vaccine potential of Ebola virus VP24, VP30, VP35 and VP40 proteins. *Virology.* 2001; 286(2):384–90.
48. Wolf K., Beiförde N., Falzarano D., Feldmann H., Schnittler H.J. The Ebola virus soluble glycoprotein (sGP) does not affect lymphocyte apoptosis and adhesion to activated endothelium. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(3):947–52.
49. Yu J.S., Liao H.X., Gerdon A.E., Huffman B., Searce R.M., McAdams M., Alam S.M., Popernack P.M., Sullivan N.J., Wright D., Cliffl D.E., Nabel G.J., Haynes B.F. Detection of Ebola virus envelope using monoclonal and polyclonal antibodies in ELISA, surface plasmon resonance and a quartz crystal microbalance immunosensor. *J. Virol. Methods.* 2006; 137(2):219–28.
50. Zinzula L., Esposito F., Mühlberger E., Trunschke M., Conrad D., Piano D., Tramontano E. Purification and functional characterization of the full length recombinant Ebola virus VP35 protein expressed in *E. coli*. *Protein Expr. Purif.* 2009; 66(1):113–9.

References

- Borisevich V.N., Mikhailov V.V., Krasnyansky B.P., Gradoboev V.N., Lebedinskaya E.V., Potryvaeva N.V., Timan'kova G.D. [Development and investigation of properties of immunoglobulins against Ebola fever]. *Vopr. Virusol.* 1996; 6:270–3.
- Ivanova A.V., Kazachinskaya E.I., Kachko A.V., Subbotina E.L., Sorokin A.V., Razumov I.A., Neteosov S.V., Loktev V.B. [Obtaining and immunologic characterization of filoviruses recombinant proteins VP40 and NP]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 106:32–6.
- Kazachinskaya E.I., Ternovoy V.A., Rudzevich T.N., Neteosov S.V., Chepurnov A.A., Razumov I.A. [Studies of antigen structure of Ebola virus VP35 protein]. *Vopr. Virusol.* 2001; 5: 25–31.
- Kazachinskaya E.I., Pereboev A.V., Chepurnov A.A., Belanov E.F., Razumov I.A. [Monoclonal antibodies to Ebola virus: production, identification, and investigation of cross reactivity with Marburg virus]. *Vopr. Virusol.* 2000; 3:40–4.
- Kazachinskaya E.I., Ivanova A.V., Sorokin A.V., Kachko A.A., Subbotina E.L., Razumov I.A., Loktev V.B. [Monoclonal antibodies and recombinant proteins of filoviruses. Immunochemical properties and evaluation of possibility of their usage for immunodiagnoses]. *Med. Immunol.* 2010; 3(12):177–90.
- Merzlikin N.V., Chepurnov A.A., Istomina N.N., Ofitserov V.I., Vorob'eva M.S. [Development and application of immune-enzyme test-systems for diagnostics of Ebola fever]. *Vopr. Virusol.* 1995; 40(1):31–5.
- Rudzevich T.N., Ternovoy V.A., Kazachinskaya E.I., Razumov I.A., Chepurnov A.A., Loktev V.B., Neteosov S.V. [Detection of antigen determinants on the N-terminus of Ebola virus VP35 protein, using its short recombinant fragments]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2003; 2:38–41.
- Aman M., Bosio C.M., Panchal R.G., Burnett J.C., Schmaljohn A., Bavari S. Molecular mechanisms of filovirus cellular trafficking. *Microbes Infect.* 2003; 5(7):639–49.
- Bente D., Gren J., Strong J.E., Feldmann H. Disease modeling for Ebola and Marburg viruses. *Dis. Model. Mech.* 2009; 2(1–2):12–7.
- Binning J.M., Wang T., Luthra P., Shabman R.S., Borek D.M., Liu G., Xu W., Leung D.W., Basler C.F., Amarasinghe G.K. Development of RNA aptamers targeting Ebola virus VP35. *Biochemistry.* 2013; 52(47):8406–19.
- Bukreyev A.A., Volchkov V.E., Blinov V.M., Neteosov S.V. The VP35 and VP40 proteins of filoviruses. Homology between Marburg and Ebola viruses. *FEBS Lett.* 1993; 322(1):1–6.

12. Bukreyev A.A. Characteristics of Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses. *Naturwissenschaften*. 1999; 6:8–17.
13. Bukreyev A., Rollin P.E., Tate M.K., Yang L., Zaki S.R., Shieh W.J., Murphy B.R., Collins P.L., Sanchez A. Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus. *J. Virol.* 2007; 81(12):6379–88.
14. Carroll M.W., Matthews D.A., Hiscox J.A., Elmore M.J., Pollakis G., Rambaut A., Hewson R., Garcia-Dorival I., Bore J.A., Koundouno R., Abdellati S., Afrough B., Aiyepada J., Akhilomen P., Asogun D., Atkinson B., Badusche M., Bah A., Bate S., Baumann J., Becker D., Becker-Ziaja B., Bocquin A., Borremans B., Bosworth A., Boettcher J.P., Cannas A., Carletti F., Castilletti C., Clark S., Colavita F., Diederich S., Donatus A., Duraffour S., Ehichioya D., Ellerbrok H., Fernandez-Garcia M.D., Fizet A., Fleischmann E., Gryseels S., Hermelink A., Hinzmann J., Hopf-Guevara U., Ighodalo Y., Jameson L., Kelterbaum A., Kis Z., Kloth S., Kohl C., Korva M., Kraus A., Kuisma E., Kurth A., Liedigk B., Logue C.H., Lüdtke A., Maes P., McCowen J., Mély S., Mertens M., Meschi S., Meyer B., Michel J., Molkenthin P., Muñoz-Fontela C., Muth D., Newman E.N., Ngabo D., Oestereich L., Okosun J., Olorok T., Omiunu R., Omomoh E., Pallasch E., Pályi B., Portmann J., Pottage T., Pratt C., Priesnitz S., Quartu S., Rappe J., Repits J., Richter M., Rudolf M., Sachse A., Schmidt K.M., Schudt G., Strecker T., Thom R., Thomas S., Tobin E., Tolley H., Trautner J., Vermoesen T., Vitoriano I., Wagner M., Wolff S., Yue C., Capobianchi M.R., Kretschmer B., Hall Y., Kenny J.G., Rickett N.Y., Dudas G., Coltart C.E., Kerber R., Steer D., Wright C., Senyah F., Keita S., Drury P., Diallo B., de Clerck H., Van Herp M., Sprecher A., Traore A., Diakite M., Konde M.K., Koivogui L., Magassouba N., Avšič-Zupanc T., Nitsche A., Strasser M., Ippolito G., Becker S., Stoecker K., Gabriel M., Raoul H., Di Caro A., Wölfel R., Formenty P., Günther S. Temporal and spatial analysis of the 2014–2015 Ebola virus outbreak in West Africa. *Nature*. 2015 Jun 17; doi: 10.1038/nature14594.
15. de La Vega M.A., Wong G., Kobinger G.P., Qiu X. The multiple roles of sGP in Ebola pathogenesis. *Viral Immunol.* 2015; 28(1):3–9.
16. Dhama K., Malik Y.S., Malik S.V., Singh R.K. Ebola from emergence to epidemic: the virus and the disease, global preparedness and perspectives. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2015; 9(5):41–55.
17. Dolnik O., Volchkova V., Garten W., Carbonnelle C., Becker S., Kahnt J., Stroher U., Klenk H.D., Volchkov V. Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. *EMBO J.* 2004; 23:2175–84.
18. Groen J., van den Hoogen B.G., Burghoorn-Maas C.P., Fooks A.R., Burton J., Clegg C.J., Zeller H., Osterhaus A.D. Serological reactivity of baculovirus-expressed Ebola virus VP35 and nucleoproteins. *Microbes Infect.* 2003; 5(5):379–85.
19. Hartlieb B., Muziol T., Weissenhorn W., Becker S. Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104(2):624–9.
20. Huang Y., Wei H., Wang Y., Shi Z., Raoul H., Yuan Z. Rapid detection of filoviruses by real-time TaqMan polymerase chain reaction assays. *Viral Sin.* 2012; 27(5):273–7.
21. Huang Y., Zhu Y., Yang M., Zhang Z., Song D., Yuan Z. Nucleoprotein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) for detecting antibodies specific to Ebola virus and Marburg virus. *Viral Sin.* 2014; 29(6):372–80.
22. Ikegami T., Niikura M., Saijo M., Miranda M.E., Calara A.B., Hernandez M., Acosta L.P., Manalo D.L., Kurane I., Yoshikawa Y., Morikawa S. Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Reston Ebola virus nucleoprotein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):552–7.
23. Kalstrom G., Warfield K.L., Swenson D.L., Mort S., Panchal R.G., Ruthel G., Bavari S., Aman J. Analysis of Ebola virus and VLP release using an immunocapture assay. *J. Virol. Meth.* 2005; 127(1):1–9.
24. Ksiazek T.G., Rollin P.E., Jahrling P.B., Johnson E., Dalgard D.W., Peters C.J. Enzyme immunoassay for Ebola virus antigens in tissues of infected primates. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(4): 947–50.
25. Licata J.M., Johnson R.F., Han Z., Harty R.N. Contribution of ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. *J. Virol.* 2004; 78(14):7344–51.
26. Luch A., Grunov R., Moller P., Feldman H., Becker S. Development, characterization and use of monoclonal VP40-antibodies for the detection of Ebola virus. *J. Virol. Meth.* 2003; 111:21–8.
27. Luch A., Grunov R., Otterbein C., Moller P., Feldman H., Becker S. Production of monoclonal antibodies and development of an antigen capture ELISA directed against envelope glycoprotein GP of Ebola virus. *Med. Microbiol. Immunol.* 2004; 193:81–7.
28. Lucht A., Formenty P., Feldmann H., Gotz M., Leroy E., Bataboukila P., Grolla A., Feldmann F., Wittmann T., Campbell P., Atsangandoko C., Boumandoki P., Finke E.J., Miethe P., Becker S., Grunov R. Development of an immunofiltration-based antigen-detection assay for rapid diagnosis of Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(2):184–92.
29. Maruyama T., Rodriguez L.L., Jahrling P.B., Sanchez A., Khan A.S., Nichol S.T., Peters C.J., Parren P.W., Burton D.R. Ebola virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection. *J. Virol.* 1999; 73(7):6024–30.
30. Muhlberger E., Lotfering B., Klenk H.-D., Becker S. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J. Virol.* 1998; 72(11):8756–84.
31. Nakayama E., Yokoyama A., Miyamoto H., Igarashi M., Kishida N., Matsuno K., Marzi A., Feldmann H., Ito K., Saijo M., Takada A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of filovirus species-specific antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(11):1723–8.
32. Ndayimirije N., Kindhauser M.K. Marburg hemorrhagic fever in Angola—fighting fear and a lethal pathogen. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352(21):2155–7.
33. Niikura M., Ikegami T., Saijo M., Kurane I., Miranda M.E., Morikawa S. Detection of Ebola viral antigen by enzyme-linked immunosorbent assay using a novel monoclonal antibody to nucleoprotein. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9):3267–71.
34. Noda T., Watanabe S., Sagara H., Kawaoka Y. Mapping of the VP40-binding regions of the nucleoprotein of Ebola virus. *J. Virol.* 2007; 81(7):3554–62.
35. Onyango C.O., Opoka M.L., Ksiazek T.G., Formenty P., Ahmed A., Tukei P.M., Sang R.C., Ofula V.O., Konongoi S.L., Coldren R.L., Grein T., Legros D., Bell M., De Cock K.M., Bellini W.J., Towner J.S., Nichol S.T., Rollin P.E. Laboratory diagnosis of Ebola hemorrhagic fever during an outbreak in Yambio, Suda. 2004. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(2):193–8.
36. Prehaud C., Hellebrand E., Coudrier D., Volchkov V.E., Volchkova V.A., Feldmann H., Le Guenno B., Bouloy M. Recombinant Ebola virus nucleoprotein and glycoprotein (Gabon 94 strain) provide new tools for the detection of human infections. *J. Gen. Virol.* 1998; 79(11): 2565–72.
37. Prins K.C., Delpout S., Leung D.W., Reynard O., Volchkova V.A., Reid S.P., Ramanan P., Cardenas W.B., Amarasinghe G.K., Volchkov V.E., Basler C.F. Mutations abrogating VP35 interaction with double-stranded RNA render Ebola virus avirulent in guinea pigs. *J. Virol.* 2010; 84(6):3004–15.
38. Qiu X., Alimonti J.B., Melito P.L., Fernando L., Stroher U., Jones S.M. Characterization of Zaire ebolavirus glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Clin. Immunol.* 2011; 141(2):218–27.
39. Saijo M., Niikura M., Morikawa S., Ksiazek T.G., Meyer R.F., Peters C.J., Kurane I. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(1):1–7.
40. Shahhosseini S., Das D., Qiu X., Feldmann H., Jones S.M., Suresh M.R. Production and characterization of monoclonal antibodies against different epitopes of Ebola virus antigens. *J. Virol. Methods.* 2007; 143(1):29–37.
41. Takada A., Watanabe S., Okazaki K., Kida H., Kawaoka Y. Infectivity-Enhancing Antibodies to Ebola virus glycoprotein. *J. Virol.* 2001; 75(5):2324–30.
42. Takada A., Feldmann H., Stroehrer U., Bray M., Watanabe S., Ito H., McGregor M., Kawaoka Y. Identification of protective epitopes on ebola virus glycoprotein at the single amino acid level by using recombinant vesicular stomatitis viruses. *J. Virol.* 2003; 77(2):1069–74.
43. Takada A., Feldmann H., Stroehrer U., Bray M., Watanabe S., Ito H., McGregor M., Kawaoka Y. Identification of protective epitopes on ebola virus glycoprotein at the single amino acid level by using recombinant vesicular stomatitis viruses. *J. Virol.* 2003; 77(2):1069–74.
44. Towner J.S., Sealy T.K., Khristova M.L., Albariño C.G., Conlan S., Reeder S.A., Quan P.L., Lipkin W.I., Downing R., Tappero J.W., Okware S., Lutwama J., Bakamutumaho B., Kayiwa J., Comer J.A., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Nichol S.T. Newly Discovered Ebola Virus Associated with Hemorrhagic Fever Outbreak in Uganda. *PLoS Pathog.* 2008; 4(11):e1000212.
45. Volchkov V.E., Volchkova V.A., Slenczka W., Klenk H.D., Feldmann H. Release of viral glycoproteins during Ebola virus infection. *Virology.* 1998; 245(1):110–9.
46. Volchkova V.A., Klenk H.D., Volchkov V.E. Delta-peptide is the carboxy-terminal cleavage fragment of the nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus. *Virology.* 1999; 265(1):64–71.
47. Wilson J.A., Bray M., Bakken R., Hart M.K. Vaccine potential of Ebola virus VP24, VP30, VP35 and VP40 proteins. *Virology.* 2001; 286(2):384–90.
48. Wolf K., Beimforde N., Falzarano D., Feldmann H., Schnittler H.J. The Ebola virus soluble glycoprotein (sGP) does not affect lymphocyte apoptosis and adhesion to activated endothelium. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(3):947–52.
49. Yu J.S., Liao H.X., Gerdon A.E., Huffman B., Seearce R.M., McAdams M., Alam S.M., Popernack P.M., Sullivan N.J., Wright D., Cliffl D.E., Nabel G.J., Haynes B.F. Detection of Ebola virus envelope using monoclonal and polyclonal antibodies in ELISA, surface plasmon resonance and a quartz crystal microbalance immunosensor. *J. Virol. Methods.* 2006; 137(2):219–28.
50. Zinzula L., Esposito F., Muhlberger E., Trunschke M., Conrad D., Piano D., Tramontano E. Purification and functional characterization of the full length recombinant Ebola virus VP35 protein expressed in *E. coli*. *Protein Expr. Purif.* 2009; 66(1):113–9.

Authors:

Kazachinskaya E.I. State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. Novosibirsk State University; Novosibirsk, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru
Nikonorova Yu.V. State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru
Loktev V.B. State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics of the RAS Siberian Branch; Novosibirsk, Russian Federation. Novosibirsk State University; Novosibirsk, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Казачинская Е.И. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»; Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. Новосибирский государственный университет; Новосибирск, Российская Федерация. E-mail: vector@vector.nsc.ru
Никонорова Ю.В. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru
Локтев В.Б. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; Российская Федерация, Новосибирск. Новосибирский государственный университет; Российская Федерация, Новосибирск. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 01.07.15.