

Virus Ebola à l'interface homme – faune sauvage et réservoir animal des virus Ebola en République Démocratique du Congo

Placide Mbala-Kingebeni

▶ **To cite this version:**

Placide Mbala-Kingebeni. Virus Ebola à l'interface homme – faune sauvage et réservoir animal des virus Ebola en République Démocratique du Congo. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2019. Français. ⟨NNT : 2019MONTT035⟩. ⟨tel-02479442⟩

HAL Id: tel-02479442

https://theses.hal.science/tel-02479442v1

Submitted on 14 Feb 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biochimie et Biologie Moléculaire (Virologie)

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche : Recherches Translationnelles sur le VIH et les Maladies Infectieuses (IRD UMI 233 – INSERM U1175 – Université de Montpellier)

VIRUS EBOLA A L'INTERFACE HOMME – FAUNE SAUVAGE ET RESERVOIR ANIMAL DES VIRUS EBOLA EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO

Présentée par Placide MBALA-KINGEBENI

Le 01 octobre 2019

Sous la direction de Martine PEETERS et Steve AHUKA-MUNDEKE

Devant le jury composé de

Antoine GESSAIN, Professeur, Institut Pasteur de Paris, France	Président
Michel SEGONDY, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU de Montpellier, France	Membre
Xavier ANGLARET, Directeur de Recherche, Université de Bordeaux, France	Rapporteur
Steve AHUKA-MUNDEKE, Professeur, Université de Kinshasa, R.D. Congo	Co-Directeur de thèse
Martine PEETERS, Directeur de Recherche, IRD, Montpellier, France	Directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

RESUME

Chaque épidémie de la maladie à virus Ebola résulte très probablement d'événements zoonotiques indépendants. Plus de quatre décennies après la première identification du virus Ebola, son réservoir demeure encore inconnu. Nous avons montré dans ce travail que la prévalence du virus Ebola dans la faune sauvage était très faible avec une présence d'anticorps anti-virus Ebola (Zaïre et/ou Soudan) chez moins de 1% des chauves-souris testées de la RDC, Guinée et Cameroun ; et de 0% chez les primates non humains de la RDC, Cote d'Ivoire et Cameroun, en période inter-épidémique. Aucun anticorps n'a été détecté dans les échantillons prélevés en période épidémique en RDC. La recherche de l'ARN du virus Ebola, au cours de ces études, était négative. Néanmoins, nous avons confirmé et caractérisé chez l'homme, les nouveaux variants du virus Ebola responsables des récentes épidémies de 2018 en RDC. Le séquençage génomique précoce et continu a permis d'orienter les interventions en matière de santé publique.

Ainsi, malgré la présence d'anticorps du virus Ebola, le rôle des chauves-souris en tant qu'espèce réservoir reste flou, car la détection de l'ARN viral est encore rare. Les anticorps anti-virus Ebola sont très rares chez les primates non humains, ce qui confirme que les PNH ne sont pas des espèces réservoirs. Les efforts pour retrouver le réservoir de ce virus doivent continuer car c'est le seul moyen qui nous permettra de prévenir efficacement les prochaines épidémies.

MOTS-CLES : Virus Ebola, chauves-souris, primates non humains, homme, Afrique Centrale, Afrique de l'Ouest

TITLE: Ebola virus at the human-animal interface and animal reservoir of Ebola virus in the Democratic Republic of Congo

ABSTRACT

Every Ebola outbreak is most likely the result of independent zoonotic events. More than four decades after the first identification of the Ebola virus, its reservoir remains unknown. We have shown in this work that the prevalence of Ebola virus in wildlife was very low with antibodies against Ebola virus (Zaire and / or Sudan) detected in less than 1% of bats tested in the DRC, Guinea and Cameroon; and 0% in non-human primates from the DRC, Cote d'Ivoire and Cameroon, during inter-epidemic period. No antibodies were detected in samples collected during the epidemic period in the DRC, and the search for Ebola RNA in these studies was negative. Nevertheless, we have confirmed and characterized in humans, new variants of the Ebola virus which caused the recent outbreaks of 2018 in the DRC. Early and ongoing genomic sequencing has been used to guide public health interventions.

Thus, despite the presence of antibodies to the Ebola virus, the role of bats as a reservoir species remains unclear, as the detection of viral RNA is still rare. Ebola virus antibodies are very rare in non-human primates, confirming that PNH are not reservoir species. Efforts to recover the reservoir of this virus must continue because it is the only way that will allow us to effectively prevent future outbreaks.

KEY WORDS: Ebola virus, bats, non-human primates, human, Central Africa, West Africa.

DISCIPLINE : Biochimie et Biologique moléculaire (Virologie)

LABORATOIRE : Transitions épidémiologiques, recherches translationnelles appliquées au VIH et aux maladies infectieuses, UMI 233, IRD/Université de Montpellier I.

911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier, France

Remerciements

Au terme de cette formation doctorale, j'aimerai tout d'abord remercier le Bon Dieu qui m'a fait grâce durant tout mon parcours pour qu'enfin j'accomplisse ce travail.

J'aimerai exprimer aussi ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont permis d'accomplir ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier le Docteur Martine Peeters, ma directrice de thèse, et le Professeur Steve Ahuka-Mundeke, mon co-directeur de thèse, pour leur encadrement efficace et surtout leur disponibilité à toutes les étapes de réalisation de ce travail. Merci infiniment car j'ai beaucoup appris à coté de vous.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur Eric Delaporte qui m'a accueilli dans son unité et qui s'est investi en temps et en moyens pour que mon séjour et mon travail se fassent dans les bonnes conditions. Merci Professeur !

Je remercie le Professeur Jean-Jacques Muyembe-Tamfum, mon mentor, pour tout son soutien durant toutes ces années et son implication personnelle dans la réalisation de cette thèse.

Je suis très honoré par la présence dans ce jury du Professeur Antoine Gessain et de Dr Xavier Anglaret qui ont examiné ce travail et apporté leurs commentaires en tant que rapporteurs. Je remercie également le Professeur Michel Segondy, qui a suivi mon travail depuis mon premier comité de thèse et qui a accepté de joindre ce jury de thèse.

Je n'oublie pas toutes les personnes qui ont pris part à la réalisation de cette thèse : Sheila Makiala, Justus Nsio, Daniel Mukadi, Charles Kumakamba, Nella Bisento, Catherine Pratt, Gustavo Palacios, Mike Wiley, Nicholas Di Paola, … Et tous ceux dont les noms resteront inconnus.

Je remercie tous les membres du département de virologie de l'INRB, particulièrement ceux de l'unité de diagnostic des fièvres hémorragiques virales, qui ont participé à la réalisation de ce travail : Yogolelo Riziki, Elisabeth Pukuta, Marceline Akonga, Bibiche Nsunda, Amuri Aziza, Eddy Lusamaki.

Ma gratitude va aussi à tous les membres du laboratoire de TRANSVIHMI, ceux qui ont partagé avec moi ma joie et le stress du labo : Ahidjo, Nicole, Christelle, Laetitia, Guillaume, Thomas,

Julie, Coralie, pour leur gentillesse, soutien et contribution à différents niveaux de ce travail. Merci à toutes et à tous !

Je reste reconnaissant à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et le Projet EBOSURSY pour le soutien financier pendant toute la durée de ce travail.

Je pense également au Professeur Désiré Tshala, au Professeur Octavie Lunguya, au Professeur Dieudonné Mumba et au Professeur Justin Masumu, pour leurs conseils pendant ces années de thèse.

A ma grand-mère et à mes parents ! à mes frères et sœurs, merci du soutien et surtout de la compréhension pendant ces années de thèse. *Matondo mingi !*

A mon grand-père, parti si tôt au moment de la rédaction de ce travail, lui qui m'a toujours encouragé depuis mes débuts à la faculté de Médecine. Merci et repose en paix *Nguabi!*

Enfin, à Sandra, mon épouse, et à mes enfants : Michael, Believe, Yohan et Nathan-Ariel. Merci pour votre soutien et vos prières pendant ces années de thèse.

Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide Ribonucléique
BDBV	Bundibugyo virus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOMV	Bombali virus
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
chAd3-EBO-Z / cAd3-EBO	Chimp Adenovirus type 3 – Ebola virus
EBOV	Ebola virus
FDA	U. S. Food and Drug Administration
GP	Glycoprotéine
HUJV	Huangjao virus
INRB	Institut National de Recherche Biomédicale
LLOV	Lloviu virus
MARV	Marburg virus
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MLAV	Mengla virus
MVA-BN-Filo	Multivalent Bavarian Nordic Filovirus
NP	Nucléoprotéine
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
RAVV	Ravn virus
RDC	République Démocratique du Congo
RESTV	Reston virus
RPA	Recombinase polymerase amplification

RT-LAMP	Reverse Transcription-Loop mediated isothermal amplification
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
rVSV-ZEBOV	recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccine expressing EBOV glycoprotein
SUDV	Sudan virus
TAFV	Taï Forest virus
TRANSVIHMI	Recherches Translationnelles appliquées au VIH et aux Maladies Infectieuses
USAMRIID	US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases
UTR	Untranslated Transcribed Region
VP	Viral Protein

Table des matières

Remerciements *2*

Abréviations *4*

Table des matières *6*

Liste des figures *14*

Liste des tables *18*

Préambule *19*

Contribution *20*

Etat des Connaissances *22*

Chapitre 1. Virus Ebola *23*

1.1 Découverte des virus Ebola **23**

1.2 Taxonomie des virus Ebola **27**

1.3 Structure des virus Ebola **29**

1.4 Organisation du génome des virus Ebola **30**

1.5 Rôle et Expression des protéines virales **32**

1.6 Cycle de vie cellulaire des virus Ebola **33**

1.7 Pathogenèse des virus Ebola **35**

Chapitre 2. Maladie à virus Ebola *39*

2.1 Epidémiologie **39**

2.1.1 Epidémies de la maladie à virus Bundibugyo 40

2.1.2 Epidémies de la maladie à virus Sudan 41

2.1.3 Epidémies de la maladie à virus Ebola 42

2.2 Transmission de la maladie à virus Ebola **43**

2.3 Evolution clinique **44**

Chapitre 3. Diagnostic *48*

3.1 Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) **48**

3.2 Culture virale **49**

3.3 Détection de l'antigène viral 49

3.4 Détection des anticorps 50

3.4.1 Tests d'immunofluorescence 51

3.4.2 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) IgM et IgG 51

3.4.3 Autres méthodes sérologiques 52

3.5 Immunohistochimie 53

Chapitre 4. Prise en charge 55

4.1 Mesures générales de prévention 55

4.2 Vaccination 55

4.2.1 rVSV-ZEBOV (Merck & Co, USA) 55

4.2.2 chAd3-EBO-Z / cAd3-EBO (GlaxoSmithKline, UK) avec ou sans MVA-BN-Filo (Bavarian Nordic, Denmark) 56

4.2.3 Ad26.ZEBOV + MVA-BN-Filo (Johnson & Johnson, USA and Bavarian Nordic, Denmark) 57

4.2.4 Autres vaccins 57

4.3 Traitement 58

Chapitre 5. Écologie et réservoir des virus Ebola 60

5.1 Role des Primates non-humains, céphalophes et autres viandes de brousse 60

5.2 Role de Chauve-souris 62

5.3 Role d'autres espèces 64

Travaux de Thèse 67

Contexte et Objectifs de la thèse 68

Travaux de Thèse 72

Première Partie : Comprendre le réservoir animal des virus Ebola 72

Chapitre 1. Survey of Ebola Viruses in Frugivorous and Insectivorous Bats in Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017 73

Résumé (en Français) 73

Contexte 73

Matériels et Méthodes 73

Sites d'étude et prélèvement des échantillons 73

Détection des anticorps anti-virus Ebola 74

Détermination des seuils 74

Extraction de l'acide nucléique et détection de l'ARN du virus Ebola par PCR 74
Confirmation moléculaire des espèces de chauves-souris 75
Résultats 75
Espèces de chauves-souris et prélèvement des échantillons 75
Anticorps dirigés contre les antigènes des virus Ebola 75
Comparaison des séroprévalences du virus Ebola Zaïre chez les chauves-souris en Afrique à travers les différentes études 76
Détection de l'ARN du virus Ebola Zaïre par la RT-PCR 76
Discussion 76
Survey of Ebola Viruses in Frugivorous and Insectivorous Bats in Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017 78
Author affiliations : 78
ABSTRACT 79
INTRODUCTION 79
MATERIALS AND METHODS 80
Study Sites and Sample Collection 80
Screening for Ebola Virus Antibodies 81
Determination of cutoffs 82
Nucleic Acid Extraction and PCR Screening for Ebola Virus RNA 82
Molecular Confirmation of Bat Species 83
RESULTS 83
Bat Species and Sampling 83
Bats Antibodies against Different Ebola Virus Antigens 86
Zaire and Sudan Ebola Virus Reactivity of Different Bat Species 89
Comparison of Zaire Ebola Virus Seroprevalence in Bats from Africa across Studies 89
RT-PCR Screening for Zaire Ebola Virus RNA 90
DISCUSSION 94
Acknowledgments 96
Supplemental info 98
Adaptation of serological assay for screening of bats 98
Chapitre 2. Extensive serological survey of multiple African non-human primate species reveals low prevalence of IgG antibodies to four Ebola virus species 101
Résumé (en Français) 101

Introduction **101**

Matériels et Méthodes **102**

Echantillons des primates non-humains 102

Détection des anticorps anti-virus Ebola 102

Détermination des seuils 102

Résultats **103**

Diversité d'espèces de PNH testées 103

Faible prévalence des anticorps IgG chez les singes 103

Pas d'évidence d'anticorps IgG chez les grands singes 104

Discussion **104**

Extensive serological survey of multiple African non-human primate species reveals low prevalence of IgG antibodies to four Ebola virus species ***105***

Summary of article's main point **106**

ABSTRACT **106**

INTRODUCTION **106**

MATERIALS AND METHODS **109**

Samples from monkeys and apes 109

Screening for Ebola virus antibodies 110

Determination of cut-off values 111

RESULTS **112**

Diversity of non-human primate (NHP) species tested 112

Low prevalence of Ebola virus IgG antibodies in monkeys 113

No evidence of IgG Ebola virus antibodies in apes 118

DISCUSSION **118**

Funding and Acknowledgements **121**

Supplementary Figures and Tables **122**

Chapitre 3. Investigation zoonotique du virus Ebola à Likati : épicentre de l'épidémie de la maladie à virus Ebola de 2017, en RDC ***124***

Résumé ***124***

Contexte **124**

Matériels et Méthodes **124**

Résultats **124**

Discussion **125**

Investigation zoonotique du virus Ebola à Likati : épicentre de l'épidémie de la maladie à virus Ebola de 2017, en RDC ***126***

RESUME **127**

CONTEXTE **128**

MATERIELS ET METHODES **131**

Site d'étude 131

Equipe de recherche 133

Collecte des échantillons 133

Confirmation moléculaire des espèces 135

Extraction des acides nucléiques 136

Recherche des anticorps anti-virus Ebola 136

Détection de l'ARN du virus Ebola par la RT-PCR 136

RESULTATS **137**

DISCUSSION **140**

Travaux de Thèse ***142***

Deuxième Partie : Caractériser les virus Ebola chez l'homme pendant les épidémies ***142***

Chapitre 1. Rapid Confirmation of the Zaire Ebola Virus in the Outbreak of the Equateur Province in the Democratic Republic of Congo: Implications for Public Health Interventions ***143***

Résumé (en Français) ***143***

Introduction **143**

Méthodes **144**

Amplification par PCR 144

Analyse des séquences 144

Résultats **144**

Discussion **144**

Rapid Confirmation of the Zaire Ebola Virus in the Outbreak of the Equateur Province in the Democratic Republic of Congo: Implications for Public Health Interventions *146*

ABSTRACT **147**

INTRODUCTION **147**

MATERIALS AND METHODS **148**

PCR Amplification 148

Sequence Analysis 148

Bioinformatics and Phylogenetic Analysis 149

RESULTS **149**

DISCUSSION **151**

Notes **152**

Supplementary Data **153**

Chapitre 2. 2018 Ebola virus disease outbreak in Equateur Province, Democratic Republic of the Congo: a retrospective genomic characterization *154*

Résumé (en Français) *154*

Contexte **154**

Méthodes **154**

Traitement des échantillons et séquençage 154

Evolution moléculaire 155

Tests de diagnostic 155

Confirmation de la liaison des anticorps 155

Résultats **156**

Discussion **156**

2018 Ebola virus disease outbreak in Équateur Province, Democratic Republic of the Congo: a retrospective genomic characterization *158*

Summary *159*

Background **159**

Methods **159**

Findings **159**

Interpretation **160**

INTRODUCTION **160**

METHODS **161**

Sample processing and sequencing 161

Molecular evolution and rate analysis 161

Diagnostic assay analysis 162

Antibody binding confirmation 163

Role of the funding source **164**

RESULTS **164**

DISCUSSION **170**

Appendix **174**

Chapitre 3. Medical countermeasures during the 2018 Ebola virus disease outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces of the Democratic Republic of the Congo: a rapid genomic assessment ***224***

Résumé en Français ***224***

Contexte **224**

Méthodes **225**

Prélèvement des échantillons et Séquençage 225

Evaluation des tests de Diagnostic 225

Confirmation de la liaison des anticorps 225

Analyse de l'évolution moléculaire 226

Résultats **226**

Discussion **227**

Medical countermeasures during the 2018 Ebola virus disease outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces of the Democratic Republic of the Congo: a rapid genomic assessment ***228***

Summary ***229***

Background **229**

Methods **229**

Findings **229**

Interpretation **229**

INTRODUCTION **230**

METHODS **231**

Sample collection and sequencing 231

Genomic and diagnostic analysis 232

Antibody binding confirmation 233

Molecular evolution and rate analysis 234

Role of the funding source 234

RESULTS **234**

DISCUSSION **244**

Appendix **248**

Discussion Générale et Conclusion ***283***

Discussion Générale et Conclusion ***284***

Les principaux résultats de ces travaux de thèse sont les suivants : **284**

1.1. Amélioration des connaissances et perspectives **286**

1.1.1. Recherche des réservoirs des virus Ebola dans la faune sauvage en période inter-épidémiques 286

1.1.2. Recherche des réservoirs des virus Ebola dans la faune sauvage en période épidémique 288

1.1.3. Caractérisation des virus Ebola chez l'homme pendant les épidémies 290

1.2. Impact sur les mesures de contrôle de l'épidémie de la maladie à virus Ebola **291**

1.3. Défis pour le contrôle de l'épidémie actuelle au Nord Kivu et Ituri, en RDC **292**

1.4. Conclusion **296**

1.5. Perspectives **297**

VALORISATION DE LA THESE ***298***

Publications scientifiques **298**

Posters **300**

BIBLIOGRAPHIE ***301***

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la phylogénie des filovirus (figure obtenue par courtoisie auprès de Nicholas Di Paola) 27

Figure 2. Vue du virus Ebola au microscope électronique (souche ZEBOV-May, isolé lors de la première épidémie à Yambuku). Image obtenue à partir de la bibliothèque de Santé Publique du CDC..... 30

Figure 3. Représentation schématique du génome du virus Ebola montrant les différents gènes codant pour les protéines structurales et non structurales. Le RNAm editing responsable de la production des glycoprotéines au niveau du 4ème gène (D'après ViralZone)..... 31

Figure 4. Représentation schématique du génome du virus Ebola montrant les chevauchements des gènes différents entre le RESTV et les autres espèces (EBOV, BDBV, SUDV et TAFV) (adapté de Kuhn et al.) (Kuhn et al., 2008). 32

Figure 5. Cycle de vie des filovirus (adapté de Messaoudi) (Ilhem Messaoudi et al., 2015)..... 35

Figure 6. Pathogénèse des virus Ebola (adapté de Rivera et Messaoudi) (Rivera et al., 2016) 38

Figure 7. Epidémies causées par le virus Ebola en Afrique sub-saharienne de 1976 en 2018 (adapté de CDC/Mortality and Morbidity Weekly Report) (www.cdc.gov/vhf/ebola/history/distribution-map.html) 40

Figure 8. Transmission des virus Ebola dans la faune sauvage et chez les humains (adapté du CDC)..... 44

Figure 9. Evolution de l'ARN et des anticorps spécifiques du virus Ebola (adapté de Malvy et al.) (Malvy et al., 2019)..... 54

Figure 10. Study sites for bat blood sample collection for Ebola virus serology, Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015– 2017. 84

Figure 11. Bat blood samples reactive to Ebola virus antigens, by statistical method used to determine cutoff, Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017. Samples from frugivorous bats (n = 1,736) and insectivorous bats (n = 2,199) were tested by Luminex assay with GP, NP, and VP of the Zaire and Sudan lineages; GP and VP of the Bundibugyo lineage; and GP of the Reston lineage. GP, glycoprotein; K, Kissoudougou strain; M, Mayinga strain; NP, nucleoprotein; VP, viral protein 40. 86

Figure 12. Collection sites. Sites where samples from nonhuman primates were collected are highlighted with circles on the maps, as follows: yellow indicates sites where bushmeat samples from monkeys were collected; green, sites where fecal samples from apes were collected; yellow and green, sites where bushmeat samples from monkey and fecal samples from apes were collected. The samples from Tai forest in Ivory Coast are not shown. Maps are adapted from Pigott et al. (Pigott et al., 2016); area closer to dark red are estimated at highest risk for Ebola virus spillover events, and areas in light yellow are least at risk. Abbreviations: BP, Bipindi; BQ, north of Dja; CP, Campo; DJ, Djoum; EB, Mindourou; MS, Messok; MT, Mintom; MZ, Manzana; ND, Nditam; WK, Walikale; YD, Yaoundé.....110

Figure 13. Localisation des cas confirmés et probables dans la zone de santé de Likati, épidémie de la maladie à virus Ebola de 2017, en RDC (adapté du SITREP 28 du 30 Juin 2017) (Ebola Virus Disease, Democratic Republic of Congo : External Situation Report 28, 2017).....129

Figure 15. Crâne du potamochère retrouvé à 700 m du village de Kaigbono, dans la zone de santé de Likati (photos obtenues par courtoisie des membres de l'équipe d'investigation écologique). 130

Figure 16. Viande boucanée de chauve-souris consommée par les habitants à Kaigbono (photos obtenues par courtoisie des membres de l'équipe d'investigation écologique).....131

Figure 17. Vue aérienne du site et village des pécheurs de Kaigbono dans le district de Likati, province de Bas-Uélé, RDC (Photos obtenues par courtoisie des membres de l'équipe d'investigation écologique).....132

Figure 18. Voies d'accès au district de Likati, province de Bas-Uélé, RDC (Photos obtenues par courtoisie des membres de l'équipe).....133

Figure 19. Capture d'animaux et prélèvements d'échantillons par les équipes d'investigation écologique (photos obtenues par courtoisie des membres de l'équipe). 135

Figure 20. Analyses sérologiques et RT-PCR réalisées au laboratoire de virologie à l'INRB, Kinshasa, RDC.....137

Figure 21. Maximum likelihood tree showing phylogenetic relationships of samples from Bikoro/Iboko 2018 and other filovirus using partial VP35 sequences. Approximate likelihood ratio test nonparametric branch supports based on a Shimodaira-Hasegawa–like procedure are shown for the main nodes. The new strains from Bikoro/Itipo (2018) and the control samples from Boende (2014) are highlighted with a dot.....150

Figure 22. A timeline of the Ebola virus (EBOV) disease outbreak and establishment of genomics capacity at the Institut National de Recherche Biomédicale, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. The week of onset of illness for each probable and confirmed case is shown. Sequences were generated on the following day. CGS-USAMRIID-Center for Genome Sciences-USArmy Medical Research Institute of Infectious Diseases.....166

Figure 23. Phylogenetic analysis of the 2018 Equateur Province Ebola virus disease (EVD) outbreak. A temporally scaled maximum clade credibility tree from BEAST of the 2018 Equateur Province EVD outbreak with individual variants labelled. Posterior probabilities of more than 0.7.....167

Figure 24. Phylogenetic and root-to-tip distance analysis of near-complete Ebola virus (EBOV) sequences. (A) A maximum-likelihood tree outgroup rooted with the EBOV/Yam and EBOV/''Tan'' variants using 1026 sequences. Numbers near nodes indicate percentage bootstrap values after 1000 replicates. Trees are scaled by subtitutions per site. (B) Root-to-tip divergence linear regression analysis using TempEst and R studio software of 1026 sequences, with outgroup rooted to the 1976 EBOV Yambuku clade. A 95% prediction interval is shown using dashed lines. The R2 is 0.53 using Pearson's product-moment correlation p<0.001. COD-Democratic Republic of Congo. COG-Republic of Congo. GAB-Gabon.....168

Figure 25. Binding of ZMapp monoclonal antibodies to EBOV/''Tum'' glycoprotein. (A) Amino acid changes between the EBOV/Kik GP1,2 and the 16 EBOV/''Tum''GP1,2 sequences. Changes were noted in all sequences, except where marked. Histogram plots compare cell counts with log fluorescence intensity and overlay cell population bound by the (B) phycoerythrin-conjugated binding control monoclonal antibodies 13C6, 2G4 et 4G7. EBOV-Ebolavirus, GP-glycoprotein. *Only found in patient sample BIK012. Only found in patient sample BIK091.....169

Figure 26. Evaluation of deployed diagnostic EBOV assays. EBOV-Ebola virus. *Mismatches occurred in all 48 sequences tested, except where marked, whereby only 42 sequences were tested because the near-complete MAN035 sequences had missing data in the binding region. †An ambiguous base (R) was used to modify the original probe sequences identified in this study. ‡ Mismatches occurred in all 48 sequences tested, except where marked, whereby only MAN028 exhibited the mismatch. 233

Figure 27. A summary of sequencing and notable events of the 2018 EVD outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces. (A) Maximum-likelihood tree using a 212-nucleotide sequence of the EBOV VP35 gene showing the most likely Ebolavirus species in two early outbreak samples (blue circles). Asterisks indicate bootstrap support values greater than 70%. Scale is shown as substitutions per site. (B) Maximum-likelihood tree using coding-complete EBOV. Asterisks indicate bootstrap support values greater than 70%. Scale is shown as substitutions per site. (C) Timeline of the real-time response of in-country and international collaborators. The blue circle indicates the timepoint at which the two early outbreak samples were sequenced. EVD-Ebola virus disease. DRC-Democratic Republic of Congo. ROC-Republic of Congo. INRB-Institut National de Recherche Biomédicale. *Consensus sequences were assembled the following day. 237

Figure 28. Early transmission analysis of the 2018 EVD outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces. (A) Median-joining haplotype network using 46 EBOV/''Itu''sequences. Genomes are identified by health zone and health areas within health zones. Available patient villages are shown in bold. (B) Regional map of the Democratic Republic of Congo provinces showing EVD cases of interest in health zones. EVD-Ebola virus disease. 238

Figure 29. Unrooted maximum-clade credibility tree (A) and scaled map (B) labelled with the cities of EVD outbreaks. Yellow, orange, and blue shading shows Ebola virus variants with geographical proximity. Scale is shown as substitutions per site per year. Asterisks at tree nodes indicate a posterior probability greater then 0.9. ROC-Republic of Congo.....241

Figure 30. Root-to-tip and Bayesian analysis of inter-outbreak evolutionary rates with addition of EBOV/''Itu'' and EBOV/''Muy'' variants. Stacked root-to-tip analysis (A) and Bayesian strict clock rate estimate analysis (B) starting with EBOVsequences from August 1976, to April 2018, including EBOV/Mak (n=11; blue) and all four additional representatives as of August 2018, including EBOV/''Itu'' (n=15, light red). (C) A Bayesian maximum-clade credibility tree of representative EBOV sequences (n=15) using an uncorrelated lognormal relaxed clock. Branches are coloured according to relative branch rate. Red circles at node tips correspond to points in the panel A. Posterior probabilities are shown at tree nodes. The tree is scaled by

substitutions per site per year. EBOV-Ebola virus. CC-correlation coefficient. HPD-highest posterior density. DRC-Democratic Republic of Congo.....242
Figure 31. Tableau comparatif de l'épidémie du Nord Kivu et Ituri, en RDC, à celle de l'Afrique de l'Ouest (Guinée, Libéria et Sierra Leone), neuf mois après le début de l'épidémie (Ministère de la Santé de la RDC).....294
Figure 32. Evolution des cas d'infection au virus Ebola dans les épicentres majeurs en rapport avec les principaux incidents violents, au Nord Kivu et Ituri, en RDC (adapté de Ilunga Kalenga et al., 2019).....295

Liste des tables

Tableau 1. Taxonomie des virus Ebola et des autres filovirus (adapté de l'ICTV 2018) ("International Committee on Taxonomy of Viruses 2018") 29

Tableau 2. Protéines virales du virus Ebola et leurs fonctions (adapté de Kuhn et Falasca) (Kuhn, 2008; Falasca et al., 2015). 33

Tableau 3. Chronologie des épidémies de la maladie à virus Ebola de 1976 à 2018 (adapté de Rosello et al.) (Rosello et al., 2015; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019; https://mailchi.mp/sante.gouv.cd/ebola_kivu_08juil19). 43

Tableau 4. Caractéristiques des molécules thérapeutiques utilisées au cours des essais cliniques au Nord-Kivu, RDC, 2018. 59

Tableau 5. Bat samples collected for Ebola virus serology by study site, Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017. 85

Tableau 6. Bat species sampled for Ebola virus serology, Guinea, Cameroon, and the DRC, 2015–2017* 87

Tableau 7. Blood samples from bats reactive with Ebola virus antigens in Luminex assay, by antigen, bat type, and statistical method used to determine cutoff, Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017* 88

Tableau 8. Blood samples from bats reactive with both nucleoprotein and glycoprotein of Zaire or Sudan Ebola virus, by statistical method used to determine cutoff, Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017. 91

Tableau 9. Zaire Ebola virus antibodies in insectivorous bats from our research, Guinea, Cameroon, and the DRC, 2015–2017, and other published studies* 92

Tableau 10. Zaire Ebola virus antibodies in frugivorous (Pteropodidae family) bats from our research, Guinea, Cameroon, and the DRC, 2015–2017, and published studies* 93

Tableau 11. Number of samples collected for each species at the different collection sites in Cameroon (CM) and Democratic Republic of Congo (DRC), shown in Figure 12, and Ivory Coast (IC). 114

Tableau 12. Number of samples collected for each ape species at the different collection sites shown in Figure 12 115

Tableau 13. Number and Percentage for Each Species Reactive with the Different Antigens Used in the Luminex Assay for Zaïre ebolavirus 116

Tableau 14. Number and Percentage of Samples for Each Species Reactive with the Different Antigens Used in the Luminex Assay for Sudan ebolavirus, Bundibugyo ebolavirus and Reston ebolavirus 117

Tableau 15. Nombre d'animaux prélevés dans cette étude repartis selon leurs espèces 139

Préambule

Nous avons réalisé ces travaux de thèse dans le but de caractériser le virus Ebola à l'interface homme-animal sauvage et de mieux comprendre le réservoir du virus Ebola dans la faune sauvage en République Démocratique du Congo.

Pendant les trois années de notre travail de thèse et pendant que nous travaillions déjà sur la recherche du réservoir des virus Ebola dans la faune sauvage, la RDC a connu trois épidémies successives de la maladie à virus Ebola, notamment : à Likati, province de Bas-Uélé (Mai – Juillet 2017), à Bikoro, province de l'Equateur (Mai – Juillet 2018) et dans les provinces du Nord Kivu et Ituri (Aout 2018 et actuellement en cours). Ces événements nous ont conduit à adapter notre projet en tenant compte du contexte et surtout des réalités du moment.

Dans ce travail, nous présenterons, dans une première partie appelée « Etat des Connaissances » (Page 22), les généralités sur le virus Ebola, la maladie à virus Ebola et un aperçu des études précédentes sur la recherche du réservoir du virus Ebola. Les objectifs de recherche seront ensuite exposés (page 71) et annonceront le plan de la deuxième partie intitulée « Travaux de thèse ». Cette deuxième partie sera subdivisée en deux volets dont chaque volet comprendra trois chapitres. Les trois premiers chapitres présenteront les études que nous avons menées pour mieux comprendre le réservoir du virus Ebola dans la faune sauvage en période inter-épidémique et en période d'épidémie ; ensuite, les trois autres chapitres présenteront les études que nous avons réalisées sur la caractérisation du virus Ebola au cours des deux épidémies récentes de 2018 en RDC. Cinq de ces six chapitres sont écrits en anglais, mais toujours initiés par un résumé en français. Ces chapitres constituent des articles que nous avons publié dans des journaux internationaux. Le seul chapitre écrit complètement en français est le chapitre 3 du premier volet. Cet article est en préparation pour une publication dans un avenir proche. Enfin, dans la dernière partie de ce travail intitulée « Discussion Générale et Conclusion », nous discuterons de l'ensemble des résultats de ces travaux de thèse et de leur impact sur les mesures de contrôle de l'épidémie de la maladie à virus Ebola ; nous évoquerons également le contexte de l'épidémie actuelle en RDC ainsi que les différents défis auxquels nous faisons face pour contrôler cette épidémie qui dure depuis plus de 10 mois maintenant.

Contribution

J'ai effectué ces travaux de recherche sous la supervision de ma directrice de thèse, Dr Martine Peeters et de mon co-directeur de thèse, Professeur Steve Ahuka-Mundeke.

Expérimentations et analyses

J'ai réalisé les extractions d'ARN, les analyses de PCR, l'identification moléculaire des espèces, les analyses sérologiques avec la méthode ELISA classique et Luminex sur les échantillons de la faune sauvage collectés en RDC. Les analyses sur les autres échantillons de la faune sauvage, provenant du Cameroun, de la Cote d'Ivoire et de la Guinée ont été effectuées avec l'assistance des autres membres du laboratoire de virologie de l'INRB à Kinshasa et de TRANSVIHMI à Montpellier [1].

J'ai réalisé les extractions d'ARN, les analyses de PCR et le séquençage ayant conduit à la caractérisation rapide des souches du virus Ebola responsables des deux épidémies de 2018 en RDC, avec l'aide des équipes des laboratoire de TRANSVIHMI à Montpellier et de l'USAMRIID aux Etats-Unis [2].

Nous avons été assistés par l'équipe de TRANSVIHMI [1] et de l'USAMRIID [2] pour l'installation du laboratoire de séquençage de nouvelle génération à l'INRB avec les technologies MinIon (séquençage par nanopore) et Illumina (miseq et iseq).

Pendant les épidémies, j'ai installé le laboratoire pour le diagnostic du virus Ebola sur terrain à Mbandaka, un des épicentres de la première épidémie de 2018 dans la province de l'Equateur en RDC. Ensuite, avec l'aide des autres membres du laboratoire de virologie de l'INRB, nous avons installé des laboratoires dans deux autres sites que nous avons supervisé sous la coordination du Professeur Steve Ahuka-Mundeke, chef de département de virologie à l'INRB, pendant toute la période de cette épidémie. Ces laboratoires ont permis le diagnostic et le contrôle rapide de l'épidémie dans la province de l'Equateur.

Au cours de l'épidémie actuelle dans les provinces du Nord Kivu et Ituri en RDC, j'ai installé le laboratoire de terrain pour le diagnostic par PCR avec la plateforme Genexpert à Mangina, le point de départ de cette épidémie. Ensuite, avec l'aide des autres membres du laboratoire de virologie de l'INRB, nous avons installé des laboratoires dans six autres sites affectés dans ces deux provinces, ainsi qu'un laboratoire de séquençage à Katwa, un des épicentres de cette

épidémie. Je supervise tous ces laboratoires de terrain, assisté par Dr Daniel Mukadi, et sous la coordination du Professeur Steve Ahuka-Mundeke.

Grace à ces laboratoires de terrain, nous générons des échantillons et des données qui nous ont permis de réaliser une grande partie de ce travail.

Au cours de ces mêmes périodes, j'ai supervisé les investigations écologiques dans la faune en RDC pour la recherche du réservoir du virus Ebola en période d'épidémie et en zones affectées. Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet EBOSURSY financé par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE en sigle).

---

[1] Personnes de l'équipe ayant apporté une aide technique au laboratoire de l'INRB et TRANSVIHMI : Ahidjo Ayouba, Nicole Vidal, Amandine Esteban, Guillaume Thaurignac, Christelle Butel, Marceline Akonga, Bibiche Nsunda, Amuri Aziza

[2] Equipe de l'USAMRIID ayant apporté leur aide pour la mise en place du séquençage à l'INRB : Gustavo Palacios, Mike R. Wiley, Catherine Pratt, Nicholas Di Paola

[3] Voir les co-auteurs des publications respectives.

Etat des Connaissances

Chapitre 1. Virus Ebola

1.1 Découverte des virus Ebola

La première identification du virus Ebola zaïre coïncide avec deux épidémies survenues concomitamment entre Juin et Novembre 1976 dans les localités de Nzara, Maridi et Juba au sud du Soudan, et dans les localités de Yambuku et Bumba au nord-ouest du Zaïre (actuellement République Démocratique du Congo) (World Health Organization, 1978; WHO/International Study Team, 1978). Au vu des manifestations cliniques, les experts pensaient que ces épidémies étaient causées par le virus Marburg, aussi responsable des fièvres hémorragiques. Le virus Marburg a été identifié neuf ans plus tôt, c'est-à-dire en 1967, lorsque des chercheurs Allemands se sont contaminés en travaillant sur les cellules rénales des singes verts (*Chlorocebus spec.*) importés d'Ouganda pour la production du vaccin contre la poliomyélite (Gordon Smith et al., 1967; Kuhn, 2008).

Au Soudan, c'est au cours de la dernière semaine du mois de Juin 1976 que le premier cas a été identifié à Nzara, une localité d'environ 20.000 habitants (WHO/ International Study Team, 1978). C'était un employé de la principale usine de cotons de la région, qui a présenté une maladie fébrile sévère avec des maux de tête et douleurs thoraciques, suivis 5 jours plus tard par des manifestations hémorragiques notamment des saignements au nez, à la bouche et des diarrhées sanguinolentes. Ensuite, entre mi-Juillet et fin Août, environ 48 autres cas avaient été identifiés à Nzara parmi lesquels 27 décès. Grace aux investigations épidémiologiques, ces cas pouvaient être reliés aux patients précédant comme étant soit des contacts directs ou des personnes impliquées dans la prise en charge d'un patient infecté. Cependant, au cours de la première semaine du mois de Septembre 1976, d'autres cas étaient rapportés dans la même localité mais sans aucun lien établi avec les cas précédents. Il s'agissait de six autres employés de la même usine de coton ainsi que 25 de leurs contacts qui avaient développés les mêmes symptômes, parmi lesquels 21 étaient décédés. La maladie a été introduite dans la localité de Maridi (180km à l'Est de Nzara) en début Août 1976, lorsqu'un patient en provenance de Nzara a été admis à l'Hôpital de Maridi. Cet hôpital a servi d'amplificateur efficace à la propagation du virus dans toute la localité, et il a été également considéré par la communauté locale comme la principale source de contamination, car le

médecin directeur de l'Hôpital ainsi que 61 sur les 154 membres du staff infirmier étaient infectés parmi lesquels 33 étaient décédés. D'autres cas ont été exportés de Nzara vers Tembura, une petite localité située à 160km au nord de Nzara ; et aussi de Maridi vers Juba, la capitale régionale ; et à Khartoom. Au total 284 cas étaient identifiés dont 151 décès (soit une létalité de 53%), avec 280 cas (soit 98,5%) rapportés dans les localités de Nzara (67 cas) et Maridi (213 cas) (WHO/International Study Team, 1978). Deux souches d'un nouvel agent infectieux, semblable au virus Marburg, ont été isolées dans les sérums de deux patients en phase active de la maladie, admis dans les salles d'isolement de l'Hôpital de Maridi. Le nouveau virus a été isolé par Mr E. T. W. Bowen au laboratoire de haute sécurité du Microbiological Research Establishment à Porton Down à partir des cultures sur des cellules Vero et ensuite identifié par immunofluorescence (WHO/International Study Team, 1978; Bowen et al., 1977; M. Johnson et al., 1977).

Au cours de la même période au Zaïre (maintenant République Démocratique du Congo, RDC), une autre épidémie était détectée à la mission catholique de Yambuku et les villages environnants, dans la zone de Bumba, dans la province de l'Equateur (World Health Organization, 1978). Cette zone est située à environ 800 km au sud-ouest des localités précédemment affectées au Soudan. L'hôpital de la mission de Yambuku, avec une capacité de 120 lits, était établi depuis 1935 par des missionnaires belges. Jusqu'en 1976, il était encore considéré comme le principal hôpital de la zone. Cependant, durant la période épidémique, cet hôpital ne possédait que 5 seringues et aiguilles pour les traitements parentéraux de tous les patients ambulatoires, hospitalisés et ceux de la clinique prénatale. Ces seringues n'étaient pas stérilisées mais simplement rincés à l'eau chaude lorsqu'il fallait passer d'un patient à un autre. Le premier cas connu était un instituteur de l'école de la mission catholique qui s'est présenté à l'hôpital de la mission catholique de Yambuku fin aout 1976 avec de la fièvre. Il a été traité comme un cas de malaria avec de la chloroquine administrée par voie parentérale. Quelques jours après sa mort, neuf autres cas similaires étaient admis à l'Hôpital de la Mission de Yambuku. Parmi eux, il y avait des personnes ayant été traitées dans le même hôpital pour d'autres pathologies, sachant que la voie parentérale était le principal mode d'administration pour la plupart de médicaments retrouvés dans cet hôpital. Un cas était transféré à la Clinique Ngaliema de Kinshasa où 2 cas secondaires étaient survenus. Comme à Maridi, l'Hôpital de la Mission de Yambuku avait également servi d'amplificateur efficace de la propagation du virus

dans la zone. Treize sur 17 membres du staff de cet hôpital était infectés dont 11 sont décédés (World Health Organization, 1978). Cinquante-cinq villages sur les 250 de la zone de Bumba étaient touchés, et environ 280 personnes sont décédées (soit une létalité de 88%) sur les 318 cas identifiés dans cette zone (World Health Organization, 1978). Pendant l'épidémie, les principaux modes de contamination étaient soit contact direct avec une personne infectée soit réutilisation des seringues et aiguilles à l'hôpital (World Health Organization, 1978).

La première hypothèse était certainement la propagation du virus détecté au Soudan à partir d'une personne qui aurait voyagé du Soudan vers Yambuku (World Health Organization, 1978; WHO/International Study Team, 1978). Cependant, aucun lien n'a été établi entre les 2 épidémies (World Health Organization, 1978; WHO/International Study Team, 1978). Les analyses de laboratoire, réalisées au CDC/Atlanta (USA), au Microbiological Research Establishment (Angleterre) et à l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (Belgique) ont révélé que ces épidémies, au Zaïre et au Soudan, étaient causées par deux nouveaux virus morphologiquement similaires au virus Marburg mais différents sur le plan sérologique (Bowen et al., 1977; M. Johnson et al., 1977; Pattyn et al., 1977).

Grâce au concours du Professeur K.M. Johnson, de Center for Disease Control, Atlanta, du Prof S.R. Pattyn, de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers et Mr E.T.W. Bowen, de Microbiological Research Establishment, Porton Down, le nouveau virus hautement pathogène isolé au Zaïre a été nommé « virus Ebola » (M. Johnson et al., 1977). Ce dernier faisait référence à la rivière « Ebola », un affluent du fleuve Zaïre au nord de Yambuku, ville d'origine du patient à partir duquel le premier isolat a été obtenu (M. Johnson et al., 1977). Les 2 nouveaux virus, isolés au Zaïre et au Soudan, bien que similaires sur le plan morphologique et antigénique, représentaient deux lignées évolutives différentes du virus Ebola. Ainsi, ils ont été caractérisés comme 2 sous-types du virus Ebola (Kuhn, 2008). Le virus identifié au Zaïre était appelé « Zaïre ebolavirus (ZEBOV), actuellement Ebola virus (EBOV) » et celui du Soudan « Sudan ebolavirus (SEBOV), actuellement Sudan virus (SUDV) » (Kuhn et al., 2011). Au cours des années suivantes, d'autres virus Ebola ont été découverts. Ces autres virus, bien que présentant une réaction antigénique croisée avec les virus du Zaïre et du Soudan, étaient uniques : le premier a été découvert en 1989 dans une colonie des singes cynomolgus (*Macaca fascicularis*) provenant des Philippines et maintenus dans une

installation de quarantaine à Reston, en Virginie, aux Etats-Unis (Mary E. G. Miranda et al., 1991). Il s'agit du « Reston virus », responsable de la maladie à virus Ebola chez les primates non-humains ; contrairement aux autres virus Ebola, il ne cause que des infections asymptomatiques chez l'homme (M. E. G. Miranda and Miranda, 2011).

Ensuite, « Tai Forest virus », a été détecté pour la première fois chez une éthologue Suisse qui aurait contracté le virus Ebola pendant l'autopsie d'un chimpanzé trouvé mort en Novembre 1994 au parc national de Taï, en République de Côte d'Ivoire (B. Le Guenno et al., 1995). Au cours de l'autopsie, elle n'a constaté aucune blessure ni perforation. Cependant, il est possible que la transmission du virus ait été due à un contact avec le sang du chimpanzé, soit par projection de gouttelettes sur le visage, en particulier les muqueuses, ou sur la main. Elle a développé un syndrome "semblable à la dengue" qui a ensuite été diagnostiquée comme étant une fièvre hémorragique causée par le virus Ebola (Kuhn, 2008; B. Le Guenno et al., 1995).

En Août 2007, « Bundibugyo virus », le cinquième virus Ebola, fait son apparition pour la première fois lors d'une flambée de fièvre hémorragique virale qui s'est déclarée dans les cantons de Bundibugyo et de Kikyo du district de Bundibugyo, en Ouganda (Wamala et al., 2010; MacNeil et al., 2010). Des échantillons de sang des cas suspects ont été envoyés au CDC Atlanta, où la présence d'un virus Ebola a été confirmée en novembre 2007 (Wamala et al., 2010; MacNeil et al., 2010). Une analyse approfondie a révélé que ce virus Ebola était semblable, mais pas identique aux quatre autres virus Ebola identifiés précédemment (Kuhn, 2008).

Enfin récemment en 2018, un sixième virus Ebola « Bombali virus » a été décrit, détecté chez des chauve-souris insectivores (*Chaerephon pumilus* et *Mops condylurus*) retrouvées dans certaines habitations dans le district de Bombali, en Sierra Leone (Goldstein et al., 2018). Des études ont montré que la glycoprotéine de ce virus pouvait favoriser la pénétration virale dans les cellules humaines (Goldstein et al., 2018). Cependant, jusqu'à ce jour, aucune infection humaine n'a encore été décrite.

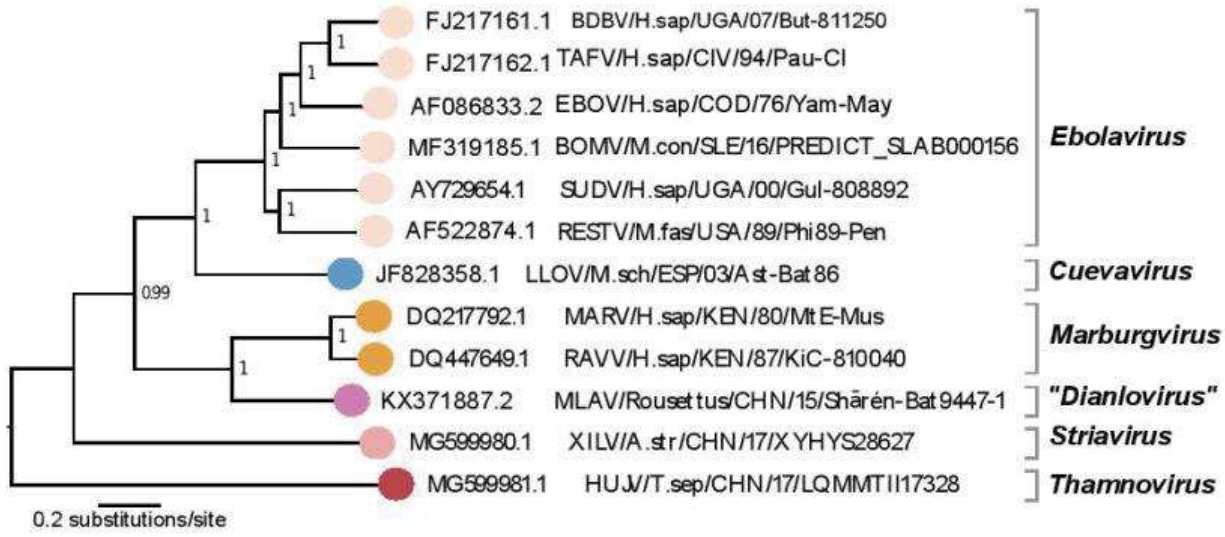


Figure 1 : Représentation schématique de la phylogénie des filovirus (figure obtenue par courtoisie auprès de Nicholas Di Paola)

1.2 Taxonomie des virus Ebola

Le virus Ebola appartient à l'ordre des mononégavirus et à la famille des filovirus. Ce sont des virus d'apparence filamenteuse présentant une organisation génomique et des stratégies de réplication similaire. Ces virus sont enveloppés et contiennent un génome à ARN simple brin, linéaire et non segmenté avec une polarité négative. Les filovirus possèdent un génome d'environ 19.000 paires de base, un peu plus long que les autres mononégavirus (8.000 à 16.000 paires de base), avec plusieurs gènes qui se chevauchent. Leurs génomes codent pour sept protéines structurales selon l'ordre suivant : 3'- UTR – NP – VP40 – VP35 – GP – VP30 – VP24 – L – 5' – UTR (Falasca et al., 2015; Kuhn, 2008). Sur base de leur évolution phylogénétique, les filovirus sont subdivisés en 5 genres suivant la dernière classification du Comité International sur la taxonomie des Virus (ICTV) 2018 ("International Committee on Taxonomy of Viruses 2018") et la dernière révision de la taxonomie des mononégavirus publiée en 2019 (Amarasinghe et al., 2019): *Marburgvirus, Ebolavirus*, *Cuevavirus, Striavirus* et *Thamnovirus*. Les mieux connus sont les genres *Ebolavirus*, responsable de la maladie à virus Ebola et *Marburgvirus*, responsable de la fièvre hémorragique de Marburg. Ces derniers sont les seuls filovirus jusqu'alors pouvant causer des fièvres hémorragiques virales chez l'Homme et certains primates non-humains (Kuhn, 2008). Le genre *Marburgvirus* comprend

une seule espèce le *Marburg marburgvirus* représentée par deux virus : Marburg virus (MARV), isolé pour la première fois en 1967 à Marburg an der Lahn, cité de Hesse, en Allemagne (Kuhn, 2008 ; Kristina Brauburger et al., 2012); et Ravn virus (RAVV), identifié en 1987 chez un cas isolé lors d'une surveillance de routine des fièvres hémorragiques virales effectuée au Kenya par le Kenya Medical Research Institute (KEMRI), l'Hôpital de Nairobi et l'US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID) (Johnson et al., 1996). Grâce aux techniques de virologie moléculaire moderne ayant permis d'explorer les relations phylogéniques entre ces différentes espèces, des chercheurs ont pu démontrer que ce virus était très proche des souches du virus Marburg, mais pas identique (Johnson et al., 1996). Le genre *Ebolavirus* comprend officiellement cinq espèces ("International Committee on Taxonomy of Viruses 2018"; Amarasinghe et al., 2019): *Bundibugyo ebolavirus* (virus type : Bundibugyo virus (BDBV)), *Reston ebolavirus* (virus type : Reston virus (RESTV)), *Sudan ebolavirus* (virus type : Sudan virus (SUDV)), *Taï Forest ebolavirus* (virus type : Taï Forest virus (TAFV)), et *Zaïre ebolavirus* (virus type : Ebola virus (EBOV)) ("International Committee on Taxonomy of Viruses 2018"). Le genre *Cuevavirus*, « cueva » qui signifie « cave » en espagnol, se référant au fait que ce virus a été identifié pour la première fois chez les chauves-souris retrouvées dans une cave (Negredo et al., 2011). Ce genre comprend une seule espèce « *Lloviu cuevavirus* » et un seul virus « Lloviu virus (LLOV) » détecté en 2011 chez la chauve-souris insectivore à doigts longs (Minioptère de Schreibers) à Cueva del Lloviu, dans la Principauté des Asturies, en Espagne (Negredo et al., 2011). Les genres « *Striavirus* » et « *Thamnovirus* » ont été découverts en 2011 en Chine grâce au séquençage de nouvelle génération réalisée sur des échantillons de reptiles, d'amphibiens et des poissons ("Genus Thamnovirus", 2019). Ces deux genres ne semblent infecter que les poissons et leurs génomes ne codent pas pour des glycoprotéines de surface évidentes ou homologues de VP40 et VP30 ("Genus Thamnovirus", 2019). Ils comprennent chacun une seule espèce : *Striavirus* (espèce : *Xilang striavirus* et virus type : Xilang virus (XILV)) et *Thamnovirus* (espèce : *Huangjiao thamnovirus* et virus type : Huangjiao virus (HUJV)) ("Genus Thamnovirus", 2019). Et c'est récemment en Janvier 2019 qu'un nouveau genre de la famille des filovirus vient encore d'être découvert. Il s'agit du genre « *Danliovirus* », étroitement lié aux genres *Ebolavirus* et *Marburgvirus*, ayant une seule espèce « Mengla virus ». Ce virus a été identifié pour la première fois chez une chauve-souris de genre Roussette dans le comté de Mengla, province de Yunnan, en République de Chine (Yang et al., 2019).

Notons que, le genre *Danliovirus* et son espèce le Mengla virus ainsi que le Bombali virus du genre *Ebolavirus* décrits chez des chauve-souris en Chine et en Sierra Leone, respectivement, ne sont pas encore officiellement classifiés par l'ICTV.

Tableau 1. Taxonomie des virus Ebola et des autres filovirus (adapté de l'ICTV 2018) ("International Committee on Taxonomy of Viruses 2018")

Ordre	Famille	Genre	Espèce	Virus membre
Mononegavirus	Filovirus	*Ebolavirus*	Bundibugyo ebolavirus	Bundibugyo virus
			Tai Forest ebolavirus	Tai Forest virus
			Zaire ebolavirus	Ebola virus
			Bombali ebolavirus	Bombali virus
			Sudan ebolavirus	Sudan virus
			Reston ebolavirus	Reston virus
		Cuevavirus	Lloviu cuevavirus	Lloviu virus
		Marburgvirus	Marburg marburgvirus	Marburg virus
				Ravn virus
		Dianlovirus	Mengla virus	
		Striavirus	Xilang striavirus	Xilang virus
		Thamnovirus	Huangjiao thamnovirus	Huangjiao virus

1.3 Structure des virus Ebola

La structure des virus Ebola a été décrite pour la première fois à partir des échantillons obtenus lors des premières épidémies d'Ebola survenues au Soudan et au Zaïre en 1976 (M. Johnson et al., 1977). Les particules ou virions des virus Ebola sont principalement de forme filamenteuse, mais peuvent également se présenter sous forme de U, de 6, de tiges ou même sous forme de branches ramifiées (Kuhn, 2008; M. Johnson et al., 1977; Kiley et al., 1982). Chaque particule est entourée d'une membrane qu'elle récupère à partir d'une cellule infectée et dont la surface est parsemée des glycoprotéines. Cette membrane est soutenue de l'intérieur par une matrice qui contient en son centre une nucléocapside cylindrique avec un axe central sombre de 19 à 25 nm de diamètre (Kuhn, 2008; Kiley et al., 1982; Bharat et al., 2012). Les virions ont généralement un diamètre de 80 nm avec une longueur qui varie de 900

à 1000 nm pouvant atteindre jusqu'à 14000 nm (Kuhn, 2008 ; Kiley et al., 1982 ; Bharat et al., 2012). Les particules extrêmement longues et ramifiées ont été observées particulièrement dans des cultures tissulaires, alors que celles ayant des formes pléomorphes plus courtes étaient typiques des échantillons de tissus prélevés sur des animaux et des humains infectés (Kuhn, 2008). Sur des cultures réalisées sur des cellules Vero, de légères différences morphologiques sont observées entre les espèces du genre *Ebolavirus*. Les particules de virus Ebola paraissent plus longues et à prédominance filamenteuse par rapport à celles des autres espèces ; et le virus Sudan semble produire de manière excessive des particules avec des formes aberrantes, des particules avec conglomérats d'enveloppes ou des noyaux nus. Ce qui peut expliquer pourquoi le SUDV est moins virulent que la souche EBOV en comparant les épidémies causées par les deux virus, bien que rien ne soit encore claire à ce sujet (Kuhn, 2008).

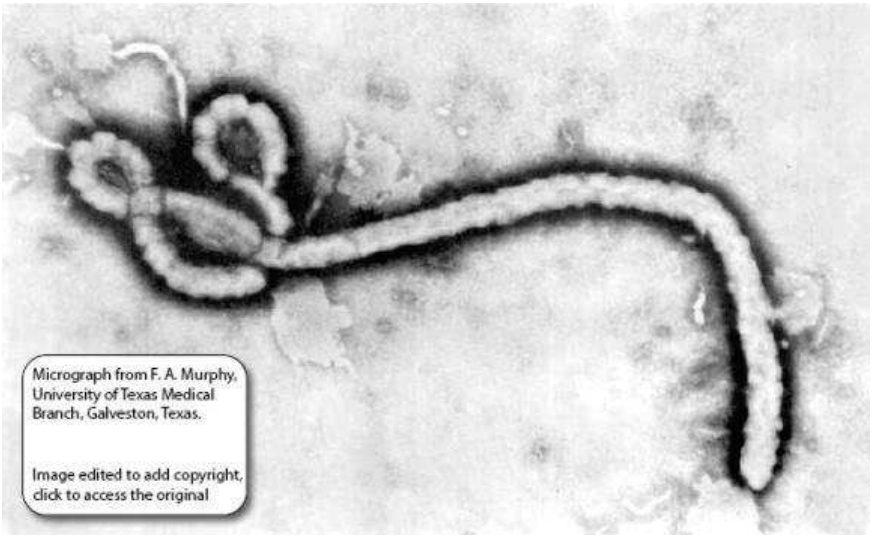


Figure 2. Vue du virus Ebola au microscope électronique (souche ZEBOV-May, isolé lors de la première épidémie à Yambuku). Image obtenue à partir de la bibliothèque de Santé Publique du CDC.

1.4 Organisation du génome des virus Ebola

Le génome des virus Ebola ne représente qu'environ 1,1% de la masse du virion, avec une taille d'environ 19.000 paires de base. Il possède sept gènes arrangés de manière linéaire de

l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' et séparées par des séquences inter-géniques variant en longueur et en nombre de nucléotides. Chaque génome du virus Ebola possède des sites hautement conservés d'initiation et de terminaison de la transcription. Ces gènes codent pour neuf protéines dont sept protéines structurales (NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24 et L) et deux protéines non structurales appelées la glycoprotéine sécrétée (sGP) et la glycoprotéine sécrétée secondaire (ssGP). Parmi ces protéines structurales, cinq sont similaires aux protéines présentes chez les autres mononégavirus, notamment la nucléoprotéine (NP), les protéines virales (VP) 35 et 40, la glycoprotéine (GP) et l'ARN polymérase ARN-dépendant (L) ; tandis que, la protéine virale (VP) 24 semble spécifique pour les filovirus et la VP30 n'a été décrite également que chez les pneumovirus. Le génome du virus contient des gènes qui se chevauchent à différents endroits. Ces chevauchements varient d'une espèce à une autre, tels que : dans le génome de *Reston ebolavirus*, il y a deux chevauchements dont l'un se situe entre les gènes VP35 et VP40, et l'autre entre les gènes VP30 et VP24 ; tandis que, dans les génomes de *Sudan ebolavirus, Bundibugyo ebolavirus, Taï Forest ebolavirus* et *Zaïre ebolavirus*, il y a trois chevauchements dans chacun de ces génomes dont le premier se situe entre les gènes VP35 et VP40, le deuxième entre les gènes GP et VP30 et le troisième entre les gènes VP24 et L. Cependant, les fonctions exactes liées à la présence des séquences inter-géniques ou des chevauchements des gènes dans le génome des virus Ebola ne sont pas encore élucidées (Kuhn, 2008; K. Brauburger et al., 2014; Kristina Brauburger and Boehmann, 2016).

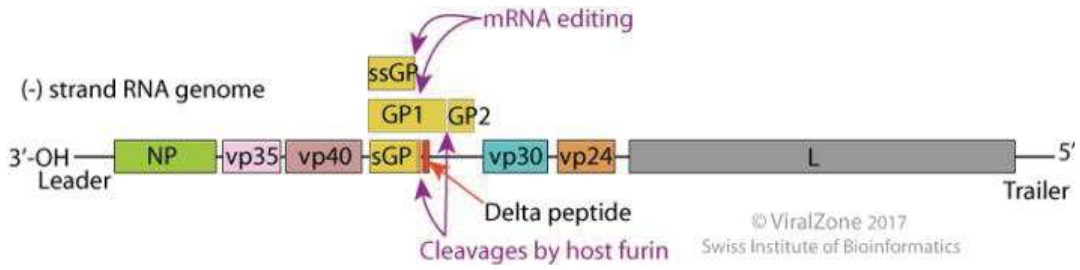


Figure 3. Représentation schématique du génome du virus Ebola montrant les différents gènes codant pour les protéines structurales et non structurales. Le RNAm editing responsable de la production des glycoprotéines au niveau du 4ème gène (D'après ViralZone)

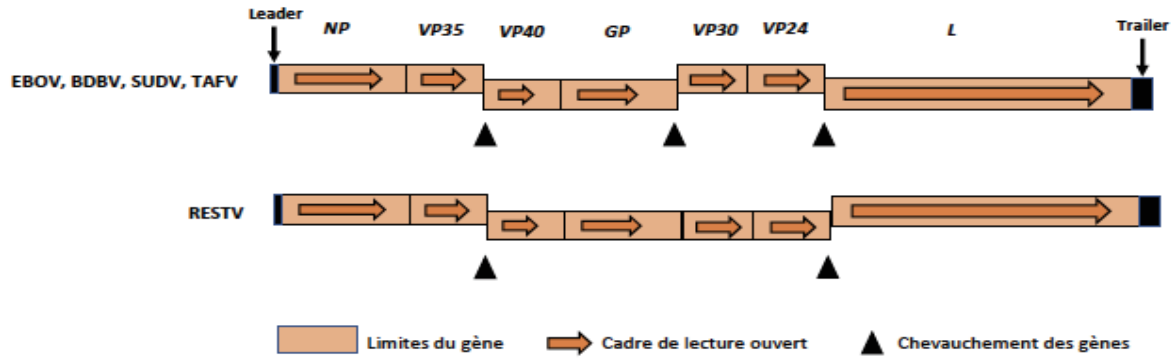


Figure 4. Représentation schématique du génome du virus Ebola montrant les chevauchements des gènes différents entre le RESTV et les autres espèces (EBOV, BDBV, SUDV et TAFV) (adapté de Kuhn et al.) (Kuhn et al., 2008).

1.5 Rôle et Expression des protéines virales

La nucléoprotéine (NP) est codée par le premier gène du même nom (NP) transcrit à partir de l'ARN génomique viral. Elle forme ensemble avec trois autres protéines virales (VP35, VP30 et L) des composantes structurelles de la nucléocapside. Ces protéines jouent un rôle clé dans la réplication et la morphogénèse virale ainsi que dans la transcription de l'ARN génomique viral. La VP35, cofacteur de la polymérase L, est également considéré comme un facteur de virulence car elle est capable d'inhiber l'immunité innée de la cellule hôte en interférant avec le processus de détection de l'ARN viral par les récepteurs cellulaires. La VP40 est une protéine membranaire périphérique située à la face intérieure de la membrane et joue un rôle important dans le bourgeonnement des particules virales. Le gène GP code pour trois différentes protéines : la glycoprotéine de surface (GP), la glycoprotéine sécrétée (sGP) et la glycoprotéine sécrétée secondaire (ssGP). La glycoprotéine de surface (GP) est la seule protéine transmembranaire exprimée à la surface des virions. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur clivé par l'endoprotéase furine en deux sous-unités, GP1, extracellulaire, et GP2, transmembranaire, reliées entre elles par des ponts disulfures. Elle intervient comme médiateur de la liaison, absorption et fusion des membranes virales et cellulaire, permettant au virion de pénétrer dans la cellule. Les deux autres (sGP et ssGP) sont des glycoprotéines

non structurelles, sécrétées par les cellules infectées par le virus Ebola. La glycoprotéine sécrétée (sGP) intervient dans la modulation du système immunitaire et aussi comme facteur anti-inflammatoire en protégeant la fonction de barrière des cellules endothéliales pendant l'infection ; alors que le rôle de la ssGP est encore inconnu jusqu'à présent (de La Vega et al., 2014). La VP30 est considérée comme la seconde nucléoprotéine et elle joue également un rôle dans l'initiation de la transcription. La VP24 est une protéine matricielle, parfois considérée comme la seconde matrice, impliquée dans la formation et l'assemblage de la nucléocapside. La VP24 et la VP35 jouent un rôle clé dans l'inhibition de la réponse immunitaire de type Interféron I. L'ARN polymérase (L) ARN-dépendant fait partie du complexe nucléocapside et, en tant qu'enzyme, il joue le rôle de catalyseur dans la réplication et la transcription de l'ARN génomique viral (Kuhn, 2008; Ilhem Messaoudi et al., 2015; Yu et al., 2017; Falasca et al., 2015).

Tableau 2. Protéines virales du virus Ebola et leurs fonctions (adapté de Kuhn et Falasca) (Kuhn, 2008; Falasca et al., 2015).

Protéines	Gènes	Taille en acide aminé (aa)	Proportion en %	Fonction
Nucléoprotéine (NP)	NP	739	17	Composant essentiel de la nucléocapside
Protéine virale 35 (VP35)	VP35	321	24,5	Composant de la nucléocapside, co-facteur de la polymérase (L), cible la réponse immunitaire innée (suppression des interférons)
Protéine virale 40 (VP40)	VP40	326	37,7	Protéine matricielle, maintient l'intégrité structurale du virion, requise pour la sortie du virion de la cellule infectée
Glycoprotéine sécretée (sGP)	GP	364	0	Modulation de l'immunité de l'hote
Protéine de surface (GP1,2)	GP	676	4,7	Pénétration du virion dans la cellule et fusion avec la membrane cellulaire
Glycoprotéine sécretée secondaire (ssGP)	GP	297	0	Inconnue
Protéine virale 30 (VP30)	VP30	288	6,6	Composant de la nuléocapside, activation de la transcription
Protéine virale 24 (VP24)	VP24	251	7,5	Bloque le signal des interférons alpha, beta et gamma, dérégulation du système immunitaire
ARN Polymérase ARN-dépendant (L)	L	2 212	2	Transcription et traduction du génome

1.6 Cycle de vie cellulaire des virus Ebola

La réplication et la transcription des virus Ebola ont lieu dans le cytoplasme des cellules infectées. Les virus codent pour leur propre ARN polymérase dépendante de l'ARN (L), qui reconnaît l'ARN génomique viral comme matrice pour la réplication et la transcription. Grâce à sa glycoprotéine, le virus s'attache à la surface externe de la membrane plasmique de la cellule hôte. La liaison des particules du virus Ebola à la surface cellulaire est médiée par la

liaison de la glycoprotéine (GP) du virus Ebola à deux groupes distincts de protéines de surface cellulaires liant les glucides, notamment : les récepteurs de lectine de type C et les glycosaminoglycanes (McElroy et al., 2018; Davey et al., 2017). Une fois que la glycoprotéine s'attache aux récepteurs, les virions pénètrent dans la cellule par endocytose suivi de la fusion du virus et de la membrane plasmique de l'hôte et de la libération du génome virale dans le cytoplasme. L'ARN polymérase (L) va alors utiliser le génome viral, ayant perdu son enveloppe à l'entrée de la cellule, comme modèle pour la transcription des gènes viraux en ARNm, et aussi pour la synthèse et la réplication de l'antigénome. L'antigénome viral, étant le complément inverse de l'ARN génomique, servira de modèle à la production des nouveaux génomes viraux. La traduction des ARNm entraine la production des protéines virales structurales, qui s'associent aux génomes de la descendance pour former des ribonucléocapsides ou complexes ribonucléoproteines. Ensuite plus tard, les ribonucléocapsides vont acquérir de la matrice virale et des glycoprotéines. La libération des virions de la cellule vers l'espace extracellulaire peut se faire soit directement à partir de la membrane plasmique, dans ce cas les complexes ribonucléoprotéines migrent sous les membranes cellulaires permettant aux virions de germer directement à partir de la membrane cellulaire ; soit au travers des sous-compartiments des corps multi vésiculaires périphériques pouvant alors se déplacer vers les radeaux lipidiques de la membrane plasmique, où ils pourraient fusionner avec la membrane et libérer les virions dans l'espace extracellulaire (Kuhn, 2008; Falasca et al., 2015; Ilhem Messaoudi et al., 2015; Yu et al., 2017).

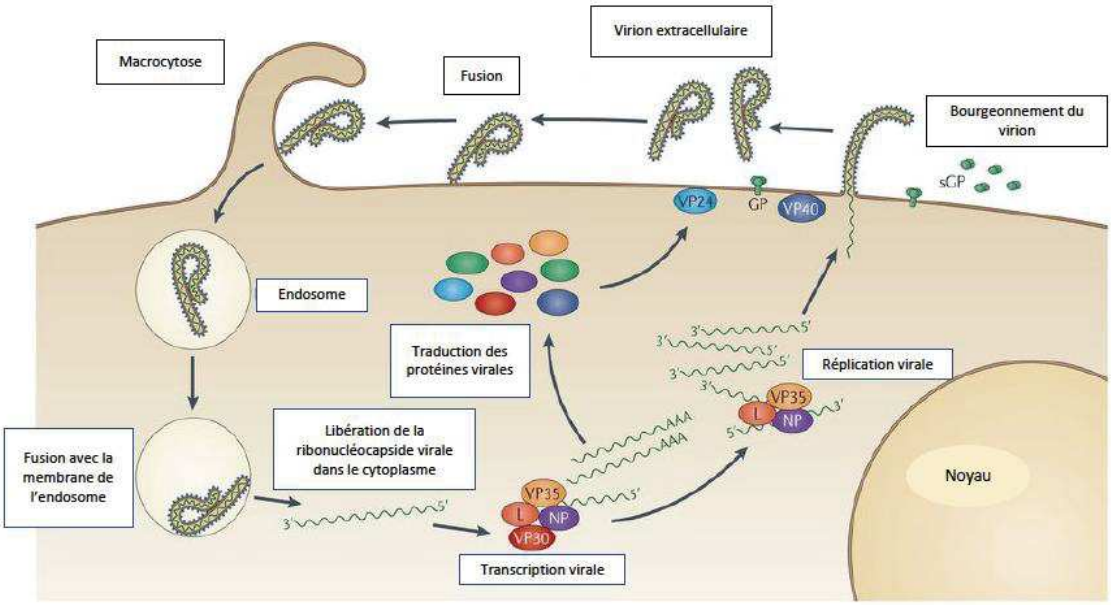


Figure 5. Cycle de vie des filovirus (adapté de Messaoudi) (Ilhem Messaoudi et al., 2015)

1.7 Pathogenèse des virus Ebola

L'homme est généralement contaminé par contact direct avec les liquides corporels d'un autre individu ou d'un animal infecté. Ensuite, les virus pénètrent dans le corps par des lésions de la peau ou des muqueuses. C'est grâce aux études sur les primates non humains, utilisés comme modèle animal de référence pour l'étude de la maladie à virus Ebola, que nous arrivons à mieux comprendre la pathogenèse de ces infections (Geisbert et al. 2003). Les virus Ebola peuvent infecter de nombreux types de cellules, notamment les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques, les cellules de Kupffer dans le foie, les fibroblastes, les tissus des glandes surrénales, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. Les virus se répliquent préférentiellement et initialement dans les macrophages et les cellules dendritiques. L'infection de ces cellules mobiles favorise le transport du virus par les voies lymphatiques jusqu'aux ganglions lymphatiques et par le sang vers le foie et la rate, où le virus peut infecter les macrophages des autres tissus, y compris les cellules de Kupffer et les cellules dendritiques. Les macrophages infectés vont produire des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires, telles que : IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β et TNFα. Les cytokines MIP-1α et MCP-1 produites, vont alors à leur tour recruter des macrophages supplémentaires dans les

zones d'infection, ce qui permettra au virus Ebola d'infecter davantage de cellules cibles. L'infection des cellules dendritiques inhibe leur maturation et empêche la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. La suppression de la maturation des cellules dendritiques semble être liée à la suppression par les protéines virales des voies de signalisation de l'immunité innée (Kuhn, 2008; Falasca et al., 2015; Ilhem Messaoudi et al., 2015; Rivera et al., 2016).

Hormis son impact néfaste sur la réponse immunitaire innée, l'infection par le virus Ebola entraine également des perturbations de la réponse immunitaire adaptative. Chez les modèles de souris et de primates non-humains, ces perturbations intéressent particulièrement les lymphocytes T CD4, les lymphocytes T CD8 et les populations de cellules tueuses naturelles (NK) (Reed et al., 2004; Lüdtke et al., 2017; Geisbert et al., 2003). En outre, une lymphopénie à lymphocytes T CD4 et CD8 était rapportée chez les primates non-humains infectés par le virus Ebola *in vitro*, déjà au quatrième jour après l'infection, montrant que l'apoptose des lymphocytes survient relativement tôt au cours de la maladie (Geisbert et al., 2003). Les conséquences de cette lymphopénie sur la pathogenèse ne sont pas complètement élucidées, quoique la perte des lymphocytes T CD4 pourrait expliquer l'absence observée d'anticorps IgM et IgG spécifiques du virus Ebola chez les patients décédés (McElroy et al., 2018; Baize et al., 1999; Rivera et al., 2016).

L'infection grave au virus Ebola se caractérise habituellement par la présence de l'hémorragie et de la coagulation intravasculaire disséminée chez les patients infectés. Celles-ci étant plausiblement le résultat des effets combinés de l'augmentation des facteurs de coagulation et de la réduction du facteur anticoagulant, la protéine C. En paralysant la réponse immunitaire de l'hôte, le virus peut se propager facilement dans les cellules des autres viscères telles que les hépatocytes, les cellules corticales surrénaliennes et les cellules endothéliales du tissu conjonctif. L'hémorragie peut résulter de plusieurs mécanismes : diminution de la synthèse des protéines de la coagulation due à la nécrose hépatocellulaire ; perturbation de l'homéostasie de la pression artérielle suite à l'infection et à la nécrose cortico-surrénalienne ; et augmentation de la perméabilité vasculaire et fuites vasculaires due à l'action des TNFα sur les cellules endothéliales (Ilhem Messaoudi et al., 2015; Geisbert et al., 2003; Hensley et al., 2002; Rivera et al., 2016).

Des études sur des primates non-humains montrent que, au cours d'une infection au virus Ebola, les anomalies de la coagulation débutent un peu plus tôt avec une diminution importante des taux plasmatiques de la protéine anticoagulante C, remarquable déjà au deuxième jour de l'infection (Geisbert et al., 2003). Cette diminution de la protéine C est suivie, quelques jours plus tard, d'une augmentation de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) impliqué dans la dissolution des caillots sanguins et d'une augmentation des produits de dégradation de la fibrine (D-dimères). L'infection des macrophages par le virus Ebola entraîne aussi une surproduction du facteur tissulaire (TF) localisé à la surface des monocytes et des macrophages ainsi que la libération de microparticules membranaires exprimant le TF. Cela a pour conséquence de favoriser une sur-activation de la voie extrinsèque de la coagulation et certainement une coagulation intravasculaire disséminée. En outre, la surproduction du TF peut également être exacerbée par la présence des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 que l'on retrouve en grande quantité dans la phase aiguée de la maladie à virus Ebola, amplifiant ainsi le phénotype de coagulation intravasculaire. La dérégulation de la coagulation entraine aussi une baisse des thrombocytes, un prolongement du temps de Thrombine et même une fibrinolyse pouvant se manifester par des pétéchies, des ecchymoses et des hémorragies muqueuses (Ilhem Messaoudi et al., 2015; Geisbert et al., 2003; Bray M et al., 2001; Baseler et al., 2017; Rivera et al., 2016).

La létalité des infections aux virus Ebola est probablement due, en partie, à leur capacité à neutraliser les défenses antivirales innées de l'hôte, en particulier les réponses liées aux IFN de type I (IFNα et IFNβ) qui constituent les principaux composants de la réponse immunitaire innée aux infections virales. Ce qui permet aux virus de se répliquer de manière excessive entrainant ainsi des dommages importants sur les différentes cellules de l'hôte comme décrits ci-dessus.

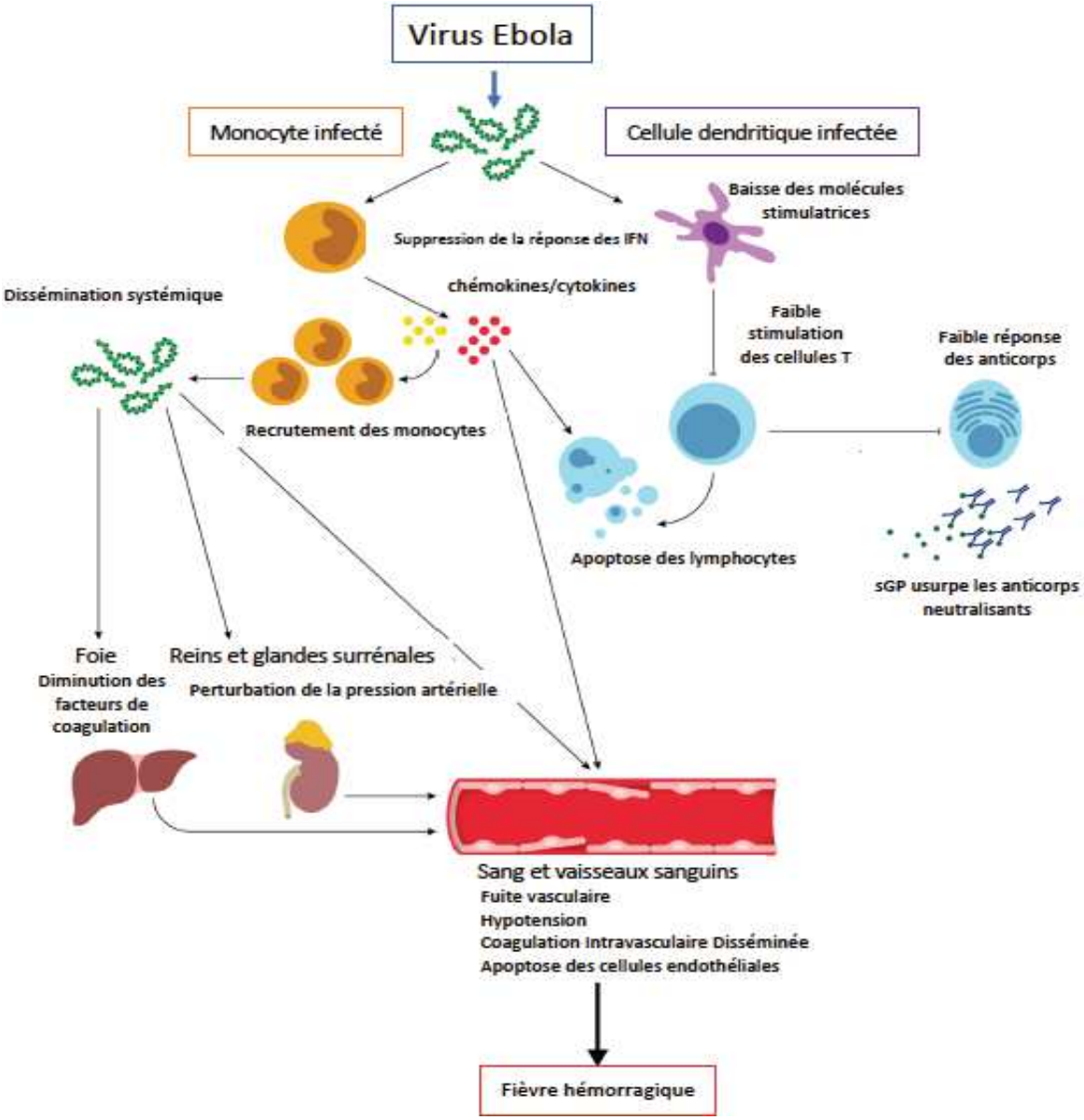


Figure 6. Pathogénèse des virus Ebola (adapté de Rivera et Messaoudi) (Rivera et al., 2016)

Chapitre 2. Maladie à virus Ebola

2.1 Epidémiologie

En se référant à la nouvelle taxonomie des filovirus (Virus Taxonomy : 2018b release, https://talk.ictvonline.org/taxonomy/), sur les espèces du genre *Ebolavirus*, seuls quatre virus (Bundibugyo virus, Sudan virus, Taï Forest virus et Ebola virus) peuvent entrainer une maladie sévère chez l'homme. Jusqu'à présent, parmi ces quatre virus, seuls les virus Bundibugyo, Sudan et Ebola ont été associés aux épidémies dans les populations humaines (Kuhn 2008; Malvy et al. 2019). Suivant la récente édition de la classification internationale des maladies publiée par l'OMS en Juin 2018 (ICD-11, version 04/2019, https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2ficd%2fentity%2f1517015847), la maladie causée par les espèces du genre *Ebolavirus* de manière non spécifique est appelée « maladie Ebola autrement spécifié ». Cependant, lorsque les espèces sont spécifiées, particulièrement pour les trois virus responsables des épidémies chez les humains, la maladie causée par le virus Bundibugyo sera appelée « maladie à virus Bundibugyo », celle causée par le virus Sudan « maladie à virus Sudan » et celle causée par le virus Ebola « maladie à virus Ebola ».

Depuis la première épidémie en 1976, ces trois virus ont déjà causé plus de vingt-huit épidémies survenues principalement au Soudan et Ouganda pour les virus Sudan ; en Ouganda et en RD Congo pour le virus Bundibugyo ; et en RD Congo, République du Congo (Brazzaville), Gabon, Guinée, Libéria et Sierra Leone pour le virus Ebola (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2019; Malvy et al. 2019). La plupart de ces épidémies se sont produites dans des zones rurales enclavées, mais actuellement les zones semi-urbaines et urbaines sont de plus en plus touchées. C'était le cas de la plus grande épidémie de la maladie à virus Ebola survenue en Afrique de l'Ouest entre 2014 et 2016, où les zones urbaines de ces trois pays (Guinée, Libéria et Sierra Leone) avaient été affectées avec plus de 28000 cas et plus de 11000 décès (Kaner and Schaack 2016; Bell et al. 2016). C'est également le cas de la RD Congo, où une épidémie de la maladie à virus Ebola est en cours depuis environ onze mois, touchant les zones semi-urbaines et urbaines avec déjà plus de 2400 cas et plus de 1600 décès (https://mailchi.mp/sante.gouv.cd/ebola_kivu_08juil19). C'est la deuxième grande épidémie de la maladie à virus Ebola après celle de l'Afrique de l'Ouest.

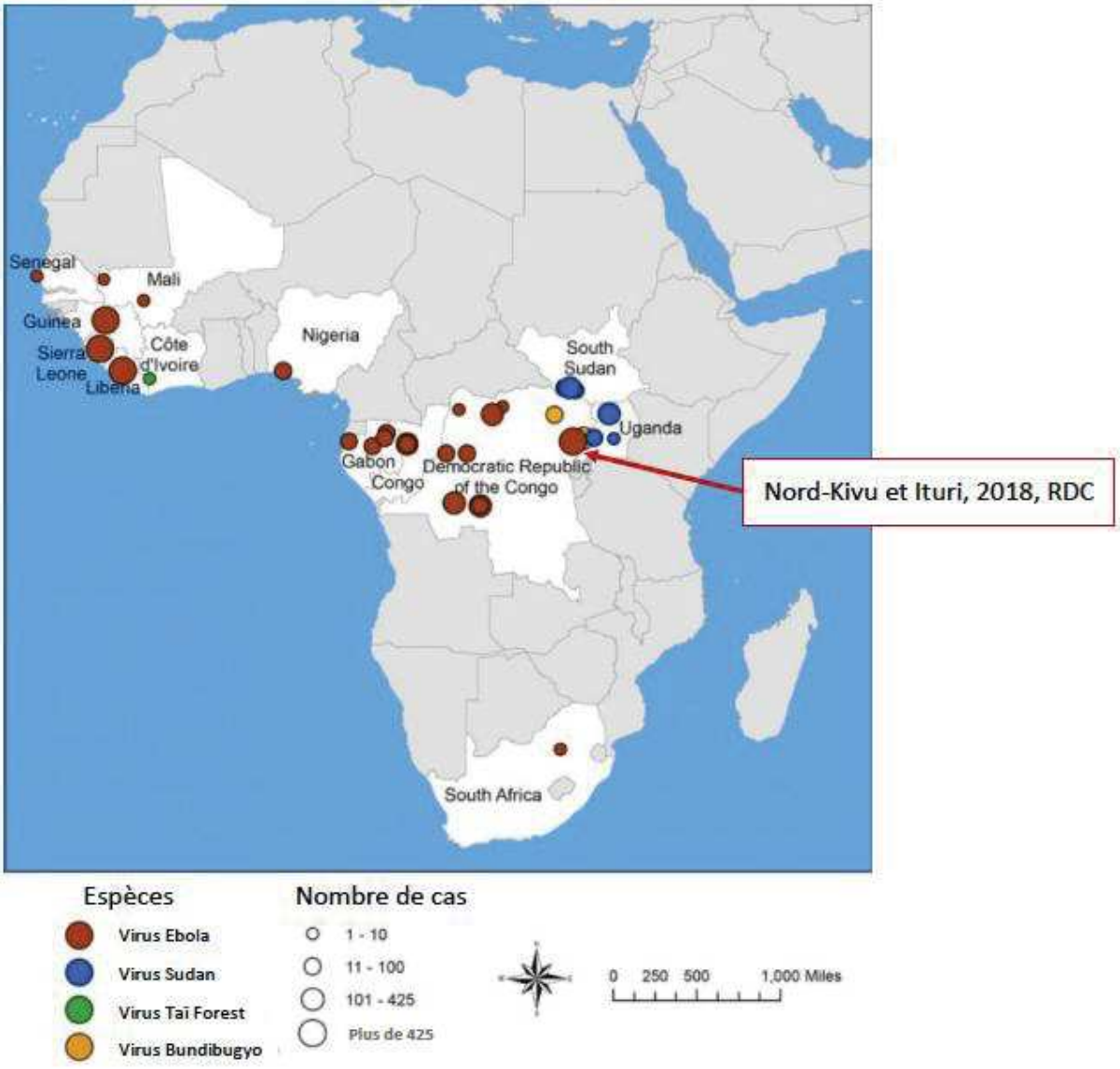


Figure 7. Epidémies causées par le virus Ebola en Afrique sub-saharienne de 1976 en 2018 (adapté de CDC/Mortality and Morbidity Weekly Report) (www.cdc.gov/vhf/ebola/history/distribution-map.html)

2.1.1 Epidémies de la maladie à virus Bundibugyo

Deux épidémies sont décrites avec ce virus. La première survenue en 2007 dans le district de Bundibugyo, en Ouganda où 131 cas ont été enregistrés et 42 décès (une létalité de 32%) (MacNeil et al., 2011).

La deuxième épidémie de la maladie à virus Bundibugyo est survenue en 2012 dans la province Orientale au nord-est de la RD Congo. Il y a eu 36 cas confirmés et 13 décès, soit une létalité de 36% (Albariño et al., 2013).

2.1.2 Epidémies de la maladie à virus Sudan

En 1976, survenue de la première épidémie de la maladie à virus Sudan dans les villes de Nzara, Maridi et ses environs, au Soudan. Cette épidémie a commencé avec les travailleurs d'une usine de coton où plus de 30% ont été infectés. Le virus s'est transmis principalement par contact direct au sein des hôpitaux qui étaient devenus des amplificateurs de l'épidémie avec plusieurs personnels de santé infectés. Il y a eu 284 cas et 151 décès, soit une létalité de 53% (WHO/International Study Team, 1978).

En 1979, une autre épidémie s'est produite dans les villes de Nzara et Yambio, au Soudan, pratiquement dans la même région touchée par l'épidémie de 1976. Le cas index était un individu de 45 ans de sexe masculin, employé à l'usine de coton où avait débuté l'épidémie précédente. Comme en 1976, les structures sanitaires ont également favorisé la propagation du virus. Il y a eu 34 cas et 22 décès, soit une létalité de 65% (Roy et al., 1983).

En 2000, survenue de la première épidémie de la maladie à virus Sudan en Ouganda. L'épidémie a débuté à Gulu et s'est ensuite propagée aux districts de Masindi et de Mbarara. L'engagement de la communauté et des autorités locales a permis de contrôler rapidement cette épidémie. Il y a eu 425 cas enregistrés et 224 décès, soit une létalité de 53% (Okware et al., 2002).

En 2004, une nouvelle épidémie s'est produite dans le comté de Yambio, au Soudan. Il y avait au même moment une épidémie de rougeole dans la même région et plusieurs cas de rougeole ont été confondus aux cas suspects de la maladie à virus Sudan. Au total, 17 personnes étaient infectées parmi lesquelles 7 décès, soit une létalité de 41% (World Health Organization, 2005).

En 2011, un seul cas de décès a été enregistré dans le district de Luwero, en Ouganda. Le diagnostic a été réalisé au laboratoire de l'Institut Ougandais de Recherche sur les Virus (UVRI). Trois facteurs ont permis de stopper rapidement la propagation du virus : (i) un diagnostic

clinique rapide avec une forte suspicion de fièvre hémorragique, (ii) l'utilisation correcte de l'équipement de protection individuelle et des méthodes de protection du personnel hospitalier et (iii) la capacité de confirmer rapidement le diagnostic grâce à un laboratoire installé dans le pays (MacNeil et al., 2012).

En 2012, une épidémie a été détectée au mois de juin dans le district de Kibale, en Ouganda où il y a eu 11 cas confirmés et 4 décès, soit une létalité de 36% (Albariño et al., 2013).

Au cours de la même année au mois de Novembre, une autre épidémie est survenue dans les districts de Luwero, Jinja et Nakasongola, en Ouganda avec 6 cas confirmés et 3 décès, soit une létalité de 50% (Albariño et al., 2013).

2.1.3 Epidémies de la maladie à virus Ebola

Depuis sa première apparition en 1976, le virus Ebola a causé environ 18 épidémies avec plus de 31 000 cas et une létalité variant de 39 à 89 % (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2019). La RD Congo a connu 9 épidémies de la maladie à virus Ebola incluant celle qui frappe actuellement les provinces du Nord Kivu et de l'Ituri depuis le mois d'Aout 2018 (Mbala-Kingebeni et al. 2019). Au cours de certaines épidémies, des cas de la maladie à virus Ebola ont été également détectés dans d'autres pays en dehors de la zone épidémique. Par exemple, un cas a été détecté en Afrique du Sud en 1996 après avoir été en contact avec un patient infecté provenant du Gabon (Georges-Courbot et al., 1999); et lors de l'épidémie en Afrique de l'Ouest, la maladie à virus Ebola s'est propagée dans sept autres pays (Italie, Mali, Nigéria, Sénégal, Espagne, Royaume-Uni et États-Unis) (https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/2014-2016-outbreak/index.html) où elle a été rapidement contrôlée. Ceci prouve combien, avec la rapidité et la fréquence des mouvements des personnes, grâce aux différents moyens de transport moderne (véhicule, bateau, train, avion, etc.), une épidémie peut facilement se propager d'un pays à un autre voire d'un continent à un autre. La chronologie des épidémies de la maladie à virus Ebola de 1976 à 2018 est reprise dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3. Chronologie des épidémies de la maladie à virus Ebola de 1976 à 2018 (adapté de Rosello et al.) (Rosello et al., 2015; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019; https://mailchi.mp/sante.gouv.cd/ebola_kivu_08juil19).

Année	1976	1977	1994	1995	1996	1996	2001	2001	2002
Localisation	Yambuku, RD Congo	Tandala, RD Congo	Mékouka, Andock et Minkébé, Gabon	Kikwit, RD Congo	Mayibout2, Gabon	Boué, Gabon	Districts de Mbomo et Kéllé, Congo (Brazza)	Districts de La Zadié, Ivindo et Mpassa, Gabon	Districts de Mbomo et Kéllé, Congo (Brazza)
Milieu	rural/foret tropical	rural/foret tropicale	rural/foret tropicale	peri-urbain/urbain	rural	rural	rural	rural	rural
Origine suspectée	antilope fumé ? viande de singe ?	inconnue	inconnue	inconnue	chimpanzé	chimpanzé ?	gorille ?	gorille ?	gorille, antilope ?
Nombre de cas	318	1	49	310	31	60	59	65	143
Nombre de décès	280	1	29	250	21	45	43	53	128
Létalité (%)	88	100	59	81	67,7	75%	73	81	89
Debut	août-76	juin-77	déc-94	janv-95	févr-96	oct-96	oct-01	oct-01	déc-02
Fin	oct-76	juin-77	févr-95	juil-95	ND	mars-97	mars-02	mars-02	apr-03

Année	2003	2005	2007	2008/2009	2014	2014	2017	2018	2018 (au 02 Mai 2019)
Localisation	District de Mbomo, Congo (Brazza)	District d'Etoumbi, Congo (Brazza)	Luebo et Mweka, RD Congo	Luebo et Mweka, RD Congo	Boende, RD Congo	Guinée, Libéria et Sierra Leone	Likati, RD Congo	Bikoro, Itipo et Mbandaka, RD Congo	Nord Kivu et Ituri, RD Congo
Milieu	rural	rural	rural	rural	rural	rural, péri urbain et urbain	rural	rural et urbain	rural et urbain
Origine suspectée	inconnue	inconnue	chauve-souris ?	inconnue	inconnue	chauve-souris?	Chauve-souris ? Sanglier ?	inconnue	inconnue
Nombre de cas	35	12	264	32	69	28610	8	54	1847
Nombre de décès	29	10	187	15	49	11308	4	33	1221
Létalité (%)	83	83	71	47	71	39	50	61	66,1
Debut	nov-03	avr-05	avr-07	nov-08	juil-14	mars-14	mai-17	mai-18	août-18
Fin	déc-03	mai-05	oct-07	janv-09	oct-14	mars-16	juil-17	juil-18	à présent

2.2 Transmission de la maladie à virus Ebola

La maladie à virus Ebola, étant une zoonose, est transmise à l'homme initialement par contact avec un animal infecté, par exemple une chauve-souris ou un primate non humain. Cette contamination intervient généralement lors de la manipulation ou le dépeçage de l'animal au moment de la préparation pour la consommation. Ensuite, le virus va se propager de personne à personne, pouvant affecter plusieurs personnes et créer une épidémie majeure si le virus se retrouve dans une population très dense où la détection et les mesures de prévention ne sont pas efficaces.

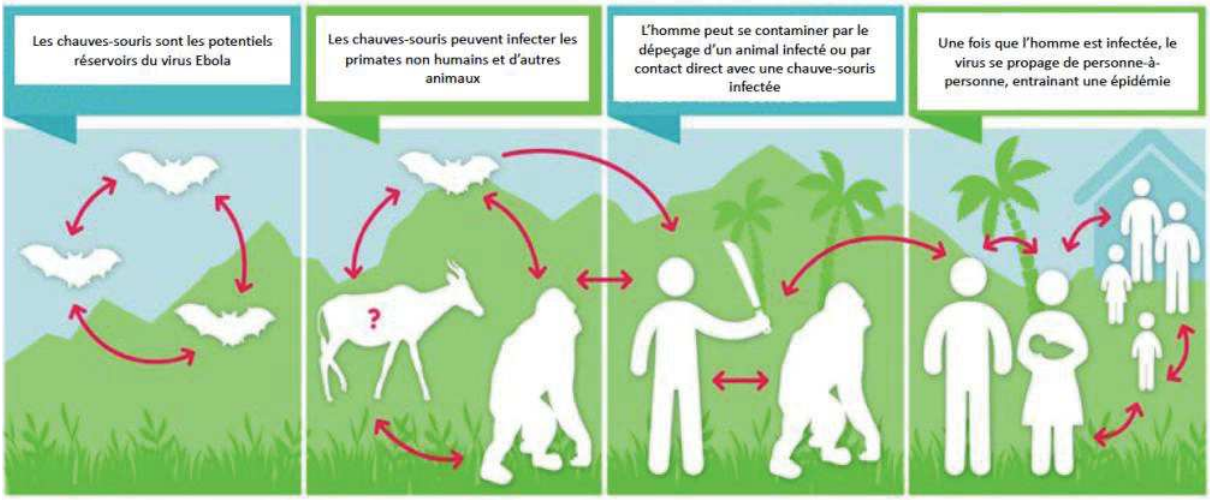


Figure 8. Transmission des virus Ebola dans la faune sauvage et chez les humains (adapté du CDC)

Dans la population humaine, le virus se transmet par contact direct (par exemple, à travers une plaie sur la peau ou par les muqueuses des yeux, du nez ou de la bouche) avec :

- Du sang ou autres fluides organiques (urine, salive, sueur, matières fécales, vomissures, lait maternel et sperme) d'une personne malade ou décédée de la maladie à virus Ebola ;
- Des objets (tels que des aiguilles, des seringues, literie, vêtements, etc.) contaminés par des liquides organiques d'une personne atteinte de la maladie à virus Ebola ou le corps d'une personne décédée des suites de cette maladie ;
- Du sperme d'un homme qui est guéri de la maladie à virus Ebola (lors d'un rapport sexuel). Le virus peut persister dans certains fluides corporels (y compris le sperme) d'un patient guéri pendant plusieurs mois (Malvy et al., 2019; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019; Diallo et al., 2016; Etard et al., 2017; Chertow, 2019).

2.3 Evolution clinique

La maladie à virus Ebola semble évoluer habituellement en trois phases : une phase fébrile ou bénigne, une phase avec des manifestations gastro-intestinales et une phase des complications (Kuhn, 2008; Malvy et al., 2019; Hunt et al., 2015). Après une période d'incubation de 2 à 21 jours (en moyenne 8 à 10 jours), la maladie à virus Ebola débute généralement de manière brusque avec des symptômes non spécifiques tels que fièvre,

malaises, fatigue et courbature que l'on peut confondre à un syndrome grippal ou aux autres maladies fébriles tropicales (malaria, fièvre typhoïde, etc.). Ensuite, après environ 3 jours, apparaissent des symptômes gastro-intestinaux, notamment des nausées, des vomissements et de la diarrhée. Cette phase dure habituellement 3 à 10 jours. Ces manifestations gastro-intestinales peuvent être bénignes, nécessitant tout simplement une réhydratation orale ou alors sévères avec une perte de liquide pouvant atteindre 10 litres par jour et nécessitant une réhydratation intraveineuse. D'autres symptômes et signes peuvent également être observés au cours de cette phase, notamment : la toux, la dyspnée, l'injection conjonctivale, le hoquet ou une douleur localisée (thorax, abdomen, muscles ou articulations). Après ce stade, certains patients peuvent évoluer vers la guérison ; tandis que d'autres vont évoluer vers la phase des complications avec des manifestations gastro-intestinales plus sévères associées aux signes hémorragiques, à une défaillance multi-viscérale, aux complications neurologiques (confusion, délire et convulsions) et à un état de choc (Kuhn, 2008; Malvy et al., 2019; Rojek et al., 2017). Des cas d'encéphalite liée à la maladie à virus Ebola ont également été rapportés (Jacobs et al., 2016; de Greslan et al., 2016; Sagui et al., 2015).

Cette maladie a été décrite pour la première fois comme fièvre hémorragique Ebola à cause de la fréquence élevée des saignements gastro-intestinaux, gingivaux, muqueux ou aux sites d'injection après ponction veineuse chez les patients infectés lors des premières épidémies en 1976 (WHO/International Study Team, 1978; World Health Organization, 1978). Cependant, au fil de temps, certains symptômes et signes cliniques semblent varier selon les épidémies. Par exemple, les signes hémorragiques étaient plus fréquents à Yambuku 1976 (78%), à Kikwit 1995 (37%) et Boende 2014 (environ 40%) (World Health Organization, 1978; Khan et al., 1999; Maganga et al., 2014). Tandis que, lors de l'épidémie de l'Afrique de l'Ouest entre 2014 et 2016, les manifestations gastro-intestinales étaient prédominantes avec parfois une absence de fièvre chez environ 10 % des patients suivis en Guinée (WHO Ebola Response Team, 2014; Fitzpatrick et al., 2015; Kang et al., 2015). La dysphagie, la douleur à la gorge et les ulcères buccaux sont d'autres symptômes tardifs observés au cours de la maladie à virus Ebola (WHO Ebola Response Team, 2014). Des éruptions cutanées non spécifiques et d'aspect maculo-papuleux ont été également rapportées (WHO Ebola Response Team, 2014; Blattner et al., 2015).

Les données recueillies sur les épidémies précédentes montrent que les femmes enceintes

semblent plus à risque de développer une maladie sévère et avec un taux de mortalité élevé (WHO Team 1978; Mupapa et al., 1999). Elles sont également confrontées à un risque élevé de fausse couche et de mort-né (WHO Team, 1978; Mupapa et al., 1999; Bebell et al., 2018).

Sur le plan biologique, les patients présentent généralement : une anémie de degré varié, une thrombocytopénie, une perturbation de la fonction rénale et une augmentation des enzymes hépatiques (en particulier de l'Aspartate aminotransférase). On peut également observer une augmentation des concentrations de la créatine phosphokinase et d'amylase. Les troubles électrolytiques sont fréquents, en particulier l'hypokaliémie, l'hyponatrémie et l'hypocalcémie (Hunt et al., 2015; Trial et al., 2017). Une acidose métabolique peut survenir, notamment en cas de choc et d'insuffisance rénale. Les tests de coagulation peuvent révéler un degré variable de coagulation intravasculaire disséminée. Lors des épidémies précédentes, la majorité des cas graves avec un pronostic vital engagé ont présenté : des charges virales élevées, de la fièvre, une fatigue intense due à une atteinte musculaire sévère, une désorientation temporo-spatiale, des signes hémorragiques, de la diarrhée et des perturbations importantes de la fonction rénale et hépatique (Hartley et al., 2017; Schieffelin et al., 2014). L'état du patient, atteint de la maladie à virus Ebola, peut également être aggravé par la présence des comorbidités (hypertension artérielle, diabète, cancer, etc.) ou des infections concomitantes (paludisme, septicémie bactérienne, etc.).

Des cas asymptomatiques ou pauci-symptomatiques de la maladie à virus Ebola ont été décrits grâce à la détection des anticorps spécifiques du virus Ebola chez des personnes ayant rapportés avoir eu des contacts directs avec des personnes infectées (Glynn et al., 2017; Diallo et al., 2019). Certains auraient développé des symptômes ou signes cliniques bénins qui sont passés inaperçus ; tandis que, d'autres n'auraient présenté aucun signe de la maladie. Généralement, les personnes qui guérissent de la maladie à virus Ebola sont celles qui parviennent à développer une réponse immunitaire efficace capable d'éliminer le virus pendant la phase aiguë de la maladie (Ksiazek et al., 1999; Baize et al., 1999; Leroy et al., 2000).

Cependant, le virus peut persister pendant des semaines voire plusieurs mois dans certains sites immunologiques privilégiés (les testicules, les chambres de l'œil) et particulièrement chez les femmes ayant été infectées pendant la grossesse, le virus peut persister dans le placenta, le liquide amniotique, le fœtus et le lait maternel (Diallo et al., 2016; Etard et al., 2017; Rowe et al., 1999; Green et al., 2016; Sissoko et al., 2017). La persistance du virus pose trois risques :

la transmission de la maladie aux autres personnes non malades dans la communauté (exemple, par transmission sexuelle) entrainant ainsi une résurgence de l'épidémie ; la réactivation de la maladie due à une réplication importante du virus dans l'un des sites immunologiques privilégiés (risque pour la personne guérie) ; et la réinfection des personnes autrefois symptomatiques mais qui n'ont pas pu développer une immunité efficace après leur guérison (Macintyre and Chughtai, 2016; Chughtai et al., 2016). Pendant l'épidémie de l'Afrique de l'Ouest, des cas de rechute symptomatique de la maladie à virus Ebola chez les personnes guéries ont été rapportés, mais très peu ont été documentés, tels que : l'apparition d'une uvéite chez un médecin Américain neuf semaines après avoir été guéri et le virus a été isolé dans l'humeur aqueuse (Varkey et al., 2015) ; et la réapparition des symptômes neurologiques chez une infirmière Ecossaise après sa guérison. Elle a développé une méningite et le virus Ebola a été isolé dans le liquide céphalo-rachidien (Jacobs et al., 2016b). Des résurgences de la maladie à virus Ebola ont été rapportées en Guinée et au Libéria ; et après investigation, la transmission sexuelle à partir d'une personne guérie était la cause la plus probable de ces résurgences (Diallo et al., 2016; Den Boon et al., 2019; Christie et al., 2015; Mate et al., 2015). Des cas de réinfection ont été également rapportés lors de l'épidémie de l'Afrique de l'Ouest, mais aucun n'a été confirmé (Macintyre and Chughtai, 2016). Des études réalisées auprès des personnes guéries, environ une année après leur sortie des centres de traitement Ebola, ont révélé que ces personnes développent souvent des séquelles qui peuvent durer plusieurs mois affectant ainsi la qualité de leur vie. Parmi ces séquelles, les plus rapportées sont : des symptômes neurologiques (perte de mémoire, dépression), des douleurs musculo-squelettiques (arthralgie, myalgie), de la fatigue, des douleurs abdominales, des maux de tête et des atteintes oculaires (uvéite) (Etard et al., 2017; Chertow, 2019; Rowe et al., 1999; Scott and Semple, 2017; Hunt and Knott, 2016; Vetter et al., 2016; Bausch, 2015; Clark et al., 2015).

Chapitre 3. Diagnostic

Au début de la maladie, le diagnostic clinique peut être difficile car les premiers symptômes et signes cliniques (la fièvre, les malaises, les maux de tête et les courbatures) ne sont pas spécifiques à la maladie à virus Ebola. Ces symptômes et signes cliniques sont également observés dans le cadre d'autres maladies, telles que le paludisme et la fièvre typhoïde, endémiques dans les régions touchées par le virus Ebola. Pour suspecter un cas de la maladie à virus Ebola, il existe une combinaison d'éléments, notamment les symptômes et signes cliniques évocateurs associés à une ou plusieurs expositions possibles dans les 21 jours avant l'apparition des symptômes, notamment : contact direct avec du sang ou autres fluides corporels d'une personne infectée par la maladie à virus Ebola ; avec le sperme d'une personne guérie de la maladie à virus Ebola ; ou encore avec un animal infecté par le virus Ebola ou un animal suspect retrouvé mort.

La confirmation de la maladie à virus Ebola est réalisée par des tests de laboratoire. Les méthodes de diagnostic ont varié au fil des épidémies. De 1976 à 1995, le diagnostic de la maladie à virus était basé sur l'isolement du virus par culture cellulaire et la sérologie ; tandis qu'à partir de 1996 lors des épidémies survenues au Gabon jusqu'à présent, le diagnostic est de plus en plus réalisé par les méthodes de biologie moléculaire (RT-PCR) ; quoique les autres techniques comme la détection de l'antigène viral et la sérologie soient toujours utilisées (Broadhurst et al., 2016). Voici ci-dessous quelques méthodes d'analyses de laboratoire pour le diagnostic de la maladie à virus Ebola :

3.1 Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Méthode très utile pour la détection de l'ARN viral dans les produits biologiques. Elle est rapide et sensible, mais nécessite un équipement spécial et un personnel de laboratoire bien formé. Il existe la RT-PCR conventionnelle et la RT-PCR en temps réel. La RT-PCR conventionnelle a été utilisée pour le diagnostic lors des épidémies de la maladie à virus Ebola et à virus Sudan survenues en 1996 au Gabon et en 2000 en Ouganda, respectivement (Okware et al., 2002; Georges et al., 1999). Le désavantage avec cette technique est qu'elle est assez longue nécessitant d'autres étapes supplémentaires (la préparation de l'ADNc avant la PCR et la migration du produit de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose). Par contre, la RT-PCR en

temps réel, actuellement considérée comme la principale technique de diagnostic, est plus rapide et peut donner les résultats en deux heures. Cependant, cette technique nécessite également un personnel hautement qualifié pour réaliser les analyses en évitant les contaminations pendant les différentes étapes (extraction de l'ARN viral, préparation des réactifs et mélange des réactifs aux extraits d'ARN viral avant la PCR). Il existe des tests de RT-PCR validés pour une utilisation en cas d'urgence par l'OMS ou le FDA dont certains sont commercialisés en kit (par exemple, RealStar Filovirus et RealStar Ebolavirus produits par Altona Diagnostics)(Rieger et al., 2016; Broadhurst et al., 2016).

Depuis l'épidémie de l'Afrique de l'Ouest, plusieurs autres tests de biologie moléculaire plus rapide et plus simple ont été développé, notamment : la RT-PCR avec la plateforme GeneXpert approuvés par l'OMS et le FDA pour une utilisation en cas d'urgence, actuellement utilisée en RDC lors des récentes épidémies (Cepheid 2015; Semper et al., 2016; Mbala-Kingebeni et al. 2019); la Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) et la recombinase polymerase amplification (RPA). Les deux derniers tests ont également montré de bonnes performances lorsqu'ils étaient comparés aux tests de RT-PCR et avec un temps de détection réduit environ 15 minutes pour la RT-LAMP et 30 minutes pour la RPA (Oloniniyi et al., 2017; Carter et al., 2017; Kurosaki et al., 2016; Kurosaki et al., 2016; James et al., 2018).

3.2 Culture virale

L'isolement du virus en culture cellulaire est la méthode de référence par excellence pour confirmer la présence du virus Ebola. Cette méthode utilise généralement des cellules épithéliales rénales des singes verts d'Afrique (cellule Vero E6) (Johnson et al., 1977; Pattyn et al., 1977; Georges-Courbot et al., 1997). Le virus peut être visualisé directement par microscopie électronique ou indirectement par microscopie à immunofluorescence dans les 5 jours suivant l'inoculation. Cette méthode n'est réservée qu'aux laboratoires possédant un niveau de confinement maximal (niveau de biosécurité 4).

3.3 Détection de l'antigène viral

La détection des antigènes viraux dans le sang constitue une méthode fiable pour le diagnostic de la phase aiguë de la maladie à virus Ebola chez les patients symptomatiques, car les protéines virales s'accumulent généralement à des taux détectables quelques jours après le

début de la maladie. Le premier test a été développé en 1989 par l'Institut de Recherche sur les Maladies Infectieuses de l'Armée Américaine (USAMRIID) (Ksiazek et al., 1992). Ensuite, il a été évalué par le CDC lors de l'épidémie de 1995 à Kikwit, en République Démocratique du Congo (Ksiazek et al., 1999). Ce test a également été utilisé avec succès pendant les épidémies de la maladie à virus Sudan survenues en 2000 et 2001 à Gulu, en Ouganda (Towner et al., 2004). Grâce à cette méthode, l'antigène viral peut être détecté dans le sérum dès l'apparition des symptômes. Généralement, chez les patients atteints de la maladie à virus Ebola, les antigènes viraux apparaissent tôt au début de la maladie puis augmente progressivement pour atteindre un pic autour du 10ème jour. Chez les patients qui décèdent, les antigènes persistent à des taux élevés jusqu'au décès ; tandis que, chez les survivants, ils diminuent progressivement jusqu'à devenir indétectable vers le 14 et 15ème jour après le début des symptômes (Rowe et al., 1999; Baize et al., 1999; Ksiazek et al., 1999; Towner et al., 2004).

Au cours des récentes épidémies, les tests de diagnostic rapide par immunochromatographie à flux latéral ont été développé et certains sont approuvés par l'OMS et le FDA pour l'utilisation en cas d'urgence. Ces tests sont basés sur la capture des antigènes et certains peuvent détecter plusieurs antigènes d'une même espèce de virus ou même des antigènes de plusieurs espèces du genre *Ebolavirus.* Nous pouvons citer : OraSure Ebola Rapide Antigen test (OraSure technologies, USA) capable de détecter l'antigène VP40 pour EBOV, SUDV et BDBV, sans les distinguer ; SD Q Line Ebola Zaire Antigen (SD Biosensor, Corée du Sud) capable de détecter les antigènes NP, GP et VP40 pour EBOV ; ReEBOV RDT (Corgenix, USA) capable de détecter l'antigène VP40 pour EBOV, SUDV et BDBV ; et QuickNavi-Ebola (Denka Seiken, Japon) capable détecter l'antigène NP pour EBOV, TAFV, BDBV et SUDV (Jean Louis et al., 2017; Yoshida et al., 2016; VanSteelandt et al., 2017; Cross et al., 2016; World Health Organization, 2015). Ces tests sont généralement facile à utiliser et certains peuvent se conserver jusqu'à huit mois à la température ambiante (Yoshida et al., 2016). Ces tests permettent d'obtenir des résultats très rapidement souvent dans les 30 minutes suivant la réception de l'échantillon et ils ont été surtout utilisés pour le diagnostic des cas suspect décédés dans la communauté.

3.4 Détection des anticorps

Les tests sérologiques sont utilisés depuis les premières épidémies en 1976 pour démontrer une infection actuelle (IgM) et antérieure (IgG) par le virus Ebola (WHO Team, 1978; Johnson

et al., 1977; Heymann et al., 1980).

3.4.1 Tests d'immunofluorescence

Le test de détection indirecte des anticorps fluorescents (IFAT) a permis en 1977 de distinguer le virus Ebola du virus Marburg sur la base de la spécificité antigénique virale des anticorps dans les sérums prélevés chez des survivants des épidémies de Marburg de 1967 et 1975, et celle de la maladie à virus Ebola de 1976 (Johnson et al., 1977). Les premières méthodes utilisaient des cultures cellulaires (cellules Vero E6) infectées par le virus Ebola, qui était ensuite inactivé par irradiation par les rayons gamma (Ksiazek et al., 1999). Ces tests comparés au test ELISA ont montré une bonne sensibilité, mais une spécificité faible (Ksiazek et al., 1999). Une nouvelle technique d'IFAT a été mise au point utilisant des cellules HeLa exprimant des protéines recombinantes NP du virus Ebola (Saijo et al., 2001) et du virus Reston (Ikegami et al., 2002). Bien que l'IFAT ne soit pas adapté pour analyser plusieurs échantillons en même temps, c'est une technique qui semble simple et pouvant être utile pour la détection des anticorps surtout si elle est combinée aux autres méthodes comme ELISA IgG (Kuhn, 2008).

3.4.2 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) IgM et IgG

Les tests ELISA pour la détection des anticorps IgM et IgG spécifiques du virus Ebola offrent un système plus rapide et plus performant pour les tests sérologiques. Ces tests utilisent des antigènes viraux préparés à partir de cultures cellulaires inoculées pour lier les anticorps présents dans le sérum du patient (Ksiazek et al., 1999). Le virus contenu dans les échantillons cliniques était inactivé par les rayons gamma, pour permettre de réaliser la sérologie dans les conditions de BSL-2. Cependant, l'inactivation virale par irradiation gamma n'est disponible que dans les laboratoires de certaines institutions spécialisées. L'inactivation virale par la chaleur et au détergent avant le test sérologique par ELISA a été décrite (Grolla and Strong, 2005), mais les données concernant les performances du test dans ces conditions ne sont pas disponibles. L'Agence de la Santé Publique du Canada a également développé un test ELISA pour les IgG qui a été utilisé en 2015 lors de l'épidémie de la maladie à virus Ebola en Afrique de l'Ouest (Vega et al., 2015) et aussi récemment sur terrain en 2017 lors de l'épidémie de Likati, en RDC. Compte tenu des défis liés à la production des antigènes authentiques à partir des cultures virales dans une installation de BSL-4, des tests ELISA utilisant des protéines

virales recombinantes ont été développés et commercialisés (https://www.4adi.com/4adi/ebola-marburg-virus-vaccine-elisa-reagents-2762-c.html). Ces tests sont surtout utilisés pour les enquêtes sérologiques de la maladie à virus Ebola et semblent moins utiles pour le diagnostic de la maladie en phase aiguë car les IgG et les IgM se développent chez les survivants, mais pas dans tous les cas mortels (Baize et al., 1999; Ksiazek et al., 1999). Cependant, la sérologie est la méthode de choix pour diagnostiquer la maladie à virus Ebola chez les patients pauci-symptomatiques ou asymptomatiques, qui se caractérisent par une virémie extrêmement basse, une forte réponse inflammatoire et par l'apparition des anticorps environ deux à trois semaines après l'infection (Glynn et al., 2017; Leroy et al., 2000).

Dans une étude portant sur 29 survivants de la maladie à virus Ebola de l'épidémie de Kikwit en 1995, des anticorps IgM et IgG sont apparus respectivement entre le deuxième et le dixième jour ; et entre le sixième et 19ème jour après l'apparition des symptômes (Rowe et al., 1999). Les IgM étaient détectables chez tous les patients entre les jours 10 et 29 de la maladie et ont persisté au moins jusqu'au jour 30 et jusqu'au jour 168. Les IgG étaient détectables chez presque tous les patients au 19e jour de la maladie et persistaient au moins jusqu'au jour 661 et jusqu'au jour 749. Des résultats similaires ont été obtenus lors d'une analyse rétrospective d'échantillons de sérum des survivants prélevés au cours de trois épidémies causées par différentes espèces du genre *Ebolavirus* (1995, Kikwit, République démocratique du Congo ; 2000, Gulu, Uganda ; 2007, Bundibugyo, Ouganda). Cette étude a montré une diminution des IgM à partir du jour 80, tandis que les IgG persistaient encore jusqu'au jour 117 (MacNeil et al., 2011). Du fait de la persistance des anticorps IgG pendant plusieurs années chez les survivants des maladies causées par les virus Ebola, la sérologie constitue un outil important pour les études de prévalence dans la population (Rimoin et al., 2018; Mulangu et al., 2016, 2018).

3.4.3 Autres méthodes sérologiques

Le test de radioimmunoprécipitation (RIPA) et le Western Blot (dosage immunologique de protéines virales séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide) mesurent les réponses des anticorps aux protéines virales mais de manière légèrement différente aux autres méthodes précitées car ils permettent de montrer la spécificité moléculaire de la réponse

immunitaire (Leroy et al., 2000; Ksiazek et al., 1999; MacNeil et al., 2011), mais ne sont pas pratiques pour être utilisés dans les études à l'échelle épidémiologique. En 2016, Ahidjo et collaborateurs ont mis au point un test sérologique sensible et spécifique basé sur la technologie Luminex à partir des échantillons prélevés chez des survivants de l'épidémie de la maladie à virus Ebola de 2014-2016, en Guinée (Ayouba et al., 2017). Neuf protéines recombinantes ont été utilisées représentant les différentes régions virales (NP, GP, VP40) de quatre des cinq espèces du genre *Ebolavirus*. Pour la détection des anticorps du virus Ebola, la sensibilité et la spécificité de ce test étaient de 95,7 % et 99,1 % respectivement pour les protéines virales (NP, GP). Ce test a été adapté pour être utilisé dans les études de prévalence des anticorps du virus Ebola dans la faune sauvage (primates non-humains et chauve-souris) (Nys et al., 2018; Ayouba et al., 2019). Et récemment, Diallo et collaborateurs ont utilisé ce test pour déterminer la prévalence de l'infection chez les personnes contacts pauci-symptomatiques et asymptomatiques exposées au virus Ebola en Guinée (Diallo et al., 2019).

3.5 Immunohistochimie

C'est une technique de diagnostic mise au point par le CDC et appliquée sur des échantillons de biopsie fixés au formol. Elle a été utilisée en 1995 pour confirmer l'épidémie de la maladie à virus Ebola à Kikwit, en RDC (Zaki et al., 1999). Elle a l'avantage d'être sécurisant pour le technicien car une fois fixé au formol l'échantillon n'est plus infectieux, mais c'est une technique qui prend beaucoup de temps et difficile à appliquer pour le diagnostic sur terrain en situation d'épidémie.

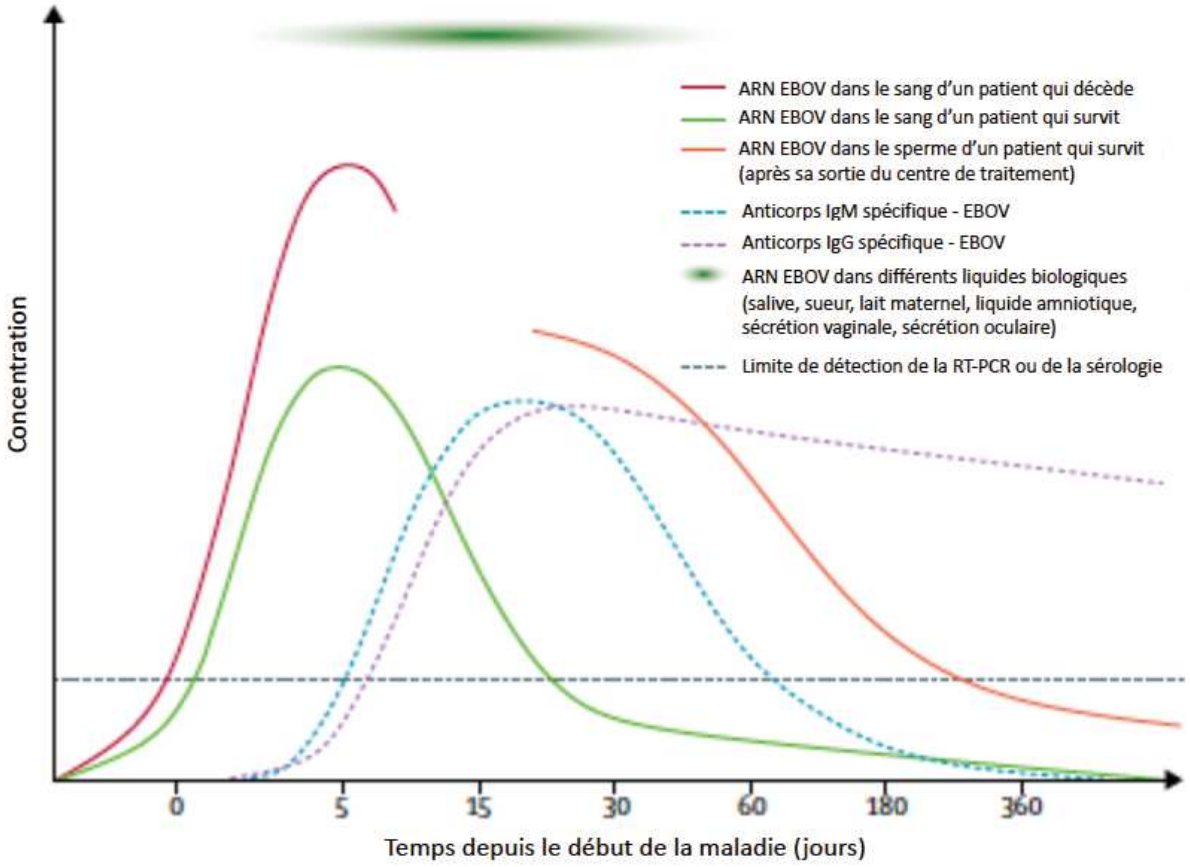


Figure 9. Evolution de l'ARN et des anticorps spécifiques du virus Ebola (adapté de Malvy et al.) (Malvy et al., 2019)

Chapitre 4. Prise en charge

4.1 Mesures générales de prévention

Il existe des mesures de prévention générale pour toute personne séjournant dans une zone affectée par la maladie à virus Ebola, notamment :

- Eviter tout contact direct avec le sang et les fluides corporels (tels que l'urine, les matières fécales, salive, la sueur, les vomissures, le lait maternel, le sperme et les sécrétions vaginales) d'une personne infectée ;
- Eviter tout contact direct avec les objets souillés par le sang ou les liquides corporels d'une personne infectée (tels que les vêtements, la literie, les aiguilles et le matériel médical) ; ou pendant les rituels funéraires, le contact direct avec le corps d'une personne décédée des suites de la maladie à virus Ebola ;
- Eviter tout contact direct avec les animaux morts trouvés en forêt, les chauves-souris ou les primates non-humains, ou encore de la viande crue préparée à partir de ces animaux ;
- Eviter tout contact direct avec le sperme d'une personne infectée ou guérie de la maladie à virus Ebola jusqu'à ce que les résultats montrent que le virus n'est plus détecté dans le sperme.

4.2 Vaccination

En plus des mesures générales de prévention, il existe actuellement des candidats vaccins qui sont utilisés de manière expérimentale dont certains, d'après des études préliminaires, ont démontré une certaine efficacité dans la protection des populations contre la maladie à virus Ebola. Parmi ces candidats vaccins, nous pouvons citer :

4.2.1 rVSV-ZEBOV (Merck & Co, USA)

C'est un vaccin expérimental contre le virus Ebola qui consiste en une forme recombinante atténuée du virus de la stomatite vésiculaire, un rhabdovirus, exprimant la glycoprotéine GP du virus Ebola. L'injection de ce vaccin stimule une réponse immunitaire dirigée contre la glycoprotéine (GP) du virus Ebola et procure donc une protection contre ce dernier. Un essai

clinique de phase 1 réalisé en Europe (Genève en Suisse et Hamburg en Allemagne) et en Afrique (Lambaréné au Gabon et Kilifi au Kenya) a montré que ce vaccin était immunogène après une seule injection, mais également réactogène avec 90 % de participants rapportant au moins un effet indésirable. Les effets indésirables les plus fréquents étaient de la fièvre chez environ 35% des participants, et particulièrement à Genève, les douleurs articulaires chez 22 % des participants (Agnandji et al., 2015). Ce vaccin a été également évalué lors de la dernière épidémie en Guinée entre Mars 2015 et Janvier 2016 au cours d'un essai clinique de phase 3 en utilisant un protocole basé sur la vaccination en ceinture qui consiste à vacciner les contacts directs (contacts à haut risque) de patients confirmés infectés par le virus Ebola et les contacts des contacts à haut risque. Au cours de cette étude, l'efficacité de ce vaccin était estimé à 100 % et les effets indésirables les plus rapportés étaient les maux de tête (25,4%), la fatigue (18,9%) et les douleurs musculaires (13,1%) (Henao-Restrepo et al., 2017).

En RDC, ce vaccin a été utilisé pour la première fois lors de l'épidémie de Bikoro dans la province de l'Equateur en 2018 et a été ensuite adopté comme l'une des stratégies importantes de riposte à l'épidémie actuelle dans les provinces du Nord Kivu et Ituri. Des études préliminaires ont montré des résultats satisfaisants, notamment : un taux d'attaque de la maladie à virus Ebola chez les personnes vaccinées estimé à 0,017% contre 0,656% chez les personnes non vaccinées et aucun décès parmi les personnes chez lesquelles l'apparition de la maladie s'est déclarée dix jours après leur vaccination (donc personnes supposées avoir développé une réponse immunitaire grâce à la vaccination), d'où une létalité égale à 0 avec une efficacité vaccinale estimée à 100% (WHO, 2019). En outre, une autre étude a pu montrer que la mise en place précoce du programme de vaccination pendant cette récente épidémie a permis de réduire jusqu'à environ 70 % le risque de propagation de la maladie dans la région (Wells et al., 2019).

4.2.2 chAd3-EBO-Z / cAd3-EBO (GlaxoSmithKline, UK) avec ou sans MVA-BN-Filo (Bavarian Nordic, Denmark)

Ce vaccin se présente sous deux formes dont l'un est composé d'un vecteur adénovirus de type-3 du chimpanzé recombinant monovalent exprimant la glycoprotéine (GP) de type sauvage du virus Ebola (ChAd3-EBO-Z), et l'autre est composé d'un adénovirus bivalent recombinant de type-3 exprimant la glycoprotéine (GP) de type sauvage du virus Ebola et / ou

du virus Sudan (cAd3-EBO). Les données des essais clinique de phase 1 réalisés sur 20 participants ont révélé une immunité aiguë contre le virus Ebola après une seule dose et une immunité durable après une primovaccination-rappel avec le vaccin MVA-BN-Filo. Aucun effet indésirable majeur n'a été noté au cours de cette phase quoique deux participants aient présenté de la fièvre et trois ont présenté une neutropénie ou une leucopénie asymptomatique transitoire (Ledgerwood et al., 2014). Deux autres essais cliniques de phase 1 ont été réalisés, l'un au Royaume-Uni et Sénégal entre Mai et Novembre 2015, et l'autre aux Etats-Unis et au Mali entre Octobre 2014 et Février 2015, montrant également que le vaccin était immunogène sans effet indésirable majeur. L'immunité persistait un peu plus longtemps chez les participants qui recevaient une primovaccination-rappel avec le MVA-BN-Filo (Tapia et al., 2016; Venkatraman et al., 2019). Les vaccins ChAd3-EBO-Z et rVSV-ZEBOV ont été évalués en parallèle dans le cadre du projet PREVAIL I au Libéria (PREVAIL I). Les données obtenues ont confirmé que les deux vaccins étaient immunogènes jusqu'à 12 mois et ne présentaient aucun effet indésirable majeur (Kennedy et al., 2017).

4.2.3 Ad26.ZEBOV + MVA-BN-Filo (Johnson & Johnson, USA and Bavarian Nordic, Denmark)

C'est un vaccin qui utilise comme vecteur un adénovirus humain de type 26 et est évalué en essai clinique phase 1 selon la stratégie de primovaccination-rappel avec le vaccin MVA-BN-Filo exprimant la glycoprotéine du virus Ebola, du virus Soudan et du virus Marburg, et la nucléoprotéine du virus Tai Forest (Tapia et al., 2016). Un essai clinique de phase 1 a été réalisé et la vaccination avec Ad26.ZEBOV boosté par MVA-BN-Filo n'a entraîné aucun événement indésirable grave. Une réponse immunitaire a été observée après la première immunisation avec Ad26.ZEBOV; et le rappel avec MVA-BN-Filo a entraîné une élévation persistante de l'immunité spécifique (Malvy et al., 2019; Wang et al., 2017; Milligan et al., 2016).

4.2.4 Autres vaccins

Les vaccins Russe et Chinois sont élaborés à partir de la souche du virus Ebola (variant « Makona ») responsable de l'épidémie de 2013-2016 en Afrique de l'Ouest. Les vaccins Russes utilisent comme vecteur le rVSV et l'Ad5 exprimant la glycoprotéine du virus Ebola variant Makona. Le vaccin chinois est lyophilisé et utilise le vecteur Ad5 exprimant la glycoprotéine du

virus Ebola variant Makona. Ce dernier a été approuvé pour une utilisation en situation d'urgence après les essais cliniques de phase 1 réalisé en Chine et de phase 2 réalisé en Sierra Leone ayant montré que le vaccin était très immunogène surtout lorsqu'un rappel était réalisé quelques mois après la première dose ; et aucun événement indésirable majeur n'avait été enregistré (Zhu et al., 2017; Li et al., 2017). D'autres candidats vaccins utilisant d'autres types de vecteurs sont certainement en étude ou en évaluation au cours des essais cliniques, mais dont les résultats ne sont pas encore disponible (Malvy et al., 2019; Wang et al., 2017).

4.3 Traitement

A ce jour, aucune molécule n'est approuvée pour un traitement spécifique de la maladie à virus Ebola. Le traitement est symptomatique en fonction des signes cliniques que présente le patient. La prise en charge clinique repose sur l'administration des antipyrétiques, des antalgiques, des antiémétiques, de l'oxygénothérapie, de la réhydratation orale ou intraveineuse, des anti-malaria et autres médicaments pour le traitement d'autres infections concomitantes possibles (Malvy et al., 2019).

Plusieurs thérapies ont été expérimentées pendant l'épidémie de 2014-2016 en Afrique de l'Ouest, telles que : le Favipiravir, le TKM-130803, le plasma des convalescents, et le traitement basé sur les anticorps monoclonaux comme ZMapp. Parmi ces thérapies, seul le ZMapp a pu donner des résultats prometteurs bien que l'essai clinique ait été interrompu à cause de la fin de l'épidémie (Malvy et al., 2019; The PREVAIL II Writing Group, 2015). Des essais cliniques randomisés sont actuellement en cours en RDC dans les sites affectés par la maladie à virus Ebola pour déterminer l'efficacité des différentes molécules face au virus Ebola. Ces études incluent quatre molécules dont 1 antiviral (Remdesivir) et 3 anticorps monoclonaux (Mab114, ZMapp et Regeneron).

Tableau 4. Caractéristiques des molécules thérapeutiques utilisées au cours des essais cliniques au Nord-Kivu, RDC, 2018.

Médicament	Sponsor	Composition et mécanisme d'action	Production	Administration	Efficacité chez les primates non humains	Essai clinique, données de sécurité	Références
mAb114 (VRC-EBOMAB092-00-AB)	Vaccine Research Center, NIAID, NIH (USA)	Anticorps monoclonal neutralisant de type IgG1 humain ciblant la GP du virus Ebola, isolé à partir d'un survivant "Kikwit 1995"	Cellules CHO	Une perfusion (J0) Durée 1 heure Surveillance de signes vitaux chaque 15 minutes	Efficacité 100% avec une seule infusion	Etude de phase1 : réalisée aux USA avec 13 volontaires inclus (données non publiées)	mAb114 investigator 's brochure
Zmapp	LeafBio, inc. (USA)	Cocktail de trois anticorps monoclonaux chimériques humains/murins (c13C6-FR1, c2G4 et c4G7; IgG1, isotype kappa) dirigés contre la GP du virus Ebola	Tabac transgénique	Trois perfusions (J0, J3, J6) Durée 4-5 heures Surveillance de signes vitaux chaque 15 minutes durant les deux premières heures, augmentation progressive du debit	Efficacité 100% si le traitement débute 3, 4 ou 5 après l'infection	71 patients enrolés en Guinée, Liberia, Sierra Leone et USA (PREVAIL II) Mortalité de 37% (13/35) dans le bras standard vs 22% (8/36) dans le bras Zmapp mais non statistiquement significatif. 7/8 décès du groupe Zmapp n'avaient reçu qu'une seule dose sur le trois prévu durant la perfusion, 14% fièvre, 11% hypotension	ZMAPP TM Investigator 's brochure
REGN3470-3471-3479 (REGENERON)	Regeneron Pharmaceuticals , inc. (USA)	Cocktail de trois anticorps monoclonaux IgG1 humains (REGN3470, REGN3471 et REGN3479) ciblant chacun un épitope différent de la GP du virus Ebola	Cellules CHO	Une perfusion (J0) Durée 2 heures Surveillance de signes vitaux chaque 15 minutes	Efficacité 88% avec une seule infusion de 150 mg/kg au J-5 post-infection	Etude de phase1 : sans effets secondaires majeurs chez 24 volontaires sains. Céphalés (33%), myalgies (11%)	REGN3470-3471-3479 Investigator 's brochure
GS-5734 (Remdesivir)	Gilead Sciences, inc. (USA)	Médicament antiviral contre EBOV Analogue de l'adénosine triphosphate inhibe les ARN polymérases virales	Synthèse chimique	Une perfusion par jour pendant 10 jours Durée 1 heure Surveillance hépatique et rénale	Efficacité 100% avec un traitement débuté au J3 post-infection en raison d'une infusion IV par jour pendant 12 jours	Etude de phase1 : sans effets secondaires majeurs chez 60 volontaires sains Elévation ALT/AST de grade 1 ou 2	Gilead Investigator 's brochure

Chapitre 5. Écologie et réservoir des virus Ebola

En analysant la distribution des épidémies causées par la maladie à virus Ebola dans le monde, nous remarquons que les pays les plus touchés sont : la République Démocratique du Congo (RDC), la République du Congo (RC), le Gabon, le Soudan, l'Ouganda, la Guinée, le Libéria et la Sierra Leone (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019). Ce qui nous pousse à penser que le réservoir pourrait certainement se trouver dans la forêt tropicale en Afrique Centrale et/ou en Afrique de l'Ouest. L'augmentation de la fréquence de ces épidémies au fil des années est probablement le résultat des perturbations écologiques causées par entre autres l'expansion démographique des populations locales associée aux activités, telles que l'agriculture, la déforestation, la chasse, les conflits tribaux ou militaires et d'autres changements affectant les écosystèmes (installation de barrages, redressement des rivières, etc.). Ces activités auraient permis aux populations humaines d'influer directement sur les organismes ou autres formes de vie hébergeant ces virus et augmentant aussi la probabilité de contacts entre les espèces qui auparavant n'avaient pas de contact entre-elles (Georges et al., 1999; Kuhn, 2008). Malgré près de quatre décennies de recherche, les réservoirs naturels des virus Ebola demeurent encore inconnus. La fréquence des épidémies montre l'importance de mieux connaître le réservoir animal, les modes de transmission de ce virus à l'homme et les facteurs socio-économiques associés à l'éclosion de ces épidémies.

5.1 Role des Primates non-humains, céphalophes et autres viandes de brousse

Depuis la première apparition du virus Marburg en Allemagne en 1967 à partir de singes verts, on pensait qu'un primate non humain était le principal hôte des filovirus (Gordon Smith et al., 1967; Kissling et al., 1968; Kuhn, 2008). Si tel était le cas, les primates devraient probablement supporter la réplication du virus sans développer des manifestations cliniques graves, sinon aucune. Cependant, des études ont montré que, dans la nature, les primates non humains, en particulier les grands singes, succombent aux infections à filovirus aussi rapidement que ceux infectés expérimentalement (Lahm et al., 2007; Leroy et al., 2004; Bermejo et al., 2006; Geisbert et al., 2003), donc difficile de présumer que ces espèces pourraient servir comme réservoirs aux filovirus. D'un autre côté, on ne peut ignorer leur implication dans les épidémies causées par les virus Ebola.

Le Reston virus a été importé à Reston (Virginie) et à Philadelphie (Pennsylvanie), aux États-Unis, et à Sienne (Italie) en 1989-1990 et 1992, respectivement, via des macaques infectés provenant des Philippines (Jahrling et al., 1990; World Health Organization, 1990; Curtis et al., 1992). La seule infection à Taï Forest virus enregistrée s'est produite en 1994 en Côte d'Ivoire lors de la nécropsie d'un chimpanzé mort pour essayer de comprendre la mortalité élevée observée chez les chimpanzés (B. Le Guenno et al., 1995; Formenty et al., 1999). La diminution de la population des chimpanzés et gorilles dans la forêt de Minkébé au Gabon étaient apparemment associée aux trois épidémies de virus Ebola survenues entre 1994 et 1996 au Gabon (Huijbregts et al., 2003). Des gorilles et des chimpanzés morts avaient été rapportés par les habitants des localités de Minkouka un peu avant la première épidémie survenue à Andok, Minkébé et Mékouka en Décembre 1994 (Georges-Courbot, 1997; Georges-Courbot et al., 1999). Tous les cas primaires de la deuxième épidémie au village Mayibout 2 en Février 1996 étaient certainement infectés pendant le dépeçage des chimpanzés morts (Georges-Courbot, 1997; Georges-Courbot et al., 1999). Les investigations menées au cours de la troisième épidémie survenue à Boué en Octobre 1996 ont révélé que le cas index était un chasseur habitant un campement dans la forêt de Boué. Au cours de la même période, un chimpanzé mort infecté par le virus Ebola avait été retrouvé tout près de Boué (Georges-Courbot 1997; Georges-Courbot et al. 1999). La manipulation des carcasses de gorilles, de chimpanzés et des céphalophes était associée aux épidémies du virus Ebola survenues dans les zones forestières du Gabon et du Congo (Brazzaville) entre Octobre 2001 et Juillet 2002 (Rouquet et al., 2005; The international outbreak response team, 2003). Environ 98 carcasses avaient été retrouvées dont 21 analysées et parmi lesquels, 10 gorilles, 3 chimpanzés et 1 céphalophe étaient positifs au virus Ebola (Rouquet et al., 2005). Ces différentes épidémies survenues au Gabon et au Congo (Brazzaville) entre 1994 et 2003 ont été associées à une diminution importante de la population des gorilles et des chimpanzés dans les régions affectées (Bermejo et al., 2006; Leroy et al., 2004; Rouquet et al., 2005; Lahm et al., 2007).

Le cas index de l'épidémie du virus Sudan en 2004 à Yambio au Soudan, a probablement été infecté au cours de la manipulation d'un babouin infecté (World Health Organization, 2005). Enfin, les cas index des épidémies de la maladie à virus Ebola de 2014 à Boende et de 2017 à Likati, en RD Congo, auraient été infectés par la viande de brousse (espèce animale non précisée). Ces exemples prouvent combien la viande de brousse, notamment celle des

primates non humains, céphalophes et autres animaux chassés ou retrouvés morts en forêt, est impliquée dans les épidémies de la maladie à virus Ebola. Même si ces animaux ne peuvent pas être considérés comme des réservoirs des virus Ebola, ils jouent un rôle important dans la transmission de la maladie et il est important de comprendre comment ces animaux se contaminent. Par exemple, les céphalophes consomment des plantes vivantes et peuvent s'infecter en consommant les fruits souillés par la salive ou les urines d'un autre animal infecté ; les primates peuvent eux aussi s'infecter en consommant des fruits souillés ; et certains d'entre eux, en particulier les chimpanzés, peuvent chasser et manger occasionnellement les céphalophes, d'autres petits singes ou même des chauve-souris. Cependant, nous ne savons pas jusqu'à présent comment ces animaux retrouvés morts au Gabon et au Congo (Brazzaville) ont été infectés, ni comment le virus Reston a été introduit dans la population des macaques cynomolgus aux Philippines. Plusieurs questions demeurent sans réponse et nécessitent des recherches plus approfondies.

5.2 Role de Chauve-souris

Les chauve-souris sont des réservoirs de certains virus de la famille des paramyxovirus (Henipavirus), rhabdovirus (virus de la rage, Lyssavirus de la chauve-souris australienne) et autres filovirus (virus Marburg) génétiquement proches du virus Ebola ; ainsi elles constituent des candidats potentiels pour la recherche du réservoir des virus Ebola (Kuhn, 2008; Swanepoel et al., 2007; Amman et al., 2012; Towner et al. 2009). Lors de la première épidémie causée par le virus Sudan en 1976, le cas index dans la région de Maridi travaillait dans une usine de cotons infestée de chauve-souris (WHO/International Study Team, 1978). Les études écologiques réalisées dans la ville de Kikwit pendant l'épidémie de la maladie à virus Ebola de 1995 ont révélé la présence d'importantes migrations des chauve-souris dans la région (Kuhn, 2008).

En 1996, Swanepoel et collaborateurs ont réalisé des inoculations expérimentales du virus Ebola isolé à Kikwit sur 24 différentes espèces de plantes et 19 espèces d'animaux (Swanepoel et al., 1996). Seules les chauves-souris, dont deux insectivores (*Mops condylurus* et *Chaerephon pumila*) et un frugivore (*Epomophorus wahlbergi*), ont pu maintenir la réplication et la circulation du virus à des titres élevés sans nécessairement développer la maladie (Swanepoel et al., 1996). Le virus Ebola avait également été isolé dans les fèces d'une chauve-

souris frugivore 21 jours après l'inoculation (Swanepoel et al., 1996).

En 2005, des fragments de l'ARN du virus Ebola ont été détecté dans le foie et la rate des trois espèces de chauve-souris frugivores (*Epomops franqueti*, *Hypsignathus monstrosus* et *Myonycteris torquata*) capturées au Gabon (Leroy et al., 2005). Les immunoglobulines (IgG) spécifiques du virus Ebola avaient été également détectées dans les mêmes populations de chauve-souris. Cependant, aucune chauve-souris ne possédait en même temps les anticorps IgG et les fragments du génome viral (Leroy et al., 2005).

En 2007 et 2008, les deux épidémies successives causées par le virus Ebola à Mweka et Luebo, dans la province du Kasaï-Occidental, en RD Congo, semblaient être liées à la migration des chauves-souris bien que la source exacte n'ait jamais été identifiée (Leroy et al., 2009).

Entre 2014 et 2016, lors de l'épidémie de la maladie à virus Ebola en Afrique de l'Ouest qui a touché trois pays (Guinée, Libéria et Sierra Leone) avec plus de 28 000 cas confirmés et plus de 11 000 décès, il a été rapporté que le cas index était un petit garçon, âgé de 2 ans résidant en Guinée, qui aurait manipulé une chauve-souris infectée (Mari Saez et al., 2015). Cependant, l'origine de cette épidémie n'est pas connue avec certitude. En 2018, le génome complet du Bombali virus, une nouvelle espèce de virus Ebola, a été détecté chez des chauve-souris insectivores (*Chaerephon pumilus* et *Mops condylurus*) retrouvées dans certaines habitations dans le district de Bombali, en Sierra Leone (Goldstein et al., 2018). Il n'y a aucune information sur la pathogénicité de ce virus chez les humains, quoique cette étude ait démontré que la glycoprotéine virale pouvait induire l'entrée du virus dans les cellules humaines (Goldstein et al., 2018). En 2019, Forbes et collaborateurs ont identifiés le virus Bombali dans les organes et les fèces d'une chauve-souris insectivore (*Mops condylurus*) au Kenya (Forbes et al., 2019). L'analyse du génome complet a montré une similarité de 98% avec le virus isolé en Sierra Leone (Forbes et al., 2019).

Récemment en Janvier 2019, le gouvernement Libérien, en collaboration avec le Center of Infection and Immunity (CII) de l'Université de Columbia Mailman School of Public Health et EcoHealth Alliance, a annoncé la découverte du virus Ebola chez une chauve-souris insectivore (*Mineopterus inflatus*) au Libéria, mais les analyses complémentaires sont en cours (Columbia University's Mailman School of Public Health, 2019). Cette découverte associée aux évidences précédentes renforce l'idée selon laquelle les chauves-souris seraient des réservoirs potentiels du virus Ebola. Cependant, tant que la forme infectieuse n'est pas isolée et tant qu'on n'aura

pas prouvé de manière expérimentale la persistante de l'infection chez les chauves-souris en l'absence de maladie, avec élimination efficace du virus et transmission ultérieure à d'autres animaux, le rôle des chauves-souris dans la transmission du virus Ebola ne sera pas résolu.

5.3 Role d'autres espèces

Etant donné que d'autres virus responsables des fièvres hémorragiques peuvent être transmis par des rongeurs (virus de Lassa, virus Hantaan), des moustiques (virus de la fièvre jaune, virus de la dengue, virus de la fièvre de la vallée du Rift) ou des tiques (virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo), il était judicieux d'explorer également d'autres pistes dans la recherche du réservoir des virus Ebola (Kuhn, 2008). Ainsi, hormis les primates non humains et les chauve-souris, plusieurs autres espèces ont été également testées à la recherche du réservoir du virus Ebola, tels que : des rongeurs, des oiseaux, des reptiles et même des insectes. En 1976, lors de la première épidémie de la maladie à virus Ebola, diverses espèces avaient été testées, notamment : 8 chauve-souris, 5 primates non humains, 2 antilopes, 118 rongeurs, 1 lézard, 818 punaises et 18 moustiques. Les analyses de laboratoire pour la recherche du virus Ebola ou de ses anticorps étaient négatives (Germain M, 1978). Entre 1979 et 1980, des échantillons ont été prélevés chez 1664 animaux capturés au Cameroun (186) et en RD Congo (1478). En RD Congo, les animaux ont été capturés aux alentours de la zone des premières épidémies (Bumba, Lisala et Gemena dans la province de l'Equateur) et au Cameroun, dans la région de l'Est précisément autour des villages des pygmées dans la commune de Moloundou (Kuhn, 2008). Toutes les tentatives soit d'isolement du virus à l'aide des cellules Vero E6 soit de détection des anticorps par les tests radio immunologiques étaient sans succès (Kuhn, 2008). Entre Juin et Août 1995, juste après la déclaration de la fin de l'épidémie de Kikwit, une importante étude écologique a été réalisée où au total 3066 animaux avaient été prélevés parmi lesquels il y avait 2663 mammifères (de 78 espèces différentes), 265 oiseaux et 129 reptiles et amphibiens. Certes, des nouveaux virus ont été isolés sur certains de ces échantillons, mais aucun filovirus n'avait été détecté (Leirs et al., 1999). Au cours de la même période, plus de 27 000 arthropodes avaient été testés toujours à la recherche des virus Ebola, sans succès (Reiter et al., 1999).

En République Centrafricaine, 242 rongeurs et musaraignes avaient été capturés au cours d'une étude écologique réalisée en 1999. Des produits PCR des gènes de la polymérase et de

la glycoprotéine avaient été détectées par la RT-PCR à partir des extraits d'organes de sept animaux. Il s'agissait essentiellement de deux genres de rongeurs (4 *Mus setulosus* et 2 *Praomys sp*) et une espèce de musaraigne insectivore (*Sylvisorex ollula*). Bien que le virus n'ait pas été isolé de ces échantillons, le séquençage des amplicons a permis d'identifier le virus Ebola sous-type Gabon (J.M. Morvan et al., 1999). Cependant, pour une telle découverte importante, les séquences ne sont pas disponibles dans la GenBank pour vérifier et les auteurs n'ont pas répondu sur la demande de les partager. En 1997, plus de 2000 arthropodes de plus de 200 espèces différentes avaient été collectés au Parc National Taï Forest en Côte d'Ivoire puis testés par RT-PCR à la recherche des filovirus. Tous les résultats étaient négatifs (Kuhn, 2008).

En bref, le réservoir des virus Ebola demeure encore inconnu malgré les différentes études réalisées incluant plusieurs espèces de vertébrés, invertébrées et des plantes, principalement dans les régions touchées par les épidémies à virus Ebola. Lors des épidémies au Gabon et au Congo (Brazzaville) entre 2001 et 2003, le virus Ebola a été détecté dans une carcasse de gorille dépecée par l'un des cas index. A ce jour, c'est le seul cas où il a été possible de démontrer la présence du virus Ebola dans l'animal incriminé (WHO, 2003). Bien que les primates joueraient un rôle important dans la transmission de la maladie à virus Ebola, en particulier les grands singes ne peuvent pas être considérées comme des réservoirs du virus Ebola car des taux de mortalité élevés observés dans leurs populations excluent une chaîne d'infection indéfinie. Ainsi, depuis quelques années, les chercheurs ont orienté leur attention vers les chauves-souris que certains tendent à considérer déjà comme réservoirs des virus Ebola. Plusieurs arguments plaident en faveur de ces espèces, notamment : (i) une réplication virale réussie après une inoculation expérimentale sans développer la maladie (Swanepoel, 1996), (ii) la détection des fragments du génome viral dans les organes de certaines espèces apparemment asymptomatiques (Leroy et al., 2005), (iii) la détection des anticorps spécifiques du virus Ebola dans certaines espèces (Pourrut et al., 2007; Pourrut et al., 2009; Hayman et al., 2010; Olival et al., 2013; Yuan et al., 2012; Hayman et al., 2012), (iv) réservoir du virus Marburg, un autre filovirus génétiquement proche des virus Ebola (Towner et al., 2007; Towner et al., 2009), et (v) elles sont incriminées comme source de contamination des cas index lors de plusieurs épidémies de la maladie à virus Ebola, bien que cela n'ait jamais été réellement prouvé (Leroy et al., 2009; Mari Saez et al., 2015). Cependant, les chauve-souris ne sont probablement pas

les seules espèces impliquées et l'écologie des virus Ebola demeure encore très complexe. Il est donc important de continuer à identifier les espèces impliquées dans la transmission de ces virus ainsi que les conditions environnementales favorisant les passages inter-espèces de ces virus. En outre, les données des études sérologiques sur les différentes espèces peuvent être très utiles pour une meilleure identification des zones d'investigation.

Travaux de Thèse

Contexte et Objectifs de la thèse

La République Démocratique du Congo (RDC) est un pays vaste avec une superficie de 2.345 millions de km^2 et presque la moitié du territoire nationale couvert par la forêt tropicale soit environ 125 millions d'hectare représentant 47% du massif forestier tropical du continent Africain(https://fr.wikipedia.org/wiki/G%C3%A9ographie_de_la_r%C3%A9publique_d%C3%A9mocratique_du_Congo). Depuis plus de 40 ans, la RDC est en proie aux épidémies des maladies zoonotiques, notamment avec l'identification du premier cas humain de monkeypox (appelé aussi la variole de singe) en 1970 à Basankusu (Ziegler and Kima, 1972) et la première épidémie de la maladie à virus Ebola six ans plus tard à Yambuku (World Health Organization, 1978), toujours dans l'ancienne province de l'Equateur (actuellement, province de l'Equateur et province de la Mongala, respectivement). Ces maladies, particulièrement celles causées par les virus Ebola, sont responsables des épidémies sporadiques qui auparavant affectaient surtout les zones rurales isolées et naturellement enclavées (par la forêt, des grandes rivières et des routes en mauvais état), ce qui permettait déjà de limiter la propagation de la maladie, ensuite les mesures de riposte mises en place permettaient de contrôler très rapidement ces épidémies. C'est le cas des épidémies survenues à Yambuku (1976), Luebo (2007), Mweka (2008), Boende (2014), Likati (2017) et Bikoro (2018), des zones forestières et/ou très reculées avec des populations très pauvres.

En plus, auparavant les intervalles entre les épidémies étaient assez importants, plus de dix ans entre Yambuku (1976) et Kikwit (1995) ; et entre Kikwit (1995) et Mweka (2007). Cependant, depuis quelques années, les épidémies de la maladie à virus Ebola semblent de plus en plus rapprochées avec une nouvelle flambée entre un et quatre ans, notamment : Mweka (2007), Luebo (2008), Isiro (2012), Boende (2014), Likati (2017) ; et récemment la survenue de deux épidémies successives, dans les provinces de l'Equateur, du Nord-Kivu et Ituri, au cours de la même année en 2018. En outre, ces récentes flambées touchent les zones semi-urbaines et urbaines très denses avec de mouvements intenses des populations des zones affectées vers les zones non affectées occasionnant une propagation importante de la maladie. C'est le cas de l'épidémie en Afrique de l'Ouest (2014-2016), qui a touché plus de 28000 personnes dans trois pays différents, et de celle qui est en cours actuellement en RDC où plus de 2000 personnes sont déjà affectées, avec des cas diagnostiqués récemment en

Ouganda, dans la région frontalière avec la RDC (WHO Ebolasitrep_2016 ; WHO, Ebola Virus Disease-Republic of Uganda, 13 June 2019).

L'augmentation de la fréquence de cette maladie, particulièrement en RDC, est probablement liée aux perturbations causées par l'homme sur le milieu écologique des potentiels réservoirs de ces virus, notamment : par l'agriculture, la construction des habitations dans les zones forestières, la déforestation, l'exploitation du bois, l'exploitation des minerais, la chasse, les conflits militaires, l'installation de barrages, le redressement des rivières, etc. ; augmentant la probabilité de contacts entre les espèces qui auparavant n'avaient pas de contact entre-elles et favorisant ainsi le passage de ces virus d'une espèce à une autre.

Bien qu'il y ait des avancées scientifiques considérables, plus de 40 ans après la première identification du virus Ebola, son réservoir demeure encore inconnu. Le rôle des chauve-souris en tant que réservoirs n'est pas encore élucidé, et il y a aussi des zones d'ombres qui persistent quant au rôle des autres espèces animales comme hôte intermédiaire ou amplificateur. Plusieurs questions demeurent encore sans réponse : est-ce que le réservoir du virus Ebola consiste en un nombre limité ou plusieurs espèces de chauve-souris, sachant que l'ARN du virus Ebola a été retrouvé dans le foie et la rate de trois différentes espèces de chauves-souris ? Quelles sont les espèces impliquées dans la transmission du virus Ebola ? Comment le virus se maintient-il dans ces espèces et entre espèces de chauves-souris, et comment se transmet-il aux autres animaux ? Quels sont les autres animaux impliqués dans la transmission du virus ? Et, où le virus circule-t-il pendant les périodes inter-épidémiques ? Certaines de ces questions font l'objet de notre présent travail.

Durant les trois années de notre travail de thèse, la RDC a connu trois épidémies successives de la maladie à virus Ebola dont Likati (Mai – Juillet 2017), Bikoro (Mai – Juillet 2018), Nord-Kivu et Ituri (Août 2018 et toujours en cours). Nous avons été activement impliqués dans les investigations écologiques focalisées aux zones affectées par ces récentes épidémies, à la recherche du réservoir du virus Ebola dans la faune sauvage ; mais aussi, nous avons mis à contribution notre expertise dans le diagnostic de la maladie dans la population humaine, l'installation et la supervision des laboratoires de terrain, et dans la formation du personnel de laboratoire local des zones affectées, durant ces récentes flambées. Avant ces épidémies, nous avions déjà commencé à travailler sur le réservoir animal avec des études prospectives

sur les chauves-souris et rétrospectives chez les primates non humains afin de comprendre où circule le virus entre les épidémies.

Nous avons pu, grâce à notre travail pendant les épidémies chez l'Homme, apporter des réponses concrètes aux problèmes de santé publique. Par exemple, grâce la confirmation et la caractérisation de l'espèce virale responsable de l'épidémie de la maladie à virus Ebola en 2018 dans les provinces de l'Equateur et du Nord Kivu, la communauté internationale et le ministère de la santé de la RDC pouvaient, avec confiance, utiliser les outils de diagnostic et le candidat vaccin rVSV-ZEBOV utilisés en Afrique de l'Ouest, puisqu'il s'agit du virus Ebola aussi. Grâce à notre travail, nous avons démontré qu'il était possible d'évaluer continuellement les contre-mesures médicales (outils de diagnostic, vaccins, traitements expérimentaux) en fonction des variations observées dans le génome viral. Grace à notre travail, nous avons démontré que le séquençage, comme c'était le cas en Afrique de l'Ouest, pouvait aider à identifier de façon précise les chaines de transmission. Ce qui s'avère très utile surtout dans le contexte de l'épidémie actuelle où les violences et l'insécurité entravent le bon déroulement de la surveillance épidémiologique, résultant à un grand nombre de cas confirmés sans lien épidémiologique établi.

Ces événements ont influés sur le déroulement de notre travail de thèse dont l'objectif principal est de caractériser le virus Ebola à l'interface homme - animal sauvage et la recherche du réservoir du virus Ebola dans la faune sauvage en RDC. Ainsi, sur base de différents apports, nous avons subdivisé notre travail de thèse en deux volets, notamment : un volet sur la faune sauvage et un autre sur la population humaine.

Première partie : Comprendre le réservoir animal des virus Ebola

Les objectifs spécifiques du volet sur la faune sauvage sont :

1. Déterminer dans quelle mesure le virus Ebola circule chez les chauves-souris et les primates non-humains en RDC entre les épidémies
2. Comprendre et identifier le réservoir animal du virus Ebola en RDC en période d'épidémie

Deuxième partie : Caractériser les virus Ebola chez l'homme pendant les épidémies

Les objectifs spécifiques du volet sur la population humaine sont :

1. Caractériser les virus responsables de ces épidémies
2. Evaluer l'impact des mutations du génome viral sur les stratégies de riposte mises en place (outils de diagnostic, vaccination et traitements expérimentaux)
3. Assister la surveillance épidémiologique par l'identification moléculaire des chaines de transmission de la maladie

Travaux de Thèse

Première Partie :

Comprendre le réservoir animal des virus Ebola

Chapitre 1. Survey of Ebola Viruses in Frugivorous and Insectivorous Bats in Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 24, No. 12, December 2018
DOI: https://doi.org/10.3201/eid2412.180740

Résumé (en Français)

Contexte

Chaque épidémie de la maladie à virus Ebola résulte très probablement d'événements zoonotiques indépendants. On pense que les chauves-souris jouent un rôle dans l'écologie des virus Ebola en tant qu'espèce réservoir. Elles peuvent infecter les humains directement ou via des hôtes amplificateurs intermédiaires, comme les primates non humains, les céphalophes ou autres animaux. L'émergence du virus Ebola par l'exposition aux chauves-souris était soupçonnée dans au moins deux épidémies : à Luebo (en RDC) en 2007 et en Afrique de l'Ouest en 2013. Cependant, peu de données sont disponibles pour soutenir le rôle des chauves-souris dans l'écologie des virus Ebola. Nous avons effectué une grande enquête sérologique pour évaluer la prévalence du virus Ebola chez les chauves-souris de Guinée et RDC, des pays ayant connu une épidémie de la maladie à virus Ebola précédemment, et du Cameroun, pays considéré à haut risque d'épidémies à virus Ebola.

Matériels et Méthodes

Sites d'étude et prélèvement des échantillons

De Novembre 2015 à Août 2017, nous avons prélevé des échantillons de chauves-souris frugivores et insectivores dans leur milieu naturel en Guinée, au Cameroun et en RDC. Du sang total était prélevé par ponction veineuse de la veine propatagiale ou brachiale et déposé directement sur du papier filtre Whatman 903 (GE Healthcare, Feasterville-Trevose, PA, États-Unis). Les données enregistrées sur le terrain comprenaient des informations sur le site de capture (coordonnées du système de positionnement global, environnement écologique), la

méthode de capture, la morphologie (mesures du corps, poids, couleur), le sexe, la classe d'âge (adulte, juvénile) et les espèces (identifiées visuellement).

Détection des anticorps anti-virus Ebola

Nous avons réalisé les analyses des échantillons des chauves-souris à l'aide d'un test sérologique basé sur le Luminex et adapté aux chauves-souris. Le test comprenait la glycoprotéine, la nucléoprotéine ou la protéine virale 40 recombinantes du virus Ebola pour 4 différentes espèces : Zaïre, Sudan, Bundibugyo et Reston. Nous avons exprimé les résultats en intensité médiane de fluorescence (MFI) pour 100 billes. Nous avons inclus 3 échantillons sur chaque plaque pour valider la répétabilité entre les tests.

Détermination des seuils

En l'absence de contrôle positifs, nous avons utilisé 4 méthodes statistiques différentes pour déterminer la valeur seuil du MFI pour chaque antigène, notamment : la moyenne des témoins négatifs plus 4 fois l'écart-type (moyenne + 4xSD), l'analyse des points de changement, la distribution exponentielle négative et la distribution binomiale négative. Nous avons considéré un échantillon de sang réactif si le MFI était supérieur au seuil. Comme contrôles négatifs, nous avons prélevé des échantillons de chauves-souris insectivores nées en captivité ; *Carollia perspicillata* (n=103) au parc zoologique de Montpellier (Montpellier, France), *Pteropus giganteus (*n=19) et *Rousettus aegyptiacus* (n=23) au zoo et jardin botanique Wilhelma (Stuttgart, Allemagne). Nous avons défini la positivité des anticorps anti-virus Ebola comme une réactivité à la fois à la glycoprotéine et à la nucléoprotéine de la même lignée, comme cela avait été fait dans notre étude précédente chez les survivants de la maladie à virus Ebola en Guinée.

Extraction de l'acide nucléique et détection de l'ARN du virus Ebola par PCR

Les extractions d'acides nucléiques ont été réalisées à l'aide des méthodes Nuclisens (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) ou m2000sp (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA). Pour les espèces de chauves-souris du Cameroun et de la Guinée, nous avons utilisé les amorces ciblant la nucléoprotéine du génome viral (126pb). Pour les espèces de la RDC, nous

avons utilisé les amorces ciblant la région de la protéine virale 35 du génome, notamment (184 pb).

Confirmation moléculaire des espèces de chauves-souris

Nous avons amplifié et séquencé un fragment d'environ 800 pb du cytochrome b de la mitochondrie pour confirmer l'identification des espèces de chauves-souris enregistrée sur le terrain sur un sous-ensemble d'échantillons. Ensuite, Nous avons effectué des analyses BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ou des analyses phylogénétiques pour les échantillons avec peu ou aucune similarité, en utilisant les séquences nouvellement obtenues et les séquences de référence de différentes espèces de chauves-souris avec PhyML (http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/) pour déterminer le genre et/ou l'espèce.

Résultats

Espèces de chauves-souris et prélèvement des échantillons

Au total, des échantillons de 4.022 chauves-souris sauvages provenant de 21 régions différentes au Cameroun (n = 10), en Guinée (n = 8) et en RDC (n = 3) ont été analysé. Pour 1.470 échantillons (36,5%), l'identification de l'espèce sur le terrain a été vérifiée par le séquençage. Nous avons recueilli des échantillons auprès de 1.736 (43,2%) chauves-souris frugivores (famille des *Pteropodidae*) d'environ 12 espèces différentes et 2.199 (54,7%) chauves-souris insectivores (7 familles) de plus de 27 espèces. Dans l'ensemble, 54,7% des chauves-souris étaient des femelles, 43,8% des mâles, et il y avait 1,5% (n = 60) dont le sexe n'était pas déterminé. La plupart des chauves-souris (77,9%) étaient des adultes et 9,6% des juvéniles, pour 12,5% (n = 502) l'âge n'était pas disponible.

Anticorps dirigés contre les antigènes des virus Ebola

Dans l'ensemble, des anticorps anti-virus Ebola de la souche Zaïre ou Soudan ont été observés chez au moins 7 espèces de chauves-souris, notamment : 1 insectivore (*Mops sp.*) et 6 frugivores (*Eidelon helvum*, *Hypsignathus monstrosus*, *Rousettus aegyptiacus*, *Lissonyteris angolensis*, *Epomophorus sp.* et *Micropteropus pusillus*). Parmi les chauves-souris frugivores, les échantillons d'*E. Helvum*, *H. monstrosus* et *R. aegyptiacus* présentaient la réactivité la plus

élevée. Parmi les chauves-souris insectivores, seuls les échantillons des *Mops sp*. (1 à 6 / 494) étaient positives pour les anticorps du virus Ebola Zaïre ou du virus Ebola Soudan.

Comparaison des séroprévalences du virus Ebola Zaïre chez les chauves-souris en Afrique à travers les différentes études

Nous avons compilé les données chez des chauves-souris sur la sérologie du virus Ebola Zaïre des études précédentes (n = 4.493) et de cette étude (n = 3.935 ; 46,7%). Aujourd'hui, des données sont disponibles pour 3.023 chauves-souris insectivores d'environ 30 espèces appartenant à 7 familles différentes provenant de Guinée, Cameroun, RDC et Gabon, dont 2 199 (72,7%) proviennent de cette étude. Une réactivité au virus Ebola Zaïre a été observée chez *M. condylurus* du Gabon et *Mops sp*. du Cameroun. Par contre, chez au moins huit espèces de chauves-souris frugivores une réactivité aux antigènes du virus Ebola Zaïre a été observé.

Détection de l'ARN du virus Ebola Zaïre par la RT-PCR

Nous avons analysé 665 échantillons de RDC (n = 193), Cameroun (n = 399) et Guinée (n = 73) par RT-PCR à la recherche de l'ARN du virus Ebola Zaïre, parmi lesquels 294 échantillons provenaient d'espèces de chauves-souris précédemment documentés comme porteurs de l'ARN du virus Ebola Zaïre. Toutes les analyses étaient négatives.

Discussion

Afin de clarifier le rôle des chauves-souris dans l'écologie du virus Ebola et d'identifier les lieux/régions où le virus circule entre les épidémies, nous avons testé plus de 4.000 chauves-souris, doublant ainsi le nombre total d'échantillons testés dans toutes les études précédentes en Afrique. Nous avons obtenu pour la première fois des données sur les chauves-souris du Cameroun, complétées par les données existantes et nouvelles sur les chauves-souris de la Guinée et de la RDC, et nous avons considérablement augmenté les données disponibles sur les chauves-souris insectivores. Comme cela a été fait dans des études sur des survivants humains du virus Ebola Zaïre, nous avons défini la positivité aux anticorps anti-virus Ebola Zaïre et Soudan comme la présence d'anticorps dirigés simultanément contre la nucléoprotéine et la glycoprotéine. Ainsi, nous avons estimé que 2–37 (0,05% –0,92%)

chauves-souris étaient séropositives pour le virus Zaïre Ebola et que 0–30 (0% –0,75%) étaient séropositives pour le virus Soudan. Lorsqu'on associe des données d'études de séroprévalence sur le virus Ebola Zaïre chez des chauves-souris aux des données de notre étude, il y a des chauves-souris insectivores du genre *Mops sp* et 8 espèces de chauves-souris frugivores (*E. helvum*, *E. gambianus*, *E. franqueti*, *H. monstrosus*, *L. angolensis*, *M. pusillus*, *M. torquata*, *R. aegyptiacus*) qui ont présenté des anticorps anti-virus Ebola Zaïre. Les analyses pour la détection de l'ARN viral dans ces échantillons de chauve-souris étaient négatives. Ainsi, malgré la présence d'anticorps du virus Ebola, le rôle des chauves-souris en tant qu'espèce réservoir reste flou, car la détection de l'ARN viral est encore rare.

Survey of Ebola Viruses in Frugivorous and Insectivorous Bats in Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 24, No. 12, December 2018
DOI: https://doi.org/10.3201/eid2412.180740

Helene M. De Nys*, Placide Mbala Kingebeni*, Alpha K. Keita*, Christelle Butel, Guillaume Thaurignac, Christian-Julian Villabona-Arenas, Thomas Lemarcis, Mare Geraerts, Nicole Vidal, Amandine Esteban, Mathieu Bourgarel, François Roger, Fabian Leendertz, Ramadan Diallo, Simon-Pierre Ndimbo-Kumugo, Justus Nsio-Mbeta, Nikki Tagg, Lamine Koivogui, Abdoulaye Toure, Eric Delaporte, Steve Ahuka-Mundeke, Jean-Jacques Muyembe Tamfum, Eitel Mpoudi-Ngole, Ahidjo Ayouba**, Martine Peeters**

* These first authors contributed equally to this article.

** These senior authors contributed equally to this article.

Author affiliations :

TransVIHMI of Institut de Recherche pour le Développement, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and University of Montpellier, Montpellier, France (H.M. De Nys, P. Mbala Kingebeni, A.K. Keita, C. Butel, G. Thaurignac, C.-J. Villabona-Arenas, T. Lemarcis, M. Geraerts, N. Vidal, A. Esteban, A. Toure, E. Delaporte, A. Ayouba, M. Peeters); National Institute of Biomedical Research, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo (P. Mbala Kingebeni, S.-P. Ndimbo-Kumugo, S. Ahuka-Mundeke, J.-J. Muyembe Tamfum); Cliniques Universitaires de Kinshasa, Kinshasa (P. Mbala Kingebeni, S. Ahuka-Mundeke, J.-J. Muyembe Tamfum); Centre de Recherche et de Formation en Infectiologie de Guinée, Conakry, Guinea (A.K. Keita, A. Toure); ASTRE of Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Institut national de la Recherche Agronomique and Univerisity of Montpellier, Montpellier (M. Bourgarel, F. Roger); Robert Koch-Institute, Berlin, Germany (F. Leendertz); Ministère de l'Elevage et des Productions Animales, Conakry (R. Diallo); Direction de Lutte contre la Maladie, Kinshasa (J. Nsio-Mbeta); Royal Zoological Society of Antwerp, Antwerp, Belgium (N. Tagg); Université de Conakry, Conakry (L. Koivogui); Institut National de Sante Publique, Conakry (A. Toure); Institut de Recherches Médicales et d'Études des Plantes Médicinales, Yaoundé, Cameroon (E. Mpoudi-Ngole); Cameroon Institut de Recherche pour le Développement, Yaoundé (E. Mpoudi-Ngole)

ABSTRACT

To clarify the role of bats in the ecology of Ebola viruses, we assessed the prevalence of Ebola virus antibodies in a large-scale sample of bats collected during 2015–2017 from countries in Africa that have had previous Ebola outbreaks (Guinea, the Democratic Republic of the Congo) or are at high risk for outbreaks (Cameroon). We analyzed 4,022 blood samples of bats from ≥12 frugivorous and 27 insectivorous species; 2–37 (0.05%–0.92%) bats were seropositive for Zaire and 0–30 (0%–0.75%) bats for Sudan Ebola viruses. We observed Ebola virus antibodies in 1 insectivorous bat genus and 6 frugivorous bat species. Certain bat species widespread across Africa had serologic evidence of Zaire and Sudan Ebola viruses. No viral RNA was detected in the subset of samples tested (n = 665). Ongoing surveillance of bats and other potential animal reservoirs are required to predict and prepare for future outbreaks

INTRODUCTION

Since the first outbreak of Ebola virus disease (EVD) in 1976 in the northern part of the Democratic Republic of the Congo (DRC), 26 recognized outbreaks have occurred in humans across Africa; fatality rates of outbreaks have been 25%–90% (Mylne et al., 2014; Baize et al., 2014; Maganga et al., 2014; WHO Ebola Outbreak DRC, 2017). Each EVD outbreak most likely resulted from independent zoonotic events. Bats are believed to play a role in the ecology of Ebola viruses as a reservoir species (Pigott et al., 2016). Bats might infect humans directly or via intermediate amplifying hosts, like nonhuman primates or duikers (Leroy et al., 2005; Leendertz et al., 2016). Bats might serve as a source of infection in certain areas where bats are hunted and eaten as bushmeat, but infection could also occur after consumption of fruits contaminated with saliva, urine, or feces from Ebola virus–infected bats (Kamins et al., 2015; Leroy et al., 2007). Ebola virus emergence through exposure to bats was suspected for at least 2 outbreaks: Luebo (the DRC) in 2007 and West Africa in 2013 (Leroy et al., 2009; Marí Saéz et al., 2015). Relatively few data are available to support the role of bats in the ecology of Ebola viruses. During the EVD outbreaks of 2003 in Gabon and the Congo, Zaire Ebola virus RNA and antibodies were detected in live-caught specimens from 3 fruit bat species (*Epomops franqueti*, *Hypsignathus monstrosus*, *Myonycteris torquata*); virus sequences were found in the livers or spleens of a few bats (Leroy et al., 2005). In subsequent studies in Gabon, the Congo, Ghana, and Zambia, antibodies were detected in additional frugivorous bat species

(*Eidolon helvum*, *Epomophorus gambianus*, *Rousettus aegyptiacus*, *Micropteropus pusillus*) and 1 in- sectivorous species (*Mops condylurus*) (Pourrut et al., 2007; Pourrut et al., 2009; Hayman et al., 2010; Hayman et al., 2012; Ogawa et al., 2015). The amplification and sequencing of viral RNA of other filoviruses in bats, such as Marburg virus in bats from Africa (Towner et al., 2007; Towner et al., 2009; Kuzmin et al., 2010; Swanepoel et al., 2007), Lloviu virus in bats from Europe (Negredo et al., 2011), and new filoviruses in bats from China (Yang et al., 2017), has provided additional evidence for a possible role of bats in Ebola virus ecology. In general, EVD outbreaks have been limited in terms of their geographic spread and chains of human-to-human transmission (Mylne et al., 2014). However, during the 2013–2016 outbreak, virus spread to the urban areas of 3 countries, infecting 30,000 persons in Guinea, Sierra Leone, and Liberia, and 11,000 deaths were recorded (WHO Ebola Sitrep 30 March 2016). This outbreak illustrated the potential for epidemic spread from a single zoonotic transmission, with severe public health and socioeconomic impact (Dudas et al., 2017).

Additional studies are urgently needed to identify the animal reservoir, predict EVD outbreak risks, and improve our capacity to control epidemics.

In previous modeling studies, areas were defined as at risk for EVD outbreaks on the basis of data collected from a limited number of wildlife bat species from a few geographic regions (Pigott et al., 2016; Pigott et al., 2017). Also, a wide variety of serologic assays and interpretation criteria have been used, making comparison of results challenging (Pourrut et al., 2007; Pourrut et al., 2009; Hayman et al., 2010; Hayman et al., 2012; Ogawa et al., 2015; Breman et al., 1999; Leirs et al., 1999). For this study, we performed a large serosurvey with a highly specific and sensitive high-throughput assay to assess Ebola virus prevalence in bats from Africa (Ayouba et al., 2017). We studied bats from Guinea and the DRC, countries with previous EVD outbreaks, and Cameroon, a country considered at high risk for future EVD outbreaks (Pigott et al., 2016; Pigott et al., 2017).

MATERIALS AND METHODS

Study Sites and Sample Collection

During November 2015–August 2017, we collected samples from free-ranging frugivorous and insectivorous bats in Guinea, Cameroon, and the DRC. We captured bats at night using ground

mist nets or harp traps in roosting and foraging sites. We set up ground mist nets (12 × 3.2 m) of 30-mm and 60-mm mesh sizes at different heights (1–7 m) to maximize capture of different species. We opened nets or harp traps just before sunset and checked for bats every 1–2 hours. Captured bats were released the same night immediately after sampling. Using bat whole blood taken by venipuncture of the propatagial or brachial vein, we dropped blood samples directly onto Whatman 903 filter paper (GE Healthcare, Feasterville-Trevose, PA, USA). We air-dried and preserved samples individually in plastic bags containing silica desiccant and stored them in hermetic boxes; 2–3 weeks later, we transferred dried blood spots to -20°C until needed for analysis. Data recorded in the field included information on capture site (global positioning system coordinates, ecologic environment), capture method, morphology (body measurements, weight, color), sex, age class (adult, juvenile), and species (identified visually). We collected negative control samples (n = 145) from a captive-born insectivorous bat species (103 *Carollia perspicillata* bats) hosted at the Parc Zoologique de Montpellier (Montpellier, France) and 2 frugivorous bat species (19 *Pteropus giganteus* bats, 23 *R. aegyptiacus* bats) hosted at Wilhelma Zoo and Botanical Garden (Stuttgart, Germany). We collected and preserved samples the same way we did for free-ranging bats.

Screening for Ebola Virus Antibodies

We tested dried blood spots with a Luminex-based serologic assay adapted for bats (Ayouba et al., 2017) (online Technical Appendix, https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/24/12/18-0740-Techapp1.pdf). The assay included recombinant Ebola virus proteins glycoprotein, nucleoprotein, or viral protein 40 for different lineages: Zaire, Sudan, Bundibugyo, and Reston. We reconstituted plasma from dried blood spots as previously described (Ayouba et al., 2017) and incubated 100 µL of sample (final plasma dilution 1:2,000) with 50 µL of recombinant protein–coated beads (2 µg protein/1.25 10^6 beads) in 96-well flat-bottom filter plates (Millipore, Tullagreen, Ireland) on a plate shaker at 300 rpm for 16 h at 4°C in the dark. After washing, we added 0.1 µg/mL of goat anti-bat biotin–labeled IgG (Euromedex, Souffelweyersheim, France) per well and incubated for 30 min at 300 rpm. After another round of washing, we added 50 µL of 4 µg/mL streptavidin-R-phycoerythrin (Fisher Scientific, Illkirch, France) per well and incubated for 10 min at 300 rpm. Reactions were read with BioPlex-200 (BioRad, Marnes-la- Coquette, France). We expressed results as median

fluorescence intensity (MFI) per 100 beads. We included 3 samples on every plate to validate inter-assay repeatability.

Determination of cutoffs

In the absence of positive control samples, we used 4 different statistical methods to determine the MFI cutoff value for each antigen (Peel et al., 2013; Gilbert et al., 2013) (online Technical Appendix Table 1). First, we used a general formula that involved the MFI of the 145 negative control samples, and we assigned the cutoff as mean plus 4 times the SD (mean + 4xSD). Second, we used a change point analysis (Lardeux et al., 2016) to identify the value at which statistical properties of the underlying probability distribution changed. This value was used to identify outliers and classify them as reactive. We used the R package changepoint (Killick et al., 2014) to calculate a single shift in the arithmetic mean with the at-most-1-change method (Hinkley et al., 1970). Third, we fitted univariate distributions to our data and defined the cutoff as a 0.001 risk for error, as was used in other virus serology studies (Pourrut et al., 2009; Laing et al., 2018). We reduced the set of candidate distributions following a bootstrapped skewness-kurtosis analysis (Cullen et al., 1999). We performed fitting by maximum-likelihood estimation and selected the best-fit distribution on the basis of the Akaike information criteria with the R library fitdistrplus (Delignette-Muller et al., 2015). A negative binomial distribution best-fit the data; however, we also used the negative exponential distribution as in Pourrut et al. and Laing et al. (Pourrut et al., 2009; Laing et al., 2018). For every antigen, we computed bootstrap values using 10,000 replicates and averaged. We performed analyses with R version 3.3.2 software (https://www.r-project.org/). We considered a blood sample reactive if the MFI of the reaction was above the cutoff. We defined Ebola virus antibody positivity as reactivity to glycoprotein and nucleoprotein of the same lineage, as was done in our previous study (Ayouba et al., 2017).

Nucleic Acid Extraction and PCR Screening for Ebola Virus RNA

We extracted total DNA and RNA from dried blood spots as previously described using Nuclisens (bioMerieux, Marcy- l'Etoile, France) or m2000sp methods (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA), which are known for a high performance recovering nucleic acids from dried blood spots (Monleau et al., 2009; Guichet et al., 2018). For bat species from Cameroon

and Guinea, we screened for Zaire Ebola virus RNA by semi nested reverse transcription PCR (RT-PCR) targeting the nucleoprotein region of the virus genome. We amplified a 126-bp fragment of Zaire Ebola virus using primers NP1F1 (forward, 5'-CGGACACACAAAAAGAAWGAA-3') and NP1R-ZR (reverse, 5'-CTCTATCTTKGTGATRTGGCTCTGA-3') in the first round of PCR and NP1F2 (forward, 5'- TTGT-GTGCGARTAACTAYGAGGAAG-3') plus NP1R-ZR in the second round. For species from the DRC, we performed semi nested RT-PCR targeting the viral protein 35 region of the genome using the protocol of He et al. with modifications (He et al., 2015). In the first round, we amplified a 217-bp fragment with primers VP35-F (5'-ATYATGTATGATCACYTVCCWGG-3') and VP35-R (52-AGCGRATGTGGATSACRGGT-32) and, in the second round, a 184-bp product with primers VP35-R and VP35-in-F (5'-GCTTTYCAYCAAYTAGTRCAAG-3').

Molecular Confirmation of Bat Species

We confirmed bat species identification recorded in the field on a subset of samples by using molecular tests. We amplified an ≈800-bp fragment of mitochondrial cytochrome b using primers cytb-L14724 (forward) and cytb-H15506 (reverse) (Marí Saéz et al., 2015; Irwin et al., 1991; Kocher et al., 1989). We substituted the cytb-L14724 primer with cytb-L140217 (5'-ATGACCAACATCC- GAAAATCNCAC-3') to improve PCR performance for certain species. We purified PCR products through agarose gel (1%) and directly sequenced on an ABI 3500 sequencer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). We performed BLAST analyses (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) to identify the most similar bat species. For samples with no or low similarity (<97%) hits with species in GenBank, we performed phylogenetic analyses with newly obtained sequences and reference sequences for different bat species using maximum-likelihood methods implemented with PhyML (http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/) to determine genus.

RESULTS

Bat Species and Sampling

We analyzed blood samples from 4,022 wild bats from 21 different regions in Cameroon (n = 10), Guinea (n = 8), and the DRC (n = 3) (Figure 10; Table 5). To increase species diversity, we captured bats in multiple ecologic settings: forests (49%), open fields (10%), villages (29%),

plantations (7%), and urban areas (5%). For 1,470 (36.5%) samples, species identification in the field was confirmed by sequence analysis. At each site, ≥1 sample was confirmed per sampling date, capture method, and morphologic description. For the remaining samples, species identification was extrapolated by combining molecular and morphologic data, including photographs whenever available. For some insectivorous bat families (*Miniopteridae*, *Molossidae*, *Nycteridae*, *Rhinolophidae*), identification was possible only at the genus level; for some *Molossidae* bats, we could not distinguish between *Mops* and *Chaerephon* genera because of the lack of sequences in GenBank (Table 6). For 87 (2.16%) samples, species identification was not possible because incomplete data were recorded in the field, and available biologic materials were insufficient for molecular confirmation. We collected samples from 1,736 (43.2%) frugivorous bats (family *Pteropodidae*) of 12 species and 2,199 (54.7%) insectivorous bats (7 families) of ≥27 species. The insectivorous bat families sampled, in order of decreasing frequency, were *Hipposideridae* (31.9%), *Molossidae* (13.4%), *Miniopteridae* (5.8%), *Rhinolophidae* (2.1%), *Vespertilionidae* (0.8%), *Nycteridae* (0.5%), and *Emballonuridae* (0.12%). Overall, 54.7% of bats were female and 43.8% were male; for 1.5% (n = 60) of bats, sex was unknown. Most (77.9%) bats were adults, and 9.6% were juveniles; for 12.5% (n = 502) of bats, age could not be determined or was not recorded.

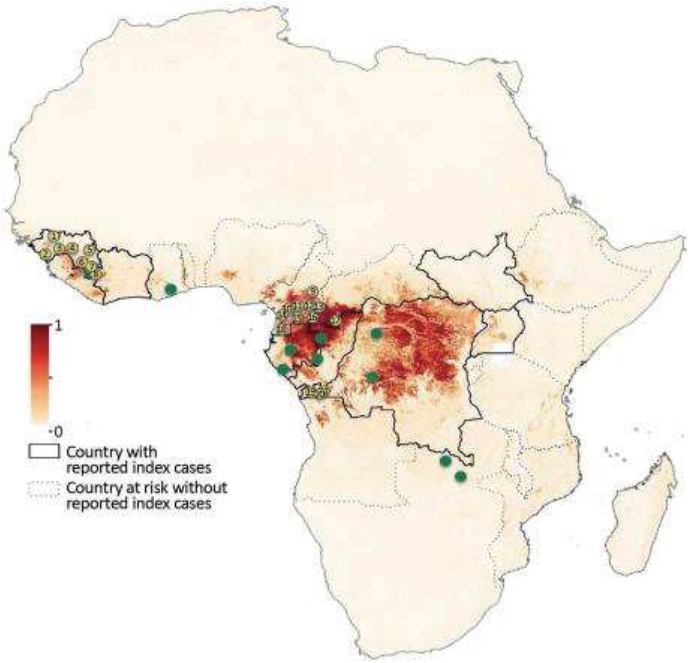


Figure 10. Study sites for bat blood sample collection for Ebola virus serology, Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015– 2017.

Yellow dots indicate sampling sites for bats in our study, and green dots indicate sampling sites in previously published studies. Dark red shading indicates highest and light-yellow lowest risk for Ebola virus spillover events. Study sites are numbered: 1, Koundara; 2, Conakry; 3, Kindia; 4, Mamou; 5, Kankan; 6, Gueckedou; 7, Macenta; 8, Nzerekore; 9, Mbam Djerem; 10, Libellengoi Sud; 11, Yaoundé; 12, Ekom; 13, North Dja; 14, Bipindi; 15, Mbalmayo; 16, Djoum; 17, Mambele; 18, Campo M'an; 19, Boma; 20, Kimpese; 21, Zongo. Countries with reported index Ebola cases and countries without such cases but deemed at risk are indicated. Map of Africa adapted from Pigott et al. (Pigott et al., 2016) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) by adding locations of collection sites.

Tableau 5. Bat samples collected for Ebola virus serology by study site, Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017.

Country, site		No. samples
Democratic Republic of Congo		
	Boma	156
	Kimpese	202
	Zongo	472
Subtotal		830
Cameroon		
	Yaoundé	126
	Libellengoi Sud	44
	Mbalmayo	48
	Bipindi	479
	Campo M'an	344
	North Dja	295
	Ekom	122
	Djoum	56
	Mambele	348
	Mbam Djerem	156
Subtotal		2018
Guinea		
	Conakry	107
	Kindia	323
	Kankan	378
	Koundara	90
	Mamou	147
	Gueckedou	49
	Macenta	9
	Nzerekore	71
Subtotal		1,174
Total		4,022

Bats Antibodies against Different Ebola Virus Antigens

We tested all samples for Ebola virus antibodies. The number of samples reacting with ≥1 antigen was 734 (18.2%) by the mean + 4xSD method, 274 (6.8%) for the change-point method, 175 (4.4%) for the binomial method, and 457 (11.4%) for the exponential method. Blood samples frequently reacted with glycoprotein antigens; samples reacted most with Zaire and Sudan Ebola virus antigens and least with Reston (Table 7). Simultaneous reactivity to >1 antigen (i.e., glycoprotein, nucleoprotein, viral protein 40) from the same virus lineage was rare. Simultaneous reactivity to the same antigen from different virus lineages was frequent; 32.3%–76.7% of blood samples were reactive to glycoprotein from ≥2 Ebola virus species, 18.4%–34.0% to viral protein 40, and 1.5%–4.4% to nucleoprotein (online Technical Appendix Table 2). When using the criterion simultaneous presence of antibodies to nucleoprotein and glycoprotein, the antibody positivity for Zaire or Sudan Ebola virus antibodies was generally <1% for all bats tested, regardless of cutoff method, and was lower among insectivorous than frugivorous bats: 0.05%–0.27% (insectivorous) and 0.06%–1.79% (frugivorous) for Zaire Ebola virus versus 0%–0.09% (insectivorous) and 0%–1.61% (frugivorous) for Sudan Ebola virus (Table 7; Figure 11). Three samples were positive for Zaire and Sudan Ebola viruses, but only by less stringent cut-off methods (i.e., mean + 4xSD).

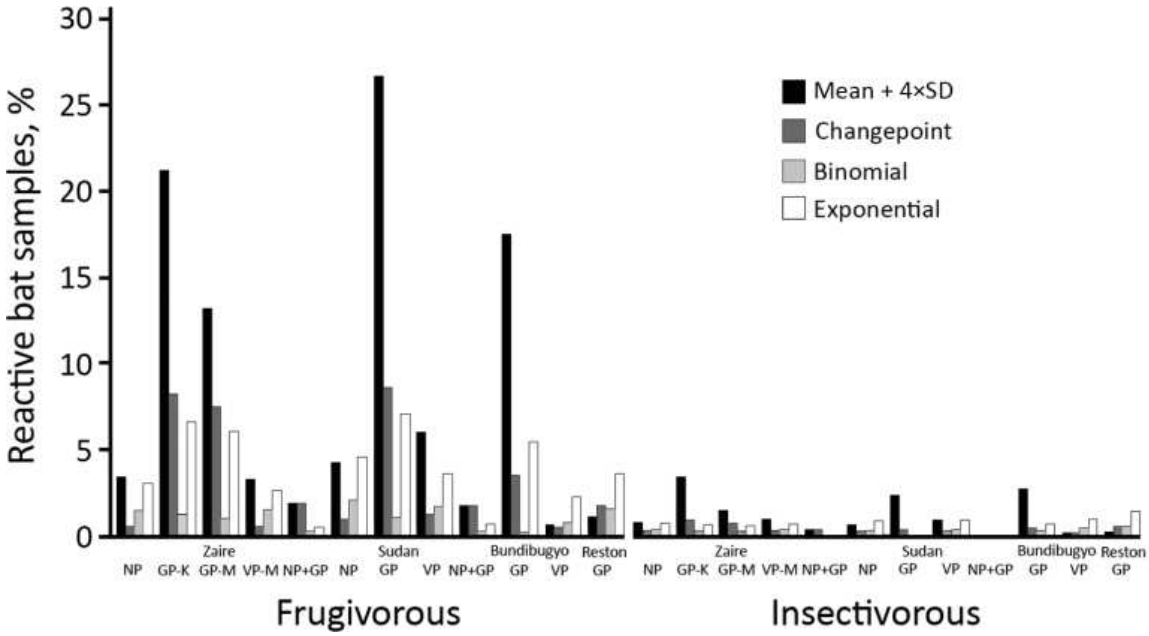


Figure 11. Bat blood samples reactive to Ebola virus antigens, by statistical method used to determine cutoff, Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017.

Samples from frugivorous bats (n = 1,736) and insectivorous bats (n = 2,199) were tested by Luminex assay with GP, NP, and VP of the Zaire and Sudan lineages; GP and VP of the Bundibugyo lineage; and GP of the Reston lineage. GP, glycoprotein; K, Kissoudougou strain; M, Mayinga strain; NP, nucleoprotein; VP, viral protein 40.

Tableau 6. Bat species sampled for Ebola virus serology, Guinea, Cameroon, and the DRC, 2015–2017*

Family	Species	DRC, no.	Cameroon, no.	Guinea, no.	Total, no.
Emballonuridae	*Coleura afra*	0	5	0	5
Hipposideridae	*Hipposideros abae*	0	0	37	37
	H. beatus	0	4	0	4
	H. cyclops	0	14	0	14
	H. fuliginosus	0	2	0	2
	H. gigas	2	9	2	13
	H. jonesi	0	1	12	13
	H. ruber/caffer	127	807	237	1,171
	Hipposideros sp.	28	0	0	28
Subtotal		157	837	288	1,282
Miniopteridae	*Miniopterus* sp.	205	0	27	232
Molossidae	*Chaerephon* sp.	0	0	44	44
	Mops condylurus	0	0	110	110
	Mops sp.	0	256	0	256
	Mops/Chaerephon sp.	0	8	120	128
Subtotal		0	264	274	538
Nycteridae	*Nycteris* sp.	0	7	15	22
Rhinolophidae	*Rhinolophus alcyone*	0	16	0	16
	R. darlingii	3	0	0	3
	R. fumigatus	0	0	19	19
	R. landeri	0	0	6	6
	Rhinolophus sp.	3	38	1	42
Subtotal		6	54	26	86
Vespertilionidae	*Glauconycteris variegata*	0	3	0	3
	Kerivoula sp.	0	1	0	1
	Myotis bocagii	0	3	0	3
	Neoromicia sp.	0	5	0	5
	Scotophilus leucogaster	0	0	15	15
	S. nigrita	0	0	1	1
	S. nux	0	6	0	6
Subtotal		0	18	16	34
Pteropodidae	*Eidolon helvum*	305	158	17	480
	Epomophorus gambianus	0	0	191	191
	Epomophorus wahlbergi	0	16	0	16
	Epomops buettikoferi	0	0	4	4
	Epomops franqueti	20	256	0	276
	Hypsignathus monstrosus	1	176	8	185
	Lissonycteris angolensis	22	30	32	84
	Megaloglossus woermanni	1	19	0	20
	Micropteropus pusillus	44	2	18	64
	Myonycteris torquata	35	21	0	56
	Rousettus aegyptiacus	0	131	228	359
	Scotonycteris zenkeri	0	1	0	1
Subtotal		428	810	498	1,736
Inderminate species		34	23	30	87
Total		830	2,018	1,174	4,022

*DRC, the Democratic Republic of the Congo

Tableau 7. Blood samples from bats reactive with Ebola virus antigens in Luminex assay, by antigen, bat type, and statistical method used to determine cutoff, Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017*

Ebola virus species, antigen	Bat type	Statistical method, no. (%)				Estimated range, %
		Mean + 4xSD	Change-point	Binomial	Exponential	
Zaire						
NP	Frugivorous	57 (3.28)	8 (0.46)	24 (1.38)	51 (2.94)	0.46–3.28
NP	Insectivorous	15 (0.68)	1 (0.05)	6 (0.27)	15 (0.68)	0.05–0.68
NP	Total	72 (1.79)	9 (0.22)	30 (0.75)	66 (1.64)	0.23–1.79
GP-K	Frugivorous	365 (21.03)	141 (8.12)	20 (1.15)	113 (6.51)	1.15–21.03
GP-K	Insectivorous	73 (3.32)	18 (0.82)	2 (0.09)	12 (0.55)	0.09–3.32
GP-K	Total	440 (10.94)	160 (3.98)	22 (0.55)	125 (3.11)	0.55–10.94
GP-M	Frugivorous	226 (13.02)	128 (7.37)	16 (0.92)	103 (5.93)	0.92–13.02
GP-M	Insectivorous	31 (1.41)	14 (0.64)	2 (0.09)	12 (0.55)	0.09–1.41
GP-M	Total	259 (6.44)	143 (3.56)	18 (0.45)	115 (2.86)	0.45–6.44
VP	Frugivorous	55 (3.17)	8 (0.46)	24 (1.38)	44 (2.53)	0.46–3.17
VP	Insectivorous	19 (0.86)	5 (0.23)	6 (0.27)	14 (0.64)	0.23–0.86
VP	Total	75 (1.86)	14 (0.35)	30 (0.75)	59 (1.47)	0.35–1.86
NP + GP	Frugivorous	31 (1.79)	31 (1.79)	1 (0.06)	7 (0.40)	0.06–1.79
NP + GP	Insectivorous	6 (0.27)	6 (0.27)	1 (0.05)	1 (0.05)	0.05–0.27
NP + GP	Total	37 (0.92)	37 (0.92)	2 (0.05)	8 (0.20)	0.05–0.92
Sudan						
NP	Frugivorous	71 (4.09)	15 (0.86)	34 (1.96)	77 (4.44)	0.86–4.44
NP	Insectivorous	12 (0.55)	1 (0.05)	5 (0.23)	18 (0.82)	0.05–0.82
NP	Total	84 (2.09)	17 (0.42)	39 (0.97)	96 (2.39)	0.42–2.39
GP	Frugivorous	459 (26.44)	147 (8.47)	17 (0.98)	121 (6.97)	0.98–26.44
GP	Insectivorous	49 (2.23)	6 (0.27)	1 (0.05)	1 (0.05)	0.05–2.23
GP	Total	509 (12.66)	154 (3.83)	18 (0.45)	125 (3.11)	0.45–12.66
VP	Frugivorous	102 (5.88)	20 (1.15)	28 (1.61)	61 (3.51)	1.15–5.88
VP	Insectivorous	19 (0.86)	4 (0.18)	6 (0.27)	18 (0.82)	0.18–0.86
VP	Total	121 (3.01)	24 (0.60)	34 (0.85)	80 (1.99)	0.60–3.01
NP + GP	Frugivorous	28 (1.61)	28 (1.61)	0	10 (0.58)	0–1.61
NP + GP	Insectivorous	2 (0.09)	2 (0.09)	0	0	0–0.09
NP + GP	Total	30 (0.75)	30 (0.75)	0	10 (0.25)	0–0.75
Bundibugyo GP	Frugivorous	301 (17.34)	59 (3.40)	0	93 (5.36)	0–17.34
GP	Insectivorous	58 (2.64)	8 (0.36)	5 (0.23)	13 (0.59)	0.23–2.64
GP	Total	361 (8.98)	68 (1.69)	22 (0.55)	107 (2.66)	0.55–8.98
VP	Frugivorous	9 (0.52)	7 (0.40)	12 (0.69)	37 (2.13)	0.40–2.14
VP	Insectivorous	0	1 (0.05)	8 (0.36)	20 (0.91)	0–0.91
VP	Total	9 (0.22)	8 (0.20)	20 (0.5)	57 (1.42)	0.20–1.42
Reston						
GP	Frugivorous	17 (0.98)	28 (1.61)	26 (1.50)	61 (3.51)	0.98–3.51
GP	Insectivorous	3 (0.14)	10 (0.45)	10 (0.45)	29 (1.32)	0.14–1.32
GP	Total	20 (0.50)	38 (0.94)	36 (0.90)	90 (2.24)	0.50–2.24

Zaire and Sudan Ebola Virus Reactivity of Different Bat Species

We estimated specific reactivity to Zaire and Sudan Ebola viruses by bat species. We did not include Bundibugyo and Reston because recombinant nucleoproteins were not available. Among insectivorous bats, only blood samples from *Mops* sp. bats (1–6/494) were positive for Zaire or Sudan Ebola virus antibodies (Table 8). Among frugivorous bats, samples from *E. helvum*, *H. monstrosus*, and *R. aegyptiacus* bats had the highest reactivity. We observed Zaire and Sudan Ebola virus seropositivity in these 3 species with almost all cutoff methods: 0.2%–3.3% for Zaire Ebola virus and 1.0%–2.9% for Sudan Ebola virus in *E. helvum* bat samples, 0.5%–1.6% for Zaire Ebola virus and 1.1%–4.3% for Sudan Ebola virus in *H. monstrosus* bat samples, and 0.6%–2.5% for Zaire Ebola virus and 0.8%–1.4% for Sudan Ebola virus in *R. aegyptiacus* bat samples. We observed 2.4% Zaire Ebola virus–seropositive samples for *Lissonycteris angolensis* bats and 0.5% for *Epomophorus* sp. bats, but only by less stringent cut-off methods. One sample from *M. pusillus* bats was seropositive for Sudan Ebola virus. No samples from *E. franqueti* or *M. torquata* bats were reactive with any Ebola virus antigens. Samples from the 1 *Scotonycteris zenkeri* bat and 20 *Megaloglossus woermanni* bats were seronegative. Overall, Zaire or Sudan Ebola virus antibodies were observed in 7 (1 insectivorous and 6 frugivorous) bat species.

Comparison of Zaire Ebola Virus Seroprevalence in Bats from Africa across Studies

For comparison, we compiled data regarding Zaire Ebola virus serology in bats of known species from previous studies (n = 4,493) and this study (n = 3,935; 46.7%) (Tables 9, 10). Data were available for 3,023 insectivorous bats of ≈30 species from 7 different families; 2,199 (72.7%) were from this study (Table 9). Insectivorous bat samples originated from Guinea, Cameroon, the DRC, and Gabon. Zaire Ebola virus reactivity has been observed only in *M. condylurus* bat samples from Gabon and *Mops* sp. bat samples from Cameroon. Data were available for 5,405 frugivorous bats of 17 species from 12 genera from West (Guinea, Ghana), West Central (Cameroon, Gabon, the Congo, the DRC), and East (Zambia) Africa (Table 10). No Zaire Ebola virus reactivity has been seen in blood samples from bat species *Casinycteris*, *Megaloglossus*, *Nanonycteris*, and *Scotonycteris*, but only a limited number of samples (n = 152) have been tested. Overall, blood samples from 8 frugivorous bat species have been found reactive with Zaire Ebola virus antigens. Blood samples from *E. helvum*, *H. monstrosus*, and *R.*

aegyptiacus bats from several countries across Africa have been reported to be seropositive. Reactivity has been observed with samples from *E. gambianus* bats in Ghana (10.8%) and Guinea. Reactivity was observed with large sample sets from *E. franqueti* bats derived from Gabon and the Congo and a small sample set from Ghana but not Guinea, Cameroon, or the DRC. *M. pusillus* and *M. torquata* bats tested positive for Zaire Ebola virus antibodies in studies in which large sample sets were collected. Among *L. angolensis* bat samples, only those from Cameroon have tested positive for antibodies.

RT-PCR Screening for Zaire Ebola Virus RNA

We screened 665 samples from the DRC (n = 193), Cameroon (n = 399), and Guinea (n = 73) by RT-PCR for the presence of Zaire Ebola virus RNA. Of the 294 samples originating from bats previously documented to carry Zaire Ebola virus RNA (*6*) (i.e., *H. monstrosus* [132 from Cameroon, 1 from the DRC], *M. torquata* [20 from Cameroon, 25 from the DRC], and *E. franqueti* [116 from Cameroon]), all were negative for Zaire Ebola virus RNA. Of the 371 samples from bat species *E. helvum* (58 from Cameroon, 165 from the DRC, 3 from Guinea), *L. angolensis* (8 from Cameroon, 4 from Guinea), *M. pusillus* (2 from the DRC, 1 from Guinea), *R. aegyptiacus* (45 from Cameroon, 40 from Guinea), *E. gambianus* (25 from Guinea), and *Mops* sp. (20 from Cameroon), all were negative for Zaire Ebola virus RNA.

Tableau 8. Blood samples from bats reactive with both nucleoprotein and glycoprotein of Zaire or Sudan Ebola virus, by statistical method used to determine cutoff, Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017.

-			Statistical method							
			Mean + 4xSD		Change-point		Binomial		Exponential	
Bat family, genus	No. tested	Ebola virus species	No.	% (95% CI)	No.	% (95% CI)	No.	% (95% CI)	No.	% (95% CI)
Hipposideridae										
Hipposideros sp.	1,282	Zaire	0	0 (0–0.3)	0	0 (0–0.3)	0	0 (0–0.3)	0	0 (0–0.3)
	1,282	Sudan	0	0 (0–0.3)	0	0 (0–0.3)	0	0 (0–0.3)	0	0 (0–0.3)
Miniopterus sp.	232	Zaire	0	0 (0–1.6)	0	0 (0–1.6)	0	0 (0–1.6)	0	0 (0–1.6)
	232	Sudan	0	0 (0–1.6)	0	0 (0–1.6)	0	0 (0–1.6)	0	0 (0–1.6)
Molossidae										
Chaerephon sp.	44	Zaire	0	0 (0–8.0)	0	0 (0–8.0)	0	0 (0–8.0)	0	0 (0–8.0)
	44	Sudan	0	0 (0–8.0)	0	0 (0–8.0)	0	0 (0–8.0)	0	0 (0–8.0)
Mops sp.	494	Zaire	6	1.2 (0.6–2.6)	6	1.2 (0.6–2.6)	1	0.2 (0.03–1.1)	1	0.2 (0.03–1.1)
	494	Sudan	2	0.4 (0.1–1.5)	2	0.4 (0.1–1.5)	0	0 (0–0.8)	0	0 (0–0.8)
Nycteridae										
Nycteris sp	22	Zaire	0	0 (0–14.9)	0	0 (0–14.9)	0	0 (0–14.9)	0	0 (0–14.9)
	22	Sudan	0	0 (0–14.9)	0	0 (0–14.9)	0	0 (0–14.9)	0	0 (0–14.9)
Rhinolophidae										
Rhinolophus sp.	86	Zaire	0	0 (0–4.3)	0	0 (0–4.3)	0	0 (0–4.3)	0	0 (0–4.3)
	86	Sudan	0	0 (0–4.3)	0	0 (0–4.3)	0	0 (0–4.3)	0	0 (0–4.3)
Vespertilionidae										
Glauconycteris sp.*	3	Zaire	0		0		0		0	
	3	Sudan	0		0		0		0	
Kerivoula sp.*	1	Zaire	0		0		0		0	
	1	Sudan	0		0		0		0	
*Myotis bocagii**	3	Zaire	0		0		0		0	
	3	Sudan	0		0		0		0	
Neoromicia sp.*	5	Zaire	0		0		0		0	
	5	Sudan	0		0		0		0	
Scotophilus sp.	22	Zaire	0	0 (0–14.9)	0	0 (0–14.9)	0	0 (0–14.9)	0	0 (0–14.9)
	22	Sudan	0	0 (0–14.9)	0	0 (0–14.9)	0	0 (0–14.9)	0	0 (0–14.9)
Pteropodidae										
Eidolon helvum	480	Zaire	16	3.3 (2.1–5.4)	16	3.3 (2.1–5.4)	1	0.2 (0–1.2)	4	0.8 (0.3–2.1)
	480	Sudan	14	2.9 (1.7–4.8)	14	2.9 (1.7–4.8)	0	0 (0–0.8)	5	1.0 (0.4–2.4)
Epomophorus sp.	207	Zaire	1	0.5 (0.08–2.7)	1	0.5 (0.08–2.7)	0	0 (0–1.4)	0	0 (0–1.8)
	207	Sudan	0	0 (0–1.8)	0	0 (0–1.8)	0	0 (0–1.8)	0	0 (0–1.8)
Epomops sp.	280	Zaire	0	0 (0–1.4)	0	0 (0–1.4)	0	0 (0–1.4)	0	0 (0–1.4)
	280	Sudan	0	0 (0–1.4)	0	0 (0–1.4)	0	0 (0–1.4)	0	0 (0–1.4)
Hypsignathus	185	Zaire	3	1.6 (0.6–4.7)	3	1.6 (0.6–4.7)	0	0 (0–2.0)	1	0.5 (0.05–3.0)
monstrosus	185	Sudan	8	4.3 (2.2–8.3)	8	4.3 (2.2–8.3)	3	1.6 (0.6–4.7)	2	1.1(0.3–3.9)
Lissonycteris	84	Zaire	2	2.4 (0.7–8.3)	2	2.4 (0.7–8.3)	0	0 (0–4.4)	0	0 (0–4.4)
angolensis	84	Sudan	0	0 (0–4.4)	0	0 (0–4.4)	0	0 (0–4.4)	0	0 (0–4.4)
Megaloglossus	20	Zaire	0	0 (0–16.1)	0	0 (0–16.1)	0	0 (0–16.1)	0	0 (0–16.1)
woermanni	20	Sudan	0	0 (0–16.1)	0	0 (0–16.1)	0	0 (0–16.1)	0	0 (0–16.1)
Micropteropus	64	Zaire	0	0 (0–5.7)	0	0 (0–5.7)	0	0 (0–5.7)	0	0 (0–5.7)
pusillus	64	Sudan	1	1.6 (0.3–8.3)	1	1.6 (0.3–8.3)	0	0 (0–5.7)	0	0 (0–5.7)
Myonycteris	56	Zaire	0	0 (0–6.4)	0	0 (0–6.4)	0	0 (0–6.4)	0	0 (0–6.4)
torquata	56	Sudan	0	0 (0–6.4)	0	0 (0–6.4)	0	0 (0–6.4)	0	0 (0–6.4)
Rousettus	359	Zaire	9	2.5 (1.3–4.7)	9	2.5 (1.3–4.7)	0	0 (0–1.1)	2	0.6 (0.2–2.0)
aegyptiacus	359	Sudan	5	1.4 (0.6–3.2)	5	1.4 (0.6–3.2)	0	0 (0–1.1)	3	0.8 (0.3–2.4)
Scotonycteris	1	Zaire	0		0		0		0	
*zenkeri**	1	Sudan	0		0		0		0	

*Percentages were not calculated because the number of samples collected was too low.

Tableau 9. Zaire Ebola virus antibodies in insectivorous bats from our research, Guinea, Cameroon, and the DRC, 2015–2017, and other published studies*

Family	Species	Country	Year of study (reference)	Test	No. tested	No. (%) positive†	Total, no. positive/tested (%)†
Emballonuridae	*Coleura afra*	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	5	0–0 (0–0)	0/14 (0)
	Saccolaimus peli	DRC	1979–1980 (*26*)	IFA	9	0 (0)	
Hipposideridae	*Hipposideros* sp.	DRC	2015–2017‡	Luminex	157	0–0 (0–0)	0/1,395 (0)
	Hipposideros sp.	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	837	0–0 (0–0)	
	Hipposideros sp.	DRC	1979–1980 (*26*)	IFA	69	0 (0)	
	Hipposideros sp.	Guinea	2015–2017‡	Luminex	288	0–0 (0–0)	
	Hipposideros sp.	Guinea	2014 (*11*)	ELISA	44	0 (0)	
Miniopteridae	*Miniopterus* sp.	Guinea	2015–2017‡	Luminex	27	0–0 (0–0)	0/234 (0)
	Miniopterus sp.	DRC	2015–2017‡	Luminex	205	0–0 (0–0)	
	M. minor	DRC	1995 (*27*)	ELISA	2	0 (0)	
Molossidae	*Chaerephon* sp.	Guinea	2015–2017‡	Luminex	44	0–0 (0–0)	0/401 (0)
	C. pumilus	Guinea	2014 (*11*)	ELISA	1	0 (0)	
	C. ansorgei	DRC	1995 (*27*)	ELISA	120	0 (0)	
	C. major	DRC	1979–1980 (*26*)	IFA	26	0 (0)	
	C. pumilus	DRC	1995 (*27*)	Elisa	210	0 (0)	
	Mops sp.	Guinea	2015–2017‡	Luminex	230	0–0 (0–0)	4–9/705 (0.6–1.3)
	Mops sp.	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	264	1–6 (0.4–2.3)	
	Mops sp.	DRC	1979–1980 (*26*)	IFA	158	0 (0)	
	Mops sp.	DRC	1995 (*27*)	ELISA	28	0 (0)	
	Mops condylurus	Gabon	2003–2008 (*13*)	ELISA	24	3 (12.5)	
	M. condylurus	Guinea	2014 (*11*)	ELISA	1	0 (0)	
	Myopterus whitleyi	DRC	1995 (*27*)	ELISA	2	0 (0)	
Nycteridae	*Nycteris* sp.	Guinea	2015–2017‡	Luminex	15	0–0 (0–0)	0/43 (0)
	Nycteris sp.	Guinea	2014 (*11*)	ELISA	6	0 (0)	
	Nycteris sp.	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	7	0–0 (0–0)	
	Nycteris sp.	DRC	1979–1980 (*26*)	IFA	14	0 (0)	
	Nycteris hispida	DRC	1995 (*27*)	ELISA	1	0 (0)	
Rhinolophidae	*Rhinolophus* sp.	Guinea	2015–2017‡	Luminex	26	0–0 (0–0)	0/86 (0)
	Rhinolophus sp.	DRC	2015–2017‡	Luminex	6	0–0 (0–0)	
	Rhinolophus sp.	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	54	0–0 (0–0)	
Vespertilionidae	*Glauconycteris variegata*	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	3	0–0 (0–0)	0/143 (0)
	Chalinolobus sp.	DRC	1979–1980 (*26*)	IFA	15	0 (0)	
	Eptesicus sp.	DRC	1979–1980 (*26*)	IFA	22	0 (0)	
	Eptesicus tenuipinnis	DRC	1995 (*27*)	ELISA	1	0 (0)	
	Kerivoula sp.	Guinea	2014 (*11*)	ELISA	1	0 (0)	
	Kerivoula sp.	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	1	0–0 (0–0)	
	Myotis bocagii	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	3	0–0 (0–0)	
	M. bocagii	DRC	1995 (*27*)	ELISA	22	0 (0)	
	M. bocagii	DRC	1979–1980 (*26*)	IFA	17	0 (0)	
	Neoromicia sp.	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	5	0–0 (0–0)	
	Pipistrellus nanus	DRC	1995 (*27*)	ELISA	2	0 (0)	
	Scotophilus nux	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	6	0–0 (0–0)	
	Scotophilus leucogaster	Guinea	2015–2017‡	Luminex	15	0–0 (0–0)	
	Scotophilus nigrita	Guinea	2015–2017‡	Luminex	1	0–0 (0–0)	
	Scotophilus dinganii	DRC	1995 (*27*)	ELISA	19	0 (0)	
	Scotophilus sp.	DRC	1979–1980 (*26*)	IFA	10	0 (0)	
Total							4–9/3,023 (0.13–0.30)

*DRC, the Democratic Republic of the Congo; IFA, immunofluorescence assay.

†For data from cited studies, the number of positive samples reported in the original study is indicated. For our results, we show the range in the number of samples simultaneously reactive with glycoprotein and nucleoprotein of Zaire Ebola virus on the basis of 4 different statistical methods used to determine cutoff values.

‡This study.

Tableau 10. Zaire Ebola virus antibodies in frugivorous (Pteropodidae family) bats from our research, Guinea, Cameroon, and the DRC, 2015–2017, and published studies*

Species	Country	Year of study (reference)	Test	No. tested	No. (%) positive	Total, no. positive/tested (%)
Casinycteris ophiodon	Guinea	2014 (*11*)	ELISA	1	0	0/20
Casinycteris argynnis	Gabon, Congo	2003–2008 (*13*)	ELISA	18	0	
C. argynnis	DRC	1995 (*27*)	ELISA	1	0	
Eidolon helvum†	Guinea	2014 (*11*)	ELISA	6	0	21–36/1,551 (1.4–2.3)
	Guinea	2015–2017‡	Luminex	17	0–3 (0–17.6)	
	Ghana	2008 (*14*)	IFA	262	1 (0.39)	
	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	158	1–9 (0.6–5.7)	
	Gabon, Congo	2003–2008 (*13*)	ELISA	49	0	
	DRC	1979–1980 (*26*)	IFA	6	0	
	DRC	2015–2017‡	Luminex	305	0–4 (0–1.3)	
	Zambia	2006–2013 (*16*)	ELISA	748	19 (2.55)	
Epomophorus gambianus	Guinea	2015–2017‡	Luminex	191	0–1 (0–0.5)	4–5/244 (1.6–2.0)
	Ghana	2007 (*15*)	ELISA	37	4 (10.82)	
Epomophorus wahlbergi	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	16	0–0 (0–0)	
Epomops buettikoferi	Guinea	2014 (*11*)	ELISA	17	0	47/1,269 (3.7)
	Guinea	2015–2017‡	Luminex	4	0–0 (0–0)	
Epomops franqueti	Ghana	2007 (*15*)	ELISA	27	3 (11.2)	
	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	256	0–0 (0–0)	
	Gabon, Congo	2001–2005 (*6*)	ELISA	117	8 (6.8)	
	Gabon, Congo	2003–2008 (*13*)	ELISA	805	36 (4.5)	
	DRC	2015–2017‡	Luminex	20	0–0 (0–0)	
	DRC	1979–1980 (*26*)	IFA	21	0	
	DRC	1995 (*27*)	ELISA	2	0	
Hypsygnathus monstrosus	Guinea	2015–2017‡	Luminex	8	0–0 (0–0)	15–18/347 (4.3–5.2)
	Guinea	2014 (*13*)	ELISA	1	0	
	Ghana	2008 (*14*)	IFA	3	0	
	Ghana	2007 (*15*)	ELISA	16	2 (12.5)	
	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	176	0–3 (0–1.7)	
	Gabon, Congo	2001–2005 (*6*)	ELISA	17	4 (23.5)	
	Gabon, Congo	2003–2008 (*13*)	ELISA	125	9 (7.2)	
	DRC	2015–2017‡	Luminex	1	0–0 (0–0)	
Lissonycteris angolensis	Guinea	2014 (*11*)	ELISA	45	0	0–2/129 (0–1.6)
	Guinea	2015–2017‡	Luminex	32	0–0 (0–0)	
	DRC	2015–2017‡	Luminex	22	0–0 (0–0)	
	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	30	0–2 (0–6.7)	
Megaloglossus azagnyi	Guinea	2014 (*11*)	ELISA	3	0	0/110
Megaloglossus woermanni	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	19	0–0 (0–0)	
	Gabon, Congo	2003–2008 (*13*)	ELISA	49	0	
	DRC	2015–2017‡	Luminex	1	0–0 (0–0)	
	DRC	1995 (*27*)	ELISA	38	0	
Micropteropus pusillus	Guinea	2015–2017‡	Luminex	18	0–0 (0–0)	4/339 (1.2)
	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	2	0–0 (0–0)	
	Gabon, Congo	2003–2008 (*13*)	ELISA	197	4 (2.04)	
	DRC	2015–2017‡	Luminex	44	0–0 (0–0)	
	DRC	1995 (*27*)	ELISA	78	0	
Myonycteris leptodon	Guinea	2014 (*11*)	ELISA	21	0	23–27/708 (3.2–3.8)
Myonycteris torquata	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	21	0–0 (0–0)	
	Gabon, Congo	2001–2005 (*6*)	ELISA	58	4 (6.9)	
	Gabon, Congo	2003–2008 (*13*)	ELISA	573	19 (3.32)	
	DRC	2015–2017‡	Luminex	35	0–0 (0–0)	
Nanonycteris veldkampii	Guinea	2014 (*11*)	ELISA	17	0	0/21
	Ghana	2007 (*15*)	ELISA	4	0	
Rousettus aegyptiacus	Guinea	2015–2017‡	Luminex	228	0–1 (0–0.4)	24–33/666 (3.6–5.0)
	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	131	0–8 (0–6.1)	
	Gabon, Congo	2003–2008 (*13*)	ELISA	307	24 (7.8)	
Scotonycteris zenkeri	Cameroon	2015–2017‡	Luminex	1	0–0 (0–0)	0–0/1 (0–0)
Total						138–172/5,405 (2.55–3.18)

*DRC, the Democratic Republic of the Congo; IFA, immunofluorescence assay.
†For cited studies, the number of positive samples reported in the original study is indicated. For our results, we show the range in the number of samples simultaneously reactive with glycoprotein and nucleoprotein of Zaire Ebola virus on the basis of 4 different statistical methods used to determine cutoff values.
‡This study.

DISCUSSION

To clarify the role of bats in Ebola virus ecology and identify where the virus circulates between outbreaks, we tested >4,000 bats, almost doubling the total number of samples tested in all previous studies in Africa (Pigott et al., 2016; Leroy et al., 2005; Leendertz et al., 2016; Han et al., 2016). We provided data on bats from Cameroon, added to the existing data on bats from Guinea and the DRC, and substantially increased the data available on insectivorous bats. We tested samples with the same assay, enabling comparison across species and countries. We used different statistical methods to determine positive sample numbers and expressed the proportion of reactive samples as a range on the basis of the different cut-off values proposed by those methods. As has been done in studies of human Zaire Ebola virus survivors (Ayouba et al., 2017; Rimoin et al., 2018), we defined Zaire and Sudan Ebola virus positivity as the presence of antibodies to both nucleoprotein and glycoprotein. As such, we estimated that 2–37 (0.05%–0.92%) bats were seropositive for Zaire Ebola virus and 0–30 (0%–0.75%) bats were seropositive for Sudan Ebola virus (Table 7). Among insectivorous bats, we observed Zaire and Sudan Ebola virus antibodies only in *Mops* sp. bats, an observation that has previously been observed (Pourrut et al., 2009). We provided information on insectivorous *Miniopterus* and *Rhinolophus* bats and extended knowledge on *Mops* and *Hipposideros* bats; all 1,200 *Hipposideros* samples were seronegative. We confirmed the presence of Zaire Ebola virus antibodies in only 1 of 3 frugivorous species in which Zaire Ebola virus RNA has been reported, that is, in *H. monstrosus* but not *E. franqueti* or *M. torquata* bats (Leroy et al., 2005). However, this result might have been influenced by sample size, test used, and interpretation criteria. We confirmed antibodies in *E. helvum* bats and showed that Zaire Ebola virus antibodies are widespread among this species across Africa: Ghana and Zambia, and with our data, also Cameroon, Guinea, and the DRC (Pourrut et al., 2009; Hayman et al., 2010; Ogawa et al., 2015). We confirmed antibodies in *R. aegyptiacus* bats from Cameroon and Guinea, in agreement with previous findings in these bats from the Congo and Gabon (Pourrut et al., 2009). For *E. gambianus* bats from Ghana, we also observed Zaire Ebola virus reactivity of samples from this species in Guinea (Hayman et al., 2012). In contrast with a previous study, we observed Sudan Ebola virus antibodies (not Zaire Ebola virus antibodies) in *M. pusillus* bats (Pourrut et al., 2009). We also identified Zaire Ebola virus antibodies in *L. angolensis* bats from Cameroon, although only when using less stringent cut-off calculations. When combining data from

previous Zaire Ebola virus seroprevalence studies in bats with data from our study, only 1 insectivorous bat species (*Mops* sp.) and 8 frugivorous bat species (*E. helvum*, *E. gambianus*, *E. franqueti*, *H. monstrosus*, *L. angolensis*, *M. pusillus*, *M. torquata*, *R. aegyptiacus*) exhibited Zaire Ebola virus antibodies (Pourrut et al., 2009; Hayman et al., 2010; Hayman et al., 2012; Ogawa et al., 2015). As seen in bat samples from Zambia, we observed in this study Sudan Ebola virus antibodies in *E. helvum* bats from Guinea, Cameroon, and the DRC, suggesting that Zaire and Sudan Ebola viruses co-circulate and could be widespread among this species. However, only 1 other study has tested for Ebola viruses other than Zaire Ebola virus in *E. helvum* bats (Ogawa et al., 2015). In our study, we also observed Sudan Ebola virus antibodies in *Mops* sp., *H. monstrosus*, and *R. aegyptiacus* bats in Cameroon. Almost all samples were positive for either Zaire or Sudan Ebola virus but not for both. Despite the presence of Ebola virus antibodies, the role of bats as reservoir species remains unclear because viral RNA detection is rare. In only 1 study Zaire Ebola virus RNA was amplified in a few bats (Leroy et al., 2005). Thus, antibodies might reflect previous acute infection with viral clearance. Unlike inoculations with Marburg virus (Paweska et al., 2016; Amman et al., 2015; Schuh et al., 2017), experimental inoculation of *R. aegyptiacus* bats with Zaire Ebola virus leads to antibody development but infrequent or absent detection of viral RNA or shedding (Paweska et al., 2016; Jones et al., 2015). *R. aegyptiacus* bats are therefore able to clear Zaire Ebola virus after a short infectious period without viral shedding and with little or no transmission. No antibodies or viral RNA were detected in non-inoculated bats housed with experimentally Zaire Ebola virus– infected bats (Paweska et al., 2016). Whether this low level of infectiousness also occurs for other bat species that carry Ebola virus antibodies remains to be determined. Zaire Ebola virus was experimentally inoculated in other bat species (*M. condylurus*, *Chaerephon pumilus*, and *Epomophorus wahlbergi*) in only 1 study; virus replication was seen in all species, and fecal shedding was seen in *E. wahlbergi* bats (Swanepoel et al., 1996). *R. aegyptiacus* bats experimentally infected with Marburg virus were shown to develop antibodies that protect against reinfection (Storm et al., 2018). Long-term survival with Zaire Ebola virus antibodies has been reported with *E. helvum* bats from Ghana but without information on protection (Hayman et al., 2010). Among insectivorous bats, the presence of Ebola virus antibodies in only *Mops* sp. is striking, suggesting higher exposure or susceptibility compared with other insectivorous bats.

In conclusion, we demonstrated higher rates of Ebola virus antibodies in frugivorous than in insectivorous bats. The total number of frugivorous species shown to be Zaire Ebola virus seropositive has increased to 8, and 1 insectivorous bat species (*Mops* sp.) was confirmed to be seropositive. Zaire and Sudan Ebola viruses circulate in different species across Africa, with potential co-circulation of both viruses in some species. Although we have data on >8,000 bats from ≥40 species, this sample size is small, given the high numbers of bats that constitute colonies. This study illustrates the complexity of tracking the animal reservoir of Ebola viruses, not only because sampling of wild bats without performing euthanasia is difficult and time-consuming but also because of the absence of a reference standard for serologic tests. To clarify the significance of Ebola virus antibodies, documenting the extent to which viral RNA and shedding can be detected in species with antibodies is crucial for predicting and controlling the risk for new outbreaks. Efforts must continue not only to sample bats but also other animals to elucidate where the virus circulates in wildlife.

Acknowledgments

We thank the staffs from the Ministry of Health and Ministry of Environment and the national ethics committees from the DRC, Cameroon, and Guinea for permission to perform this study. We thank all the field staff from the DRC (Guy Midingi and Servet Kimbonza); Guinea (Souana Goumou, Mamadou Kalif Diallo, Pépé Justin Beavogui, Philippe Kolié, Michel Guilavogui); and Cameroon (Innocent Ndong Bass, Aime Mebenga, Joseph Moudindo, Thomas Atemkem) for the collection of bat samples. We thank the staffs of the National Institute of Biomedical Research (Kinshasa, the DRC), the Kongo Central Provincial Government (Matadi, the DRC), and Projet PRESICA; Donald Mbohli from Project Grand Singes; and the staff of the Institut National de Santé Publique (Conakry, Guinea) for logistical support in the field. We thank Seny Mane for his involvement and support in the implementation of this project and Daouda Bangoura for his constant support for this project and the facilitation of field missions. We thank the veterinary staff from the Parc Zoologique de Montpellier and Wilhelma Zoo and Botanical Garden for providing control samples. This work was supported in part by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Ebola Task Force, REACTing, EBO-SURSY project funded by the European Union, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), and Christophe Mérieux Prize 2015 (to J-.J.M.T.). A.K.K. was supported

by a fellowship from the IRD and the University of Montpellier (MUSE, ANR-16-IDEX-0006). C.-J.V.-A. was supported by a fellowship from IRD, Labex EpiGenMed via the National Research Agency, Programme for Future Investment (ANR-10-LABX-12-01), and the University of Montpellier.

Supplemental info

Adaptation of serological assay for screening of bats

Most studies on EBV serology from bats have tested plasma/sera diluted between 1/50 and 1/400 (Pourrut et al. 2009, Leirs et al. 1999, Hayman 2010 and 2012, Ogawa et al. 2015). In order to test adequacy of these dilutions, we first titrated plasma samples obtained from bats living in a European Zoo (Germany) and from wild bats collected in Cameroon. For the European bats we performed dilutions from 1/200 to 1/2000 of four samples from *Pteropus giganteus* and four from *Rousettus aegypticus* that we tested on the antigens of our panel. At each of the five dilutions tested, the measured MFI were below 500 on all antigens, and even below 200 MFI when the plasma was diluted 1/2000. Next, we tested 20 bat samples from Cameroon diluted 1/200, 1/400 and 1/800 on the same antigens. For these samples, MFI as high as 6,000 to 12,000 were observed at the dilutions of 1/800 and 1/200, respectively. If European bat samples were considered EBV negative and used to calculate cut-off values, antibodies prevalence to EBV can reach up to 80% for SUDV-GP for example at the 1/200 dilution. Even with our stringent NP+GP positivity criteria, the proportion of EBOV positive samples ranged between 66% and 22% for the dilutions of 1/200 and 1/800, respectively. Therefore, we tested all bat samples at a dilution of 1/2000 in order to have a stricter significance threshold and to identify the samples that are most likely to be true positives.

Table S1 : MFI cut-off values calculated with different methods as described in Methods section for the different EBV [Zaire (EBOV), Sudan (SUDV), Bundibunyo (BDBV) and Reston (RESTV)] and the different antigens used per virus.

EBV virus	antigen	Cut-off method			
		Mean+4XSD	**changepoint**	**binomial**	**exponential**
EBOV	NP	71	382	165	76
	GP-K*	128	406	1231	492
	GP-M**	307	484	1475	566
	VP40	75	324	155	76
SUDV	NP	131	608	265	111
	GP	251	929	2831	1089
	VP40	88	294	240	120
BDBV	GP	98	389	714	296
	VP40	363	398	162	369
RESTV	GP	249	147	163	70

* GP-K, GP recombinant protein derived from the EBOV Kissidougou strain from West Africa in 2014

** GP-M, GP recombinant protein derived from the EBOV Mayinga strain from DRC in 1976

Table S2 : Crossreactivity among GP, NP and VP proteins from the different EBV lineages shown as proportion of samples reactive with more than one antigen on the total of samples reactive with at least one NP, GP, or VP protein.

Samples reactive with > 1 EBV lineage/ Total of samples reactive all lineages	mean+4XSD n (%)	changepoint n (%)	binomial n (%)	exponential n (%)
NP	6/151 (3.98)	1/24 (4.17)	1/66 (1.52)	7/158 (4.44)
GP	443/578 (76.7)	131/223 (58.8)	21/65 (32.3)	86/236 (36.5)
VP	35/169 (20.72)	7/38 (18.4)	17/50 (34.0)	40/122 (32.8)

Chapitre 2. Extensive serological survey of multiple African non-human primate species reveals low prevalence of IgG antibodies to four Ebola virus species

The Journal of Infectious Diseases® 2019; XX(XX):1–10. DOI: 10.1093/infdis/jiz006 *EDITOR'S CHOICE*

Editorial Commentary : David T S Hayman, African Primates: Likely Victims, Not Reservoirs, of Ebolaviruses 2019 ; The Journal of Infectious Diseases, jiz007, https://doi-org.gate2.inist.fr/10.1093/infdis/jiz007

Résumé (en Français)

Introduction

La maladie à virus Ebola (Ebola) est une zoonose complexe et chaque épidémie résulte très probablement d'un événement zoonotique indépendant. Les singes ont représenté une source d'infection lors d'épidémies survenues au Gabon, au Congo et en Côte d'Ivoire. Au cours de ces épidémies, un contact récent avec du sang de primates non humains (PNH), lors de la chasse ou du dépeçage de carcasses par le cas index, a été rapporté. En plus, ces épidémies ont coïncidé temporairement et géographiquement avec les épidémies de la maladie à virus Ebola chez les grands singes, associées à des taux de mortalité élevés. Bien que les PNH aient été une source d'infection dans plusieurs épidémies, il y a peu d'informations sur la circulation du virus Ebola chez les PNH, en particulier chez les singes. Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur le rôle potentiel des PNH et avons étudié dans quelle mesure des anticorps contre quatre espèces différentes d'Ebola pouvaient être détectés chez les PNH de la RDC et de la Côte d'Ivoire, deux pays ayant connu une épidémie de la maladie à virus Ebola et du Cameroun, considéré à haut risque d'épidémies futures.

Matériels et Méthodes

Echantillons des primates non-humains

Pour les petits singes, des échantillons de sang ont été prélevé sur la viande de brousse et de singes de compagnie entre 1999 et 2016 dans le cadre d'études antérieures et en cours sur les infections rétrovirales. Des échantillons de viande de brousse ont été collectés sur 14 sites forestiers différents dans le sud du Cameroun (n= 1614) et en RDC (n= 644). Des échantillons d'animaux de compagnie ont été collectés dans 18 sites différents au Cameroun. Les espèces ont été identifiées visuellement sur le terrain et confirmées sur un sous-ensemble d'échantillons par analyse moléculaire.

Pour les grands singes, des échantillons fécaux ont été collecté entre 2005 et 2017 chez des populations sauvages dans 11 sites différents au Cameroun et en RDC dans le cadre d'études antérieures sur les infections rétrovirales. Les échantillons ont été prélevés sur des chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*), des gorilles des plaines de l'Ouest (*Gorilla gorilla gorilla*) et des bonobos (*Pan paniscus*). Dans le cadre d'un programme de suivi vétérinaire à long terme, des échantillons de selles ont été prélevés dans la zone de recherche du parc national de Tai (Côte d'Ivoire) en 2001 et des échantillons de sang ont été prélevés entre 2004 et 2015 chez les PNH immobilisés ou décédés de causes naturelles.

Détection des anticorps anti-virus Ebola

Tous les échantillons de sang total, de plasma, de DBS ainsi que les échantillons fécaux ont été testés en utilisant notre test sérologique décrit précédemment, basé sur la technologie Luminex. Ce test utilise des protéines recombinantes de la nucléoprotéine (NP), de la protéine virale 40 (VP40) et / ou de la glycoprotéine (GP) de différentes espèces du virus Ebola (Zaïre (EBOV), Soudan (SUDV), Bundibugyo (BDBV) et Reston (RESTV)).

Détermination des seuils

En l'absence d'échantillons de contrôle positifs pour les PNH, nous avons analysé nos données obtenues à partir d'échantillons de plasma et DBS avec différentes méthodes statistiques, telles

que rapportées dans notre étude précédente sur les chauves-souris, afin de déterminer les valeurs limites de MFI pour chaque antigène. Nous avons considéré qu'un échantillon était réactif à un antigène si le MFI était supérieur à la valeur seuil. La réactivité aux protéines GP et NP indiquait une positivité spécifique pour EBOV et SUDV.

Pour les échantillons fécaux, nous avons d'abord évalué dans quelle mesure les anticorps du virus Ebola pouvaient être détectés dans les fèces de patients guéris de la maladie à virus Ebola de la cohorte Postebogui en Guinée. Nous avons comparé les valeurs de MFI dans des échantillons de plasma et fèces appariés et adapté les valeurs seuils en fonction des valeurs de MFI observées dans les fèces par rapport au plasma.

Résultats

Diversité d'espèces de PNH testées

Au total, 4649 échantillons de 36 différentes espèces de PNH ont été analysés, 2322 provenant de petits singes et 2327 de grands singes. Au Cameroun, 1614 échantillons ont été testés de 17 espèces différentes. Les espèces prédominantes étaient *Cercopithecus cephus* (34,9%) et *C. nictitans* (27,3%), suivis de *C. pogonias* (11,5%), *Cercocebus agilis* (8,1%) et *Lophocebus albigena* (6,4%). Parmi les 644 échantillons de la RDC, l'espèce de singe prédominante était *Cercopithecus ascanius* (37,4%), suivie de *Piliocolobus tholloni* (13,4%), *C. wolfi* (11,2%), *C. mitis* (7,9%), *Allenopithecus nigroviridis* (7,3%) et *C. lhoesti* (5,8%). En Côte d'Ivoire, parmi les 64 échantillons de singes, *P. badius* (35,9%), *Cercocebus atys* (32,8%) et *Colobus polykomos* (17,2%) étaient prédominants.

Parmi les 2327 échantillons de grands singes, 1182 (51%) provenaient de gorilles de plaine occidentales (*Gorilla gorilla gorilla*) au Cameroun, 353 (15%) de bonobos (*Pan paniscus*) en RDC et 781 (34%) de chimpanzés (46 *P.t. verus* en Côte d'Ivoire, 735 *P.t. troglodytes au* Cameroun).

Faible prévalence des anticorps IgG chez les singes

Aucun échantillon, parmi les 2322 échantillons de petit singe testés, n'a réagi simultanément avec les protéines GP et NP du virus Ebola (EBOV) et nous avons donc considéré qu'aucun de ces

échantillons ne présentait d'anticorps spécifiques de EBOV. Un seul échantillon, provenant d'un *C. cephus* du Cameroun, avait simultanément des anticorps dirigés contre les protéines NP et GP du SUDV. Un babouin (*P.anubis*) a réagi avec les protéines VP et GP de EBOV, SUDV et BDVB et un *C. nictitans* avec VP et GP de BDBV. Tous les autres échantillons n'ont réagi qu'avec un seul antigène ; 0,6% pour NP et 0,5% à 1% pour les différentes protéines VP40. La réactivité la plus élevée a été observée avec les protéines GP variant de 2,2% à 2,6% pour EBOV, SUDV et BDBV ; et 1,5% pour RESTV.

Pas d'évidence d'anticorps IgG chez les grands singes

Aucun des 2316 échantillons fécaux n'a réagi avec les protéines recombinantes utilisées dans notre test. En outre, les 11 échantillons de sang provenant de chimpanzés de la forêt de Tai en Côte d'Ivoire étaient également négatifs.

Discussion

Il existe des preuves que les PNH, en particulier les grands singes, jouent un rôle dans la transmission zoonotique du virus Ebola, mais peu de données sont disponibles sur l'infection au virus Ebola chez les PNH en général. Nous rapportons ici une étude sur 4649 échantillons de PNH représentant 36 espèces différentes. Nous avons observé un seul *C. cephus* au sud Cameroun avec des anticorps anti-GP et NP du SUDV. Nous avons testé 2322 petit singes, contre 930 des études précédentes au Cameroun (n = 177), Gabon (n = 318), RDC (n = 251) et Kenya (n = 184). Dans aucun des 2316 échantillons fécaux de grands singes des anticorps anti-Ebola ont été observée. Ainsi, en combinant les résultats sur les PNH de nos (4649 échantillons) et d'études précédentes (environ 1 300 échantillons), il est clair que les anticorps anti-virus Ebola ne sont pas répandus parmi les PNH, ce qui confirme que les PNH ne sont pas des espèces réservoirs et que, si l'infection par le virus Ebola se produit, probablement peu d'animaux survivent.

Extensive serological survey of multiple African non-human primate species reveals low prevalence of IgG antibodies to four Ebola virus species

The Journal of Infectious Diseases® 2019; XX(XX):1–10. DOI: 10.1093/infdis/jiz006

Ahidjo Ayouba 1, Steve Ahuka-Mundeke 2,3, Christelle Butel 1, Placide Mbala Kingebeni 2, Severin Loul 4, Nikki Tagg 5, Christian-Julian Villabona Arenas 1, Audrey Lacroix1 , Simon-Pierre Ndimbo-Kumugo 2, Alpha K. Keita 1,7, Abdoulaye Toure 6,7, Emmanuel Couacy-Hymann8, Sebastien Calvignac-Spencer 9, Fabian H. Leendertz 9, Pierre Formenty10, Eric Delaporte 1 , Jean-Jacques Muyembe-Tamfum 2,3, Eitel Mpoudi Ngole 11, Martine Peeters 1.

1. TransVIHMI/INSERM1175, Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and University of Montpellier, Montpellier, France
2. Institut National de Recherche Biomédicales (INRB), Kinshasa, Democratic Republic of Congo.
3. Service de Microbiologie, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Kinshasa, Democratic Republic of Congo.
4. Ministry of Livestock, Fisheries and Animal Industries, Yaoundé, Cameroon
5. Projet Grands Singes, Centre for Research and Conservation, Royal Zoological Society of Antwerp, 2018 Antwerp, Belgium
6. Chaire de Santé Publique, Université Gamal Abdel Nasser de Conakry, Conakry, Guinée
7. Centre de Recherche et de Formation en Infectiologie de Guinée (CERFIG), Conakry, Guinée
8. Laboratoire National D'appui au Développement Agricole/Laboratoire Central de Pathologie Animale, Bingerville BP 206, Cote D'Ivoire
9. Epidemiology of Highly Pathogenic Microorganisms, Robert Koch Institute, Berlin, Germany.
10. World Health Organization, Emerging and Dangerous Pathogens Laboratory Network, Geneva, Switzerland
11. CREMER/IMPM, Yaoundé, Cameroon

Summary of article's main point

Non-human primates (NHP) were the source of infection in several human Ebola virus outbreaks. Testing more than 4600 samples from 36 NHP species showed that Ebola antibodies are not widespread, supporting that NHPs are intermediate hosts for Ebola virus.

ABSTRACT

Bats are considered a reservoir species for Ebola viruses, but non-human primates (NHP) have represented a source of infection in several outbreaks in humans. Here we report serological screening of blood or fecal samples from monkeys (n=2,322) and apes (n=2,327). Thirty-six NHP species from Cameroon, Democratic Republic of Congo and Ivory Coast were tested with a sensitive and specific Luminex-based assay for IgG antibodies to four *Ebolavirus* species. Using the simultaneous presence of antibodies to NP and GP proteins to define positivity, we showed that specific Ebola virus antibodies are not widespread among NHP. Only one mustached monkey (*Cercopithecus cephus*) from Cameroon was positive for Sudan ebola virus. These observations support that NHP are most likely intermediate hosts for Ebola viruses. With the increasing frequency of Ebola outbreaks, it is crucial to identify the animal reservoir and understand the ecology of Ebola viruses to inform disease control.

Key words: monkey; ape; Ebola; Africa; Cameroon; Democratic Republic of Congo; Ivory

INTRODUCTION

Ebola virus disease (EVD) is a complex zoonosis and each reported outbreak is most likely the result of an independent zoonotic event (Pigott et al., 2014). Today it is believed that bats constitute a reservoir and that they infect humans directly or via intermediate hosts, such as non-human primates (NHPs), duikers or other mammals (Leroy et al., 2005; Pourrut et al., 2009). Although without direct evidence, exposure to bat bushmeat is suggested in the 2007 outbreak in Luebo (Democratic Republic of Congo (DRC)) and bats are also suspected to be at the origin of the major EVD outbreak in West Africa in 2014 (Leroy et al., 2009; Mari Saez et al., 2015). For several outbreaks, recent contact with blood of NHP through hunting or butchering of carcasses

by the index individual was reported (Pigott et al., 2014; Pourrut et al., 2005). Apes represented a source of infection in humans in Gabon, Congo and Ivory Coast. Moreover, these human outbreaks coincided temporally and geographically with EVD outbreaks in apes, associated with high mortality rates (Rouquet et al., 2005; Bermejo et al., 2006; Walsh et al., 2003; Formenty et al., 1999). Contact with monkeys is suspected in at least two outbreaks; in Boende, DRC in 2014 and in the Republic of Congo in 2003 (Maganga et al., 2014; Boumandouki et al., 2005). Interestingly, in the EVD outbreak among chimpanzees in the Tai forest in Ivory Coast in 1994, an association was also observed between the consumption of monkeys (western red colobus) by chimpanzees and their Ebola virus infection rates (Formenty et al., 1999). Between the different EVD outbreaks of 1994 and 2003 in Gabon, 35 mortality and morbidity episodes were reported in wild animals in areas where previous EVD epidemics occurred, involving a wide diversity of NHP species (gorilla, chimpanzee, greater spot-nosed and mustached monkeys, black colobus, mandrill), but also bush pigs, sitatungas, and duikers (Lahm et al., 2007). Unfortunately, no laboratory tests were performed to identify the causes of death.

Today, the role of reservoir and intermediate species in EVD outbreaks is still unclear and better knowledge on circulation of Ebola viruses in different wildlife species is thus necessary.

Despite high mortality rates of Ebola in apes, antibodies have been observed in several wild-born but captive NHP including chimpanzees, gorillas, mandrills, drills, de Brazza monkeys or baboons (Johnson et al., 1982; Leroy et al., 2004). These observations suggest that Ebola could be widespread among NHP and that non-lethal and asymptomatic or pauci-symptomatic infections occur in certain NHP species, as seen in humans (Reed et al., 2014; Glynn et al., 2017). Moreover, a recent study showed that 10% of gorillas from an area with a high lethal EVD outbreak possess antibodies, suggesting that some infected animals can survive from the disease. More importantly, these observations also suggest that Ebola viruses circulate in areas where no outbreaks have yet been reported, such as Cameroon or Kenya (Johnson et al., 1982; Leroy et al., 2004). This is also the case for bats where antibodies have been detected in animals from West (Ghana, Nigeria), west Central (Cameroon) or East Africa (Zambia) and Asia (Bangladesh or China) (Hayman et al., 2012; Ogawa et al., 2015; Olival et al., 2013).

One difficulty regarding interpretation and comparison of data from the different studies on NHP, bats or other wildlife species, is the diversity of antibody assays employed, criteria used to define positivity and the Ebola viruses that they target. For exemple, among the five studies that reported today on Ebola in NHP, antibody detection was done using immunofluorescence, ELISA, or western blot (Johnson et al., 1982; Leroy et al., 2004; Leirs et al., 1999; Breman et al., 1999). To date, four different *Ebolavirus* species have been reported in humans in Africa, initially apparently limited to certain geographic regions: *Zaire Ebolavirus* (EBOV) in west Central Africa (western part of DRC, Gabon and Congo); *Sudan Ebolavirus* (SUDV) in Sudan and Uganda; *Bundibugyo Ebolavirus* (BDBV) in eastern Africa (DRC and Uganda); and *Tai Ebolavirus* (TAFV) in West Africa (Ivory Coast) (Pigott et al., 2014). However, the recent EVD outbreak in West Africa was confirmed as EBOV, showing thus a wider geographical spread of EBOV in Africa. EBOV was also identified in the last outbreak in eastern DRC (North Kivu), although previous outbreaks in this area where due to BDBV and SUDV [Pigott et al., 2014; Mbala et al in preparation]. The majority of existing data on wildlife report only on EBOV, but in analogy to EBOV it cannot be excluded that the other Ebola viruses have a larger geographical spread than actually observed. Therefore, we developed a high throughput Luminex-based assay that included antigens from the Zaire (EBOV), Sudan (SUDV) and Bundibunyo (BDBV) Ebola viruses from Africa as well as from Reston (RESTV), which has to date only been reported in macaques and pigs from Asia and is apparently not harmful to humans (Cantoni et al., 2016).

The frequency of EVD outbreaks seems to have recently increased, for example between May 2017 and July 2018, three independent EVD outbreaks occurred in three different provinces in DRC, and two outbreaks reached densely populated cities (CDC, https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/index2018.html). Therefore, studies on the ecology and animal reservoir of Ebola viruses are now urgently needed in order to quantify risks for future outbreaks and implement prevention measures. Although NHP have been a source of infection in several outbreaks, only limited and disparate information is available on Ebola in NHP, especially in monkeys. Here, we focused on the potential role of NHP and studied to what extent antibodies to four different Ebola species can be detected in NHP from DRC and Ivory Coast, two countries

that have experienced EVD outbreaks and from Cameroon, considered at high risk for future outbreaks (Pigott et al., 2014).

MATERIALS AND METHODS

Samples from monkeys and apes

Samples were collected from bushmeat and pet monkeys between 1999 and 2016 as part of previous and ongoing studies on retroviral infections (Peeters et al., 2002; Aghokeng et al., 2010; Ahuka-Mundeke et al., 2017; Ahuka-Mundeke et al., 2011). Bushmeat samples were collected at 14 different forest sites in southern Cameroon and the DRC **(Figure 12)**. Samples from pets were collected at 18 different sites in Cameroon **(supplemental Figure S1)**. Whole blood was collected from monkey bushmeat, either by intracardiac puncture and subsequent storage at - 20°C, or by whole blood collection at the points of hunting injury and spotting, as a dried blood spot (DBS) on Whatman 903 filter paper (GE-Healthcare, PA, USA) as described previously (Aghokeng et al., 2010; Ahuka-Mundeke et al., 2017). Blood was drawn on EDTA tubes from pet monkeys by venipuncture after tranquilization with ketamine (Peeters et al., 2002). Species were visually identified in the field and confirmed on a subset of samples by sequence analysis, as previously described (Peeters et al., 2002; Aghokeng et al., 2010; Ahuka-Mundeke et al., 2017; Ahuka-Mundeke et al., 2011).

Fecal samples were collected between 2005 and 2017 from wild ape populations at 11 different sites in Cameroon and DRC as part of previous studies on retroviral infections (Van Heuverswyn et al., 2007; D'arc et al., 2015; Li et al., 2012) **(Figure 12).** Samples were collected from central chimpanzees (*Pan troglodytes troglodytes*), western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) and bonobos (*Pan paniscus*). Most samples were collected around night nests and feeding sites, but also opportunistically. Samples were stored in RNA*later* (Ambion, Austin, TX), kept at ambient temperature in the field for maximum 3 weeks, and then stored at -20 or -80°C. In the framework of a long-term veterinary follow-up program approved by the competent local authorities, fecal samples were obtained in the research area of the Tai National Park (Côte d'Ivoire) in 2001 and blood samples between 2004 and 2015 from either immobilized or necropsied NHP that died of

natural causes. The study was approved by the respective Ministries of Environment, Research and/or Health and the National Ethics Committees.

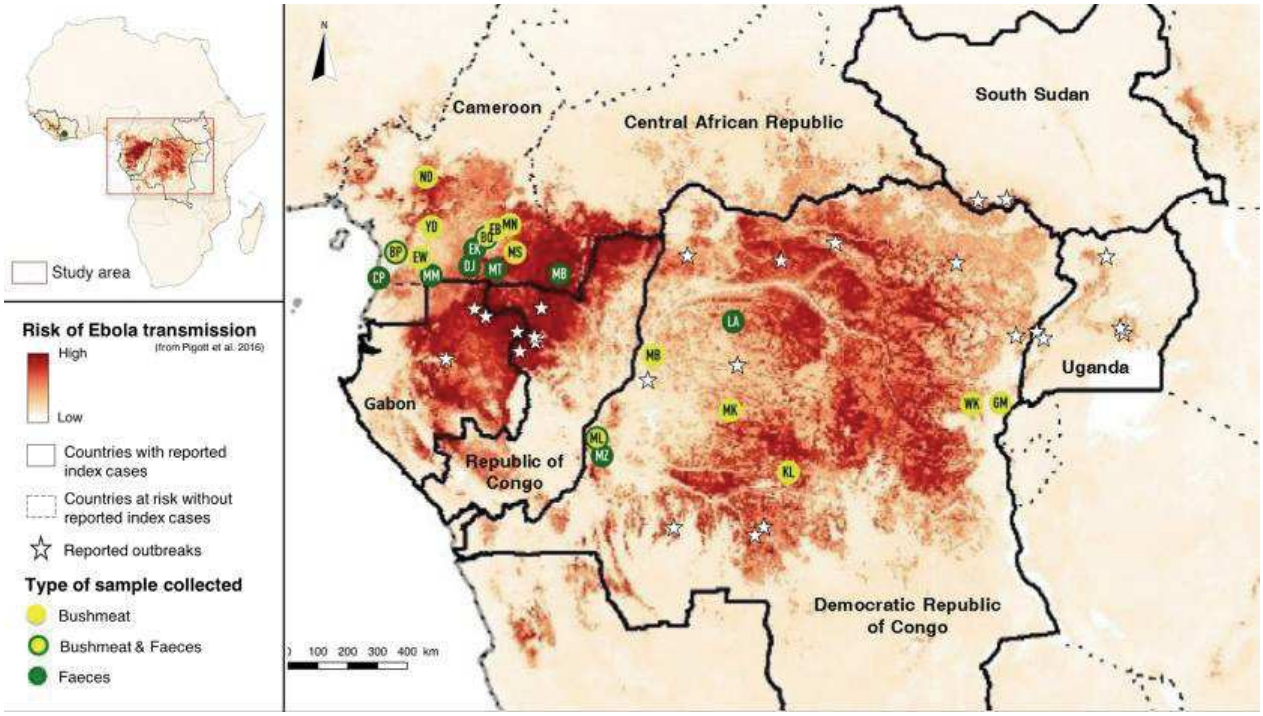


Figure 12. Collection sites. Sites where samples from nonhuman primates were collected are highlighted with circles on the maps, as follows: yellow indicates sites where bushmeat samples from monkeys were collected; green, sites where fecal samples from apes were collected; yellow and green, sites where bushmeat samples from monkey and fecal samples from apes were collected. The samples from Tai forest in Ivory Coast are not shown. Maps are adapted from Pigott et al. (Pigott et al., 2016); area closer to dark red are estimated at highest risk for Ebola virus spillover events, and areas in light yellow are least at risk. Abbreviations: BP, Bipindi; BQ, north of Dja; CP, Campo; DJ, Djoum; EB, Mindourou; MS, Messok; MT, Mintom; MZ, Manzana; ND, Nditam; WK, Walikale; YD, Yaoundé.

Screening for Ebola virus antibodies

All samples were tested using our previously described serological assay based on Luminex technology (Ayouba et al., 2017). Recombinant proteins of Nucleoprotein (NP), Viral Protein-40 (VP40) and/or Glycoprotein (GP) for different Ebola virus species (Zaire (EBOV), Sudan (SUDV),

Bundibugyo (BDBV) and Reston (RESTV)) are used in this assay (Ayouba et al., 2017). Whole blood, plasma and DBS samples were tested at a final dilution of 1/1,000 in assay buffer, taking into account the hematocrit of 50% in reconstituted plasma from DBS or whole blood. For all fecal samples, RNA*later*TM precipitated immunoglobulins were resolubilized by diluting the faecal/RNA*later*TM mixture (2 ml) with PBS-Tween-20 (7 ml), followed by incubation for 1 hr at 60ºC, centrifugation (3,900 g for 10 min) to clarify the solution, and dialysis against PBS overnight at 4ºC (Van Heuverswyn et al., 2007; D'arc et al., 2015; Li et al., 2012). The reconstituted extracts were then tested in the Luminex assay as previously described (Ayouba et al., 2017). Briefly, tests were performed in 96-well flat-bottomed filter plates (Millipore, Tullagreen, Ireland), 100µl of samples (final plasma dilution 1:1,000; final fecal sample dilution 3/4) were incubated with 50µl of beads for 16h at +4°C in the dark on a plate shaker at 300 rpm/min. After washing with assay buffer, 50µl of anti-human IgG-biotin labeled (BD-Pharmingen, Le Pont De Claix, France) were added at a concentration of 4µg/ml in each well and incubated for 30mn in the dark while shaking at 300rpm. After washing, 50µl streptavidin-R-phycoerythrin (Fisher Scientific/Life technologies, Illkirch, France) at 4µg/ml were added per well and incubated for 10mn while shaking at 300rpm. Antigen/antibody reactions were subsequently read on BioPlex-200 equipment (BioRad, Marnes-la-Coquette. France); at least 100 events were read for each bead set, and the results were expressed as MFI (Median Fluorescence Intensity) per 100 beads.

Determination of cut-off values

In the absence of positive control samples for NHP, we analyzed our data obtained from plasma and DBS samples with different statistical methods to determine MFI cut-off values for each antigen as reported in our previous study on bats (Yuan et al., 2012; Peel et al., 2013; Gilbert et al., 2013). We used a change-point analysis (Lardeux et al., 2016) with the R package "change-point" (Killick et al., 2014) and calculated one single shift in the arithmetic mean with the AMOC method (At Most One Change) (Hinkley et al., 1970). In analogy with other studies on Ebola virus serology in bats or wildlife, we also fitted univariate distributions to our data and defined the cut-off based on a 0.001 risk of error (Laing et al., 2018). The set of candidate distributions was reduced with a bootstrapped skewness-kurtosis analysis (Cullen et al., 1999). Maximum likelihood

estimation was performed to selected the best-fit distribution based on the Akaike Information Criteria (AIC) using the R library 'fitdistrplus' (Delignette-Muller et al., 2015). The best-fit distribution was the negative binomial but the negative exponential distribution was also used as in other studies on serology in wildlife (Laing et al., 2018). Data were bootstrapped 10,000 times and averaged for each antigen. Analyses were done with the R software version 3.3.2. We then compared the cut-off values identified by the three different methods and calculated their mean as a consensus cut-off that we used in this study **(Table S1)**. We considered a sample antigen reactive if MFI was above the cut-off value. Reactivity to both GP and NP proteins indicated specific EBOV and SUDV positivity (Ayouba et al., 2017).

For fecal samples, we first evaluated to what extent Ebola virus antibodies can be detected in feces from EBOV survivors from the Postebogui cohort in Guinea (Etard et al., 2017). We also spiked different dilutions of EBOV survivor's plasma samples in gorilla fecal dialysates to test the persistence of reactivity in this media. We compared MFI values in paired plasma and fecal samples and adapted the cut-off values in accordance with MFI values observed in feces as compared to plasma.

RESULTS

Diversity of non-human primate (NHP) species tested

A total of 4,649 samples from 36 different NHP species were analyzed, 2,322 were from monkeys and 2,327 from apes. The species in sampling sites reflects the NHP distribution according to the biogeographic areas. The numbers of each monkey species collected at the different sites, illustrated in **Figure 12**, are shown in **Table 11**. In Cameroon, 1,614 samples were tested from 17 different monkey species. The predominant species were *Cercopithecus cephus* (34.9%) and *C. nictitans* (27.3%), followed by *C. pogonias* (11.5%), *Cercocebus agilis* (8.1%) and *Lophocebus albigena* (6.4%). Among the 644 samples from DRC, the predominant monkey species was *Cercopithecus ascanius* (37.4%), followed by *Piliocolobus tholloni* (13.4%), *C. wolfi* (11.2%), *C. mitis* (7.9%), *Allenopithecus nigroviridis* (7.3%) and *C. lhoesti* (5.8%). In Ivory Coast, among the 64

monkey samples, *P. badius* (35.9%), *Cercocebus atys* (32.8%) and *Colobus polykomos* (17.2%) predominated.

Among the 2,327 samples from apes, 1182 (51%) were from western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) in Cameroon, 353 (15%) from bonobos (*Pan paniscus*) in DRC, and 781 (34%) from chimpanzees across Africa including samples from the western (*P.t.verus*, n=46) and central chimpanzee (*P.t.troglodytes*, n=735). **Table 12** displays for each ape species or subspecies numbers collected at each site, illustrated in **Figure 12**.

Low prevalence of Ebola virus IgG antibodies in monkeys

The 2,322 monkey samples were tested for Ebola antibodies with the multiplex antibody assay. The results are summarized for each antigen and for each Ebola virus species in **Table 13**. No sample reacted simultaneously with GP and NP proteins from EBOV, and we therefore considered that none of the samples had specific antibodies to EBOV. Only a single sample, derived from a mustached monkey (*C.cephus*) from Cameroon, had simultaneously antibodies to NP and GP proteins from SUDV. Reactivity to another combination of two antigens, was also low; one baboon (*P.anubis*) was reactive with VP and GP proteins from EBOV, SUDV and BDVB and one greater spot-nosed monkey (*C. nictitans*) with VP and GP from BDBV. All the other samples reacted only with one antigen; 0.6% for NP and 0.5% to 1% reactivity for the different VP40 proteins. Highest reactivity was observed with GP proteins, and ranged from 2.2 % to 2.6% with GP proteins derived from the African Ebola virus species (EBOV, SUDV and BDBV) and was 1.5% for the Asian Ebola species (RESTV). Almost all GP reactive samples were simultaneously reactive to GP proteins from more than one Ebola virus species. Highest reactivities (>2%) to GP proteins were observed in the following species: *Cercopithecus nictitans* and *C. cephus*, *Cercocebus agilis, Chlorocebus tantalus*, and *Colobus polykomos*.

Tableau 11. Number of samples collected for each species at the different collection sites in Cameroon (CM) of Congo (DRC), shown in Figure 12, and Ivory Coast (IC).

Genus	Species	Common Name	CM Pets	CM BP	CM ND	CM YD	CM BQ	CM EW	CM EB	CM MS	CM MN	DRC MB	DRC ML	DRC MK
Allenopithecus	*nigroviridis*	Allen swamp monkey	...	...	...	...	...	...	...	...	...	44	...	2
Cercocebus	*agilis*	Agile mangabey	14	...	...	1	9	...	39	13	55	3	...	...
	atys	Sooty mangabey	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	torquatus	Red-capped mangabey	2	...	...	...	...	4	...	...	...	...	...	...
Colobus	*angolensis*	Angolan colobus	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	4
	guereza	Mantled guereza	1	...	15	8	...	...	2	...	8	1	...	...
	polykomos	King's colobus	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	satanus	Black colobus	...	...	...	...	...	8	...	...	...	...	...	...
Piliocolobus	*badius*	Western red colobus	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	tholloni	Tsuapa red colobus	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	2
Procolobus	*verus*	Olive colobus	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Cercopithecus	*ascanius*	Red-tailed monkey	...	...	...	...	...	...	...	...	...	41	42	12
	campbelli	Campbell's monkey	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	cephus	Mustached monkey	29	6	10	32	25	122	197	14	129	...	...	...
	diana	Diana monkey	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	hamlyni	Hamlyn's monkey	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	lhoesti	l'Hoest monkey	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	mitis	Blue monkey	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	mona	Mona monkey	9	...	...	1	...	...	...	...	...	...	...	...
	neglectus	De Brazza monkey	5	...	...	4	8	2	13	...	2	18	2	1
	nictitans	Greater spot-nosed monkey	42	10	22	66	...	71	35	36	158	9	...	...
	petaurista	Lesser spot-nosed monkey	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	pogonias	Crested mona monkey	5	2	11	19	11	24	31	17	66	...	...	...
	preussi	Preuss monkey	1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	wolfi	Wolf's monkey	...	...	...	...	...	...	...	...	...	21	1	5
Chlorocebus	*tantalus*	Tantalus monkey	15	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Erythrocebus	*patas*	Patas monkey	17	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Lophocebus	*albigena*	Gray-cheeked mangabey	7	...	10	...	...	...	2	16	68	...	...	1
	aterrimus	Black mangabey	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	2
Mandrillus	*leucophaeus*	Drill	1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	sphinx	Mandrill	16	1	...	...	...	10	...	...	...	...	...	...
Miopithecus	*talapoin*	Northern talapoin	8	3	...	1	...	8	...	...	...	...	...	...
Papio	*anubis*	Olive baboon	16	...	...	...	...	1	...	...	...	...	...	...
Total			188	22	68	132	53	250	319	96	486	137	45	29

Collection sites are shown in Figure 1.

Abbreviations: BP, Bipindi; BQ, North Dja; CM, Cameroon; DRC, Democratic Republic of the Congo; EB, Eboumetoum; EW, Ebolowa; GM, Goma; IC, Ivory Coast; KL, Kole; MB, Mbandaka; MK, Monkoto Nditam; TAI, Tai National Park; YD, Yaoundé.

Tableau 12. Number of samples collected for each ape species at the different collection sites shown in Figure 12.

Species	Country and Site	No.
Pan troglodytes verus	Ivory Coast	
	Tai	57
	Subtotal	57
Pan troglodytes troglodytes	Cameroon	
	BQ	120
	CP	114
	DJ	45
	EK	120
	MB	316
	MT	20
	Subtotal	735
Gorilla gorilla gorilla	Cameroon	
	BP	143
	BQ	239
	CP	289
	DJ	167
	EK	72
	MB	161
	MT	22
	MM	89
	Subtotal	1182
Pan paniscus	DRC	
	LA	137
	MZ	166
	ML	50
	Subtotal	353
	Total	2327

Collection sites are shown in Figure 1.

Abbreviations: BP, Bipindi; BQ, North Dja; CP, Campo; DJ, Djoum; DRC, Democratic Republic of Congo; EK, Ekom; LA, Lomako-Yokokala; MB, Mambele; ML, Malebo; MM, Mengame; MT, Mintom; MZ, Manzana.

Tableau 13. Number and Percentage for Each Species Reactive with the Different Antigens Used in the Luminex Assay for Zaïre ebolavirus

				NP	GP	GP	VP40	NP + GP
Genus	Species	Country	No. Tested	EBOV	EBOV-K	EBOV-M	EBOV	EBOV
Allenopithecus	*nigrovidis*	DRC	47	0 (0; .0–7.5)	0 (0; .0–7.5)	0 (0; .0–7.5)	0 (0; .0–7.5)	0 (0; .0–7.5)
Cercocebus	*agilis*	Cam, DRC	134	0 (0; .0–2.8)	4 (3.0; 1.1–7.4)	4 (3.0; 1.1–7.4)	0 (0; .0–2.8)	0 (0; .0–2.8)
	atys	IC	21	0 (0; .0–15.5)	0 (0; .0–15.5)	0 (0; .0–15.5)	0 (0; .0–15.5)	0 (0; .0–15.5)
	torquatus	Cam	6[a]	0	0	0	0	0
Colobus	*angolensis*	DRC	25	0 (0; .0–13.3)	0 (0; .0–13.3)	(0; .0–13.3)	1 (4.0; .7–19.5)	0 (0; .0–13.3)
	guereza	Cam, DRC	36	1 (2.8; .5–14.2)	0 (0; .0–9.6)	0 (0; .0–9.6)	1 (2.8; .5–14.2)	0 (0; .0–9.6)
	polykomos	IC	11	0 (0; .0–25.9)	1 (9.1; 1.6–37.7)	1 (9.1; 1.6–37.7)	0 (0; .0–25.9)	0 (0; .0–25.9)
	satanus	Cam	8[a]	0	0	0	0	0
Piliocolobus	*badius*	IC	23	0 (0; .0–14.3)	0 (0; .0–14.3)	0 (0; .0–14.3)	0 (0; .0–14.3)	0 (0; .0–14.3)
	tholloni	DRC	86	0 (0; .0–4.3)	0 (0; .0–4.3)	0 (0; .0–4.3)	0 (0; .0–4.3)	0 (0; .0–4.3)
Procolobus	*verus*	IC	2[a]	0	0	0	0	0
Cercopithecus	*ascanius*	DRC	241	0 (0; .0–1.6)	1 (0.4; .07–2.3)	2 (0.8; .2–2.9)	2 (0.8; .2–2.9)	0 (0; .0–1.6)
	campbelli	IC	1[a]	0	0	0	0	0
	cephus	Cam, DRC	565	1 (0.2; .03–1.0)	29 (5.1; 3.6–7.3)	34 (6.0; 4.3–8.3)	3 (0.5; .2–1.6)	0 (0; .0–.7)
	diana	IC	3[a]	0	0	0	0	0
	hamlyni	DRC	6[a]	0	0	0	0	0
	lhoesti	DRC	37	1 (2.8; .5–13.8)	0 (0; .0–9.4)	0 (0; .0–9.4)	0 (0; .0–9.4)	0 (0; .0–9.4)
	mitis	DRC	51	0 (0; .0–7.0)	0 (0; .0–7.0)	0 (0; .0–7.0)	0 (0; .0–7.0)	0 (0; .0–7.0)
	mona	Cam	10	1 (10.0; 1.8–40.4)	0 (0; .0–27.8)	0 (0; .0–27.8)	0 (0; .0–27.8)	0 (0; .0–27.8)
	neglectus	Cam, DRC	61	1 (1.6; .3–8.7)	1 (1.6; .3–8.7)	0 (0; .0–5.9)	0 (0; .0–5.9)	0 (0; .0–5.9)
	nictitans	Cam, DRC	448	7 (1.6; .7–3.2)	17 (3.8; 2.4–6.0)	16 (3.6; 2.2–5.7)	3 (0.7; .2–1.9)	0 (0; .0–.9)
	petaurista	IC	3[a]	0	3	3	0	0
	pogonias	Cam, DRC	188	1 (0.5; .1–2.9)	1 (0.5; .1–2.9)	0 (0; .0–2.0)	0 (0; .0–2.0)	0 (0; .0–2.0)
	preussi	Cam	1[a]	0	0	0	0	0
	wolfi	DRC	72	0 (0; .0–5.1)	0 (0; .5–.1)	0 (0; .0–5.1)	0 (0; .5–.1)	0 (0; .0–5.1)
Chlorocebus	*tantalus*	Cam	15	0 (0; .0–20.4)	1 (6.7; 1.2–29.8)	1 (6.7; 1.2–29.8)	0 (0; .0–20.4)	0 (0; .0–20.4)
Erythrocebus	*patas*	Cam	17	0 (0; .0–18.4)	0 (0; .0–18.4)	0 (0; .0–18.4)	1 (5.9; 1.0–26.9)	0 (0; .0–18.4)
Lophocebus	*albigena*	Cam	106	1 (0.9; .2–5.2)	0 (0; .0–3.5)	0 (0; .0–3.5)	0 (0; .0–3.5)	0 (0; .0–3.5)
	aterrimus	DRC	33	0 (0; .0–10.4)	0 (0; .0–10.4)	0 (0; .0–10.4)	0 (0; .0–10.4)	0 (0; .0–10.4)
Mandrillus	*leucophaeus*	Cam	1[a]	0	0	0	0	0
	sphinx	Cam	27	0 (0; .0–12.5)	0 (0; .0–12.5)	0 (0; .0–12.5)	0 (0; .0–12.5)	0 (0; .0–12.5)
Miopithecus	*talapoin*	Cam	20	0 (0; .0–16.1)	0 (0; .0–16.1)	0 (0; .0–16.1)	0 (0; .0–16.1)	0 (0; .0–16.1)
Papio	*anubis*	Cam	17	1 (5.9; 1.4–26.9)	0 (0; .0–18.4)	0 (0; .0–18.4)	1 (5.9; 1.4–26.9)	0 (0; .0–18.4)
Total			2322	15 (0.6; .4–1.1)	58 (2.5; 1.9–3.2)	61 (2.6; 2.1–3.4)	12 (0.5; .3–.9)	0 (0; .0–.2)

Data are presented as No. positive (%; 95% confidence interval) unless otherwise indicated.

Abbreviations: Cam, Cameroon; DRC, Democratic Republic of the Congo; EBOV, *Zaire ebolavirus*; GP, glycoprotein; IC, Ivory Coast; K, Kissoudougou strain; M, Mayinga strain; NP, nucleoprotein; VP40, viral protein 40.

[a]Percentages were not calculated when number of samples tested was <10.

Tableau 14. Number and Percentage of Samples for Each Species Reactive with the Different Antigens Used

Sudan ebolavirus, Bundibugyo ebolavirus and Reston ebolavirus

				NP	GP	VP40	NP + GP	GP
Genus	Species	Country	No. Tested	SUDV	SUDV	SUDV	SUDV	BDBV
Allenopithecus	*nigrovidis*	DRC	47	0 (0; .0–7.5)	0 (0; .0–7.5)	0 (0; .0–7.5)	0 (0; .0–7.5)	0 (0; 0–7.5)
Cercocebus	*agilis*	Cam, DRC	134	0 (0; .0–2.8)	4 (3.0; 1.1–7.4)	2 (1.5; .4–5.3)	0 (0; .0–2.8)	5 (3.7; 1.6–8.4)
	atys	IC	21	2 (9.5; 2.6–28.9)	0 (0; .0–15.5)	0 (0; .0–15.5)	0 (0; .0–15.5)	0 (0; .0–15.5)
	torquatus	Cam	6[a]	0	0	0	0	0
Colobus	*angolensis*	DRC	25	0 (0; .0–13.3)	0 (0; .0–13.3)	0 (0; .0–13.3)	0 (0; .0–13.3)	0 (0; .0–13.3)
	guereza	Cam, DRC	36	0 (0; .0–9.6)	0 (0; .0–9.6)	0 (0; .0–9.6)	0 (0; .0–9.6)	0 (0; .0–9.6)
	polykomos	IC	11	0 (0; .0–25.9)	0 (0; .0–25.9)	0 (0; .0–25.9)	0 (0; .0–25.9)	0 (0; .0–25.9)
	satanus	Cam	8[a]	0	1	0	0	0
Piliocolobus	*badius*	IC	23	0 (0; .0–14.3)	0 (0; .0–14.3)	0 (0; .0–14.3)	0 (0; .0–14.3)	0 (0; .0–14.3)
	tholloni	DRC	86	0 (0; .0–4.3)	0 (0; .0–4.3)	0 (0; .0–4.3)	0 (0; .0–4.3)	0 (0; .0–4.3)
Procolobus	*verus*	IC	2[a]	0	0	0	0	0
Cercopithecus	*ascanius*	DRC	241	2 (0.8; .2–2.9)	1 (0.4; .07–2.3)	1 (0.4; .07–2.3)	0 (0; .0–1.6)	2 (0.8; .2–2.9)
	campbelli	IC	1[a]	0	0	0	0	0
	cephus	Cam, DRC	565	5 (0.9; .4–2.1)	34 (6.0; 4.3–8.3)	4 (0.7; .3–1.8)	1 (0.2; .03–1.0)	30 (5.4; 3.7–7.5)
	diana	IC	3[a]	0	0	0	0	0
	hamlyni	DRC	6[a]	0	0	0	0	0
	lhoesti	DRC	37	0 (0; .0–9.4)	0 (0; .0–9.4)	0 (0; .0–9.4)	0 (0; .0–9.4)	0 (0; .0–9.4)
	mitis	DRC	51	0 (0; .0–7.0)	0 (0; .0–7.0)	0 (0; .0–7.0)	0 (0; .0–7.0)	0 (0; .0–7.0)
	mona	Cam	10	1 (10.0; 1.8–40.4)	0 (0; .0–27.8)	0 (0; .0–27.8)	0 (0; .0–27.8)	0 (0; .0–27.8)
	neglectus	Cam, DRC	61	0 (0; .0–5.9)	1 (1.6; .3–8.7)	1 (1.6; .3–8.7)	0 (0; .0–5.9)	1 (1.6; .3–8.7)
	nictitans	Cam, DRC	448	2 (0.5; .1–1.6)	8 (1.8; .9–3.5)	5 (1.1; .5–2.6)	0 (0; .0–.9)	13 (2.9; 1.7–4.9)
	petaurista	IC	3[a]	0	1	0	0	3
	pogonias	Cam, DRC	188	0 (0; .0–2.0)	0 (0; .0–2.0)	1 (0.5; .1–2.9)	0 (0; .0–2.0)	1 (0.5; .1–2.9)
	preussi	Cam	1[a]	0	0	0	0	0
	wolfi	DRC	72	0 (0; .0–5.1)	0 (0; .0–5.1)	0 (0; .0–5.1)	0 (0; .0–5.1)	0 (0; .0–5.1)
Chlorocebus	*tantalus*	Cam	15	0 (0; .0–20.4)	1 (6.7; 1.2–29.8)	0 (0; .0–20.4)	0 (0; .0–20.4)	1 (6.7; 1.2–29.8)
Erythrocebus	*patas*	Cam	17	0 (0; .0–18.4)	0 (0; .0–18.4)	1 (5.9; 1.0–26.9)	0 (0; .0–18.4)	0 (0; .0–18.4)
Lophocebus	*albigena*	Cam	106	2 (1.9; .5–6.6)	0 (0; .0–3.5)	3 (2.9; .9–8.0)	0 (0; .0–3.5)	0 (0; .0–3.5)
	aterrimus	DRC	33	0 (0; .0–10.4)	0 (0; .0–10.4)	0 (0; .0–10.4)	0 (0; .0–10.4)	0 (0; .0–10.4)
Mandrillus	*leucophaeus*	Cam	1[a]	0	0	0	0	0
	sphinx	Cam	27	0 (0; .0–12.5)	0 (0; .0–12.5)	1 (3.7; .6–18.3)	0 (0; .0–12.5)	0 (0; .0–12.5)
Miopithecus	*talapoin*	Cam	20	0 (0; .0–16.1)	0 (0; .0–16.1)	3 (15.0; 5.2–36.1)	0 (0; .0–16.1)	0 (0; .0–16.1)
Papio	*anubis*	Cam	17	0 (0; .0–18.4)	0 (0; .0–18.4)	1 (5.9; 1.4–26.9)	0 (0; .0–18.4)	0 (0; .0–18.4)
Total			2322	14 (0.6; .4–1.0)	51 (2.2; 1.7–2.9)	23 (1.0; .7–1.5)	1 (0.04; 0–.3)	56 (2.4; 1.9–3.1)

Data are presented as No. positive (%; 95% confidence interval) unless otherwise indicated.

Abbreviations: BDBV, *Bundibugyo ebolavirus*; Cam, Cameroon; DRC, Democratic Republic of the Congo; GP, glycoprotein; IC, Ivory Coast; NP, nucleoprotein; RESTV, *Reston ebolavirus*; SUDV, *Sudan ebolavi*

[a]Percentages were not calculated when the number of samples tested was <10.

No evidence of IgG Ebola virus antibodies in apes

As previously observed for HIV/SIV cross-reactive antibody detection in fecal samples from apes, sensitivity is lower and interpretation criteria needed to be adapted (Van Heuverswyn et al., 2007; D'arc et al., 2015; Li et al., 2012). Therefore, we first tested 57 paired feces (preserved in RNA*later*) and plasma samples from EBOV survivors to evaluate the feasibility and sensitivity of Ebola virus antibody detection in fecal samples. In contrast with the antibody profile observed in plasma (i.e. simultaneous positivity against NP+GP or NP+GP+VP proteins), antibody reactivity in feces was more frequently directed against a single protein, i.e. 57/57 (100%) in plasma versus 18/57 (31.6%) in fecal samples **(Table S2)**. However, 29/57 (50.9%) of fecal samples where reactive with at least one antigen, but a mean decrease of 0.67 to 1.37 log10 of MFI values was observed compared to plasma **(Table S2)**. Thus, we adapted the interpretation criteria in fecal samples to antibody reactivity with a single antigen and decreased the above used cut-off values with 1 log10 value. The lower sensitivity in fecal samples is comparable to that observed for HIV/SIV cross-reactive antibody detection in fecal samples from apes. Using these adapted criteria, none of the 2316 fecal samples reacted with any of the recombinant proteins in the Luminex assay. In addition, the 11 blood samples from western chimpanzees from the Tai forest in Ivory Coast were also negative for all antigens.

DISCUSSION

Although there is evidence that NHPs, and especially apes, play a role in zoonotic transmission of EVD outbreaks, few data are available on Ebola infection in NHP. Here we report an extensive serological survey to four different Ebola virus species in 4,649 NHP samples representing 36 different species. We applied a Luminex-based sensitive and specific antibody assay for the simultaneous detection of antibodies to four of the five species previously described in humans (Ayouba et al., 2017). To identify specific Ebola virus antibodies, we used the same algorithm to NHPs as that developed for human EBOV survivors (i.e., simultaneous positivity to NP and GP recombinant proteins); this was deemed appropriate because a recent study in cynomolgous macaques (*Macaca fascicularis*) naturally infected with Reston Ebola virus (RESTV) revealed also that convalescent macaques having cleared the virus presented antibodies to NP and GP proteins, both by ELISA and immunofluorescence (Taniguchi et al., 2012). As such, we observed

only one mustached monkey (*C.cephus*) from southern Cameroun with antibodies to GP and NP from SUDV. Only two other samples had antibodies to two different antigens from the same Ebola virus species; one *P.anubis* sample was reactive to VP40 and GP proteins from EBOV, SUDV and BDBV, suggesting non-specific or cross-reactivity, and one *C. nictitans* sample from Cameroun was reactive with GP and VP40 from BDBV. This is the first study to have evaluated a large number of monkeys using the same assay and interpretation criteria. We tested 2,322 monkeys compared to the previous total of 930 from studies in Cameroon (n=177), Gabon (n=318), DRC (n=251) and Kenya (n=184) using a wide diversity of antibody detection assays (Johnson et al., 1982; Leroy et al., 2004; Leirs et al., 1999; Breman et al., 1999). In these previous studies, EBOV positive samples were seen in 3/184 captive baboons in a primate center in Kenya and in captive monkeys from Cameroon; in 1/8 De Brazza monkeys, 1/25 baboons and in 1/18 mandrills and 5/34 drills (Johnson et al., 1982; Leroy et al., 2004). In our study, the 27 mandrills and 61 De Brazza monkeys were all negative and one out of 17 baboon samples was reactive with VP40 and GP proteins of different Ebola virus species. The different results may be due to the low numbers tested per species, the different geographic areas, and the different tests used. Antibody detection in fecal samples has been validated and used for Ebola using Western Blot in gorillas that live in areas in Congo with previous EBOV outbreaks, showing that 8/80 (10%) had EBOV antibodies (Reed et al., 2014). In our study, no evidence for Ebola virus antibodies was observed in 2,316 fecal samples, corresponding to around 1,362 apes taken into account previous resampling estimates (Van Heuverswyn et al., 2007; D'arc et al., 2015; Li et al., 2012). Our samples are mainly from areas without previously documented outbreaks, however the majority were obtained in areas considered at risk for outbreaks (Pigott et al., 2014). Moreover, some sites like DJ, MB, MT or MM (Figure 12) that account for more than 650 samples in southern Cameroon are located within 100 to 300 km flight distance from areas of previous outbreaks in Gabon. Moreover, the samples from Ivory Coast were from the Tai National Park where an Ebola outbreak was documented among chimpanzees in 1994 and all fecal samples were collected in 2001 in the specific outbreak area. In contrast, a previous study using blood samples from wild-born but captive chimpanzees and gorillas revealed high EBOV antibody levels in apes: 21/119 (17.7%), 3/71 (4.2%) and 5/35 (14.3%) chimpanzees from Cameroon, Gabon and Republic of Congo, respectively; 2/17 (11.2%) gorillas from Cameroon (Leroy et al., 2004). If EBOV prevalence in apes in Cameroon is as high as suggested in the previous study, we would have expected some

reactive samples. As our assay has been shown to have a >95% sensitivity on human samples (Ayouba et al., 2017) and a 50% sensitivity on fecal samples, we would expect to have observed some reactivity in at least 100 fecal samples from chimpanzees or gorillas.

Reactivity to a single Ebola virus antigen, especially GP, in NHP has to be further explored, for example with neutralization assays, to ascertain whether it corresponds to non-specific antibody reactivity or cross-reactivity with another pathogen, or different kinetics of antibodies to the different Ebola proteins. Recent studies have shown that bats can be infected with Ebola viruses that are different from the species known to infect humans which could induce cross-reactivity with GP antigens (Yang et al., 2017; Goldstein et al., 2018). NHP and bats share habitats and fruits in their diet. Virus transmission from bats to NHP is suggested to occur when primates come in contact with fruit that is contaminated with feces, urine or saliva from infected bats (Leroy et al., 2005; Pourrut et al., 2009). Interestingly, a recent study reported that *Cercopithecus* species hunt roosting bats for consumption, which could be another, and a particularly efficient, route for Ebola virus transmission (Tapanes et al., 2016). Preying on bats has been reported in *C. ascanius* and *C. mitis* species in East Africa, and also in bonobos in DRC (Tapanes et al., 2016; Bermejo et al., 1994). It is also possible that different modes of exposure to Ebola virus could lead to different antibody profiles, i.e. contaminated fruit versus contact with infected bats during hunting. Whereas the majority of the outbreaks have been limited in terms of geographic spread and number of people infected, the 2014-2015 Ebola outbreak in West Africa clearly illustrates the epidemic potential of a single zoonotic transmission in the presence of certain factors in favor of epidemic spread (Alexander et al., 2015). The recent EVD outbreaks in 2018 in the Equateur and Kivu provinces of the DRC also illustrate that the virus can reach urban centers, even in a context of weak mobility infrastructure (CDC, https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/index2018.html).

In conclusion, combining results on NHP from our (4,649 samples) and previous studies (~1300 samples), it is clear that Ebola virus antibodies are not widespread among NHP which confirms that NHP are not reservoir species and that if Ebola virus infection in NHP occurs few animals survive. More samples from NHP, bats and other animal species from different regions across Africa should be studied in order to define which animals play a role in EVD outbreaks by acting as a reservoir species or as an amplifying host species. Nevertheless, with the increasing frequency of Ebola virus outbreaks, three outbreaks in a one-year period in DRC, it becomes

extremely urgent to identify the animal reservoir(s) and to understand the ecology of Ebola viruses. It is estimated that transmission from animals to humans is possible in 23 countries across Central and West Africa with a total of more than 300 million inhabitants, and that at least 22 million of these people live-in high-risk areas (Pigott et al., 2016).

Funding and Acknowledgements

This work was supported in part by grants from INSERM/The EBOLA Task Force, REACTing, the US National Institute of Health [RO1 AI 50529], the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA [ANRS 12125, 12182, 12325] and the Christophe Mérieux Prize 2015 awarded to Prof. JJ Muyembe Tamfum, EBO-SURSY project funded by European Union, International Mixt Laboratory "PreVIHMI" of IRD (Institut de Recherche pour le Developpement). CJVA was supported by a fellowship from IRD and the Labex EpiGenMed, via the National Research Agency, Programme for Future Investment "ANR-10-LABX-12-01" and University of Montpellier. AK was supported by a fellowship from Montpellier Université d'excellence (I-Site MUSE, ANR-16-IDEX-0006). This work has also benefitted from sample collections performed in the course of the DFG projects FOR2136/LE1813/10-1. **Acknowledgments:** We thank the staff and SIV team from Projet PRESICA (Innocent Ndong Bass, Aime Mebenga, Joseph Moudindo, Thomas Atemkem) and Donald Mbohli from Projet Grand Singes for the collection of samples and logistical support in Cameroon. We thank all the field staff from DRC (Mubonga Mukulumanya, Lunguya-Metila Octavie, Mbenzo-Abokome Valentin), Dr Mazongo, Dr Abanda, Dr Jonnhy and all the local Staff in Equateur and Nord-Kivu Province for their collaboration and participation in this study. We thank the staff of the World Wildlife Fund for Nature (WWF/DRC), the Institut National de Recherches Biomédicales (INRB, Kinshasa, DRC), the Bonobo Conservation Initiative, and Vie Sauvage, Didier Mazongo, Octavie Lunguya, Muriel Aloni, and Valentin Mbenzo-Abokome for field work in DRC. We thank the Ivorian authorities, especially the Ministry of the Environment and Forests, as well as the Ministry of Research, the Swiss Research Centre for Scientific Research, the directorship of the Taï National Park as well as the Tai Chimpanzee Projects direction (Dr Wittig), the veterinarians (mainly A. Düx, K. Nowak, A. Lang) and the field assistants for continuous support.

Supplementary Figures and Tables

Supplementary Figure S1. Sites where samples from pet monkeys were collected in Cameroon are highlighted with yellow circles on the map. Map is adapted from Pigott et al [50], areas closer to dark red are estimated at highest risk for Ebola virus spill-over events, areas in light yellow are least at risk.

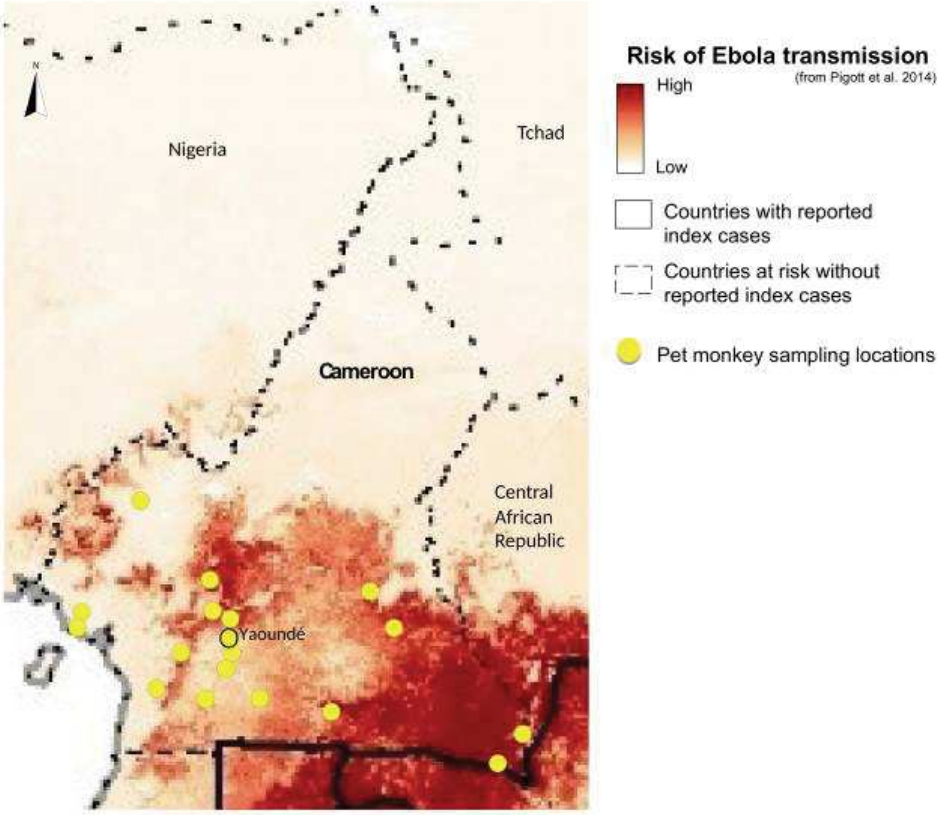


Table S1 : cut-off values obtained with the different methods for each antigen, as described in methods

Antigen	changePoint	binomial	exponential	mean cut-off 3 methods	consensus cut-off used
NP_ZEBV	744	282	168	398	400
GP_ZEBVkiss	2987	5085	2113	3395	3400
GP_ZEBVmay	2574	6029	2546	3716	3700
VP40_ZEBV	640	305	173	372	370
NP_SEBV	1015	669	265	649	650
GP_SEBV	3486	11149	4650	6428	6500
VP40_SEBV	862	568	313	581	600
GP_BEBV	2350	3279	1350	2326	2300
VP40_BEBV	572	272	130	324	300
GP_REBV	237	372	190	266	300

Table S2 : comparaison of antibody detection in paired fecal-plasma samples from EBOV survivors in Guinea**.**

EBOV antigens In reactive samples	Plasma N+/N tested	(%)	Feces* N+/N tested	(%)	mean MFI decrease (Log_{10})
NP	57/57	(100%)	25/57	(43.9%)	1.37
GP	57/57	(100%)	20/57	(35.1%)	0.67
VP	57/57	(100%)	15/57	(26.3%)	0.95
NP+GP	57/57	(100%)	18/57	(31.6%)	
NP+GP+VP	57/57	(100%)	14/57	(24.6%)	
At least one antigen	57/57	(100%)	29/57	(50.9%)	

* presence of MFI signal

Chapitre 3. Investigation zoonotique du virus Ebola à Likati : épicentre de l'épidémie de la maladie à virus Ebola de 2017, en RDC.

Article en préparation

Résumé

Contexte

Au 11 Mai 2017, le ministère de la santé de la RDC a déclaré la 8ème épidémie de la maladie à virus Ebola à Likati, dans la province de Bas-Uélé. Au total huit cas ont été enregistrés dont cinq confirmés et trois probables, parmi lesquels quatre sont décédés. Le dernier cas confirmé a été diagnostiqué le 17 Mai et la fin de l'épidémie a été officiellement déclarée le 02 Juillet 2019 par le ministre de la santé de la RDC. D'après le récit des villageois, le cas index aurait été exposé à la viande cuite d'un potamochère trouvé mort, environ 13 jours avant le début des symptômes, et à la viande grillée de chauve-souris capturée vivante, environ 7 jours avant le début des symptômes.

Matériels et Méthodes

Un consortium d'équipes nationales et internationales a été mis en place, sous la coordination de l'INRB, pour mener des investigations écologiques dans la zone affectée par l'épidémie afin d'identifier la source de contamination et mieux comprendre le réservoir du virus Ebola. Entre 06 Juillet et 18 Août 2017, nous avons procédé aux prélèvements dans la faune sauvage, essentiellement des chauves-souris, des rongeurs et autres petits mammifères, des primates non humains et un potamochère. Ces échantillons ont été testés pour la recherche des anticorps spécifiques en Elisa et Luminex et pour la présence d'ARN du virus Ebola.

Résultats

Au total, nous avons prélevé 1.619 échantillons représentant 488 animaux (chauves-souris, rongeurs, musaraignes, mangouste, primates non-humains et potamochère) et repartis de la manière suivante : échantillons de poumons (n=387), foie (n=388), rate (n=387), sang total

(n=301) et écouvillons oraux et rectaux (n=156). Nous avons également 96 échantillons de fèces des chauves-souris.

La recherche des anticorps anti-virus Ebola a été réalisée chez 384/488 (78,7%) animaux, essentiellement sur les échantillons de sang total séché sur papiers filtres, ainsi que sur 92/96 échantillons de fèces des chauves-souris. Tous les résultats étaient négatifs.

Au total, 413/488 (84,6%) animaux avaient au moins un échantillon analysé par RT-PCR à la recherche de l'ARN du virus Ebola et tous les résultats étaient également négatifs. Soit 1029/1715 (60%) échantillons ont été analysés, parmi lesquels : les échantillons de poumons (83/387 ; 21,4%), foie (85/303 ; 21,9%), rate (361/387 ; 93,3%), fèces (92/96 ; 95,8%), sang total (252/301 ; 83,7%) et les écouvillons oraux/rectaux (156/156 ; 100%).

Discussion

Une fois de plus, la viande de brousse et surtout les chauves-souris sont incriminées comme source de contamination lors d'une épidémie de la maladie à virus Ebola. Sur les animaux analysés, 93,3% ont eu un échantillon de rate analysés parmi ceux dont les échantillons de foie ne sont pas encore analysés. Il est peu probable que les échantillons de foie de ces mêmes animaux soient positifs à la RT-PCR alors que leurs échantillons de rate sont négatifs. Les résultats négatifs obtenus peuvent être expliqués par le faible échantillon collecté par espèce d'animaux, sachant que la prévalence du virus Ebola est généralement très faible dans la faune. Les efforts pour retrouver le réservoir de ce virus doivent continuer car c'est le seul moyen qui nous permettra de prévenir efficacement les prochaines épidémies.

Investigation zoonotique du virus Ebola à Likati : épicentre de l'épidémie de la maladie à virus Ebola de 2017, en RDC.

Article en préparation

Placide Mbala-Kingebeni*(4,5), Sophie Gryseels*(1,2,3), Innocent Akonda (6), Roger Angoyo (7), Pascal Baelo (7), Elie Bugentho (7), Trenton Bushmaker (8), Eric Delaporte (9), Birgit De Smet (10), Ariane Dux (11), Robert Fischer (8), Corneille Kahandi (7), Jimmy Kapetschi (4), Servet Kimbondja (4), Léonce Kouadio (11), André Malekani Bendeke (7), Claude Mande (7), Guy Mdingi (4), Joseph Moudimba (5,12), Eitel Mpoudi Ngole (5,12), Daniel Mukadi (4), Prescott Musaba (7), Patrick Mutombo (7), Innocent Ndong Bass (5,12), Casimir Nebesse (7), Steve Ngoy (7), Simon Pierre Ndibu (4), Stephanie Seifert (8), Jacques Tanzito (7), Dudu Akaibe (7), Nicaise Amundala (7), Kevin Ariën (10), Guy Crispin Gembu (7), Fabian Leendertz (11), Herwig Leirs (1), Jean-Claude Mukinzi (7), Vincent Munster (8), Jean-Jacques Muyemebe-Tamfum (4), Martine Peeters (5), Erik Verheyen (1,13), Steve Ahuka-Mundeke (4)

1. University of Antwerp (UAntwerp), Antwerp, Belgium.
2. University of Arizona (UA), Arizona, USA.
3. KU Leuven, Leuven, Belgium.
4. Institut National de Recherche Biomédicale (INRB), Kinshasa, Democratic Republic of Congo.
5. Institut de recherche pour le développement (IRD), Montpellier, France.
6. Ministère provinciale (Bas Uélé) de santé, Democratic Republic of Congo.
7. Centre de surveillance de la Biodiversité (CSB) de l'Université de Kisangani, Kisangani, Democratic Republic of Congo.
8. Rocky Mountains Laboratory National Institute of Health (RML - NIH), Montana, USA.
9. Université de Montpellier, Montpellier, France.
10. Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.
11. Robert Koch Institute, Berlin, Germany
12. Centre de Recherches sur les maladies émergentes, re-émergentes et la médecine nucléaire (CREMER), Yaoundé, Cameroon.
13. Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels, Belgium.

RESUME

Dans cette étude, notre objectif était d'étudier la présence du virus EBOV dans la faune sauvage, particulièrement chez les (petits) mammifères dans le site où vivait le cas index de l'épidémie d'EBOV de 2017 (Kaigbono, Likati, Bas-Uélé, République Démocratique du Congo), deux mois et demi après le début de cette épidémie. Le cas index avait été exposé à la viande cuite d'un porc (*Potamochoerus porcus*) trouvé mort et à la viande grillée d'une chauve-souris capturée vivante, probablement une *Eidolon helvum*. Avec un total de 5460 pièges au sol pour les mammifères terrestres et 237 tentatives de piégeages avec des filets pour les chauves-souris, nous avons collectés des échantillons de 241 rongeurs, 141 chauves-souris, 79 musaraignes, 5 singes et 1 mangouste, ainsi que des restes du crane du *P. porcus* mentionné ci-dessous. En plus, nous avons collecté 96 échantillons de fèces d'une colonie de chauve-souris (E. helvum). Aucun des 460 individus testés (souvent de manière répétée avec différents protocoles) n'était positif pour l'ARN EBOV par qRT-PCR, et aucun des 272 échantillons de sang et 94 fèces n'était porteur d'anticorps anti-ebolavirus lors du test réalisé avec la technologie Luminex en utilisant 10 antigènes de 4 virus du genre *ebolavirus* (virus Ebola, virus Sudan, Virus Bundibugyo et virus Reston). Le séquençage des gènes mitochondriaux chez 332 animaux a révélé au moins 47 espèces différentes. À l'exception de deux espèces de rongeurs et de deux espèces de chauve-souris, le nombre d'animaux prélevés pour les autres espèces était très faible (1 à 20). Ce qui indique combien il y avait très peu de chance de détecter les anticorps ou l'ARN du virus Ebola dans ce petit nombre d'animaux, lorsqu'on sait que la prévalence du virus Ebola dans la faune sauvage est généralement très faible. En conclusion, il faudra multiplier les efforts de surveillance dans la faune pour trouver le réservoir naturel du virus Ebola, ce qui implique d'importants efforts de piégeage pour atteindre un échantillon suffisant par espèce ; et, Il est également nécessaire de disposer d'un moyen génétique pour identifier avec précision les espèces de petits mammifères capturés dans cette région.

CONTEXTE

En 2017, une épidémie de la maladie à virus Ebola a été déclarée dans la zone de santé de Likati où au total 8 cas (5 cas confirmés et 3 cas probables) ont été enregistré parmi lesquels 4 décès, entre 27 Mars et 01 Juillet 2017 (Nsio et al. 2019). D'après les investigations épidémiologiques, le cas index serait un individu de sexe masculin âgé d'environ 39 ans, habitant à Kaigbono, un des villages du District de Likati, qui aurait présenté des symptômes hémorragiques au 22 Avril et est décédé pendant son transfert du centre de santé de Dendu vers l'hôpital de Likati. Parmi ses contacts, seules les deux personnes qui l'ont transporté à l'hôpital, le conducteur de la moto et son aide, ont développé la maladie quelques jours plus tard. Ces derniers ont ensuite généré d'autres cas dans les aires de santé de Nambwa, Mabangu, Muma et Ngay, parmi lesquels deux ont été confirmés le 11 Mai par RT-PCR à l'INRB et trois autres cas ont été confirmés plus tard par la sérologie dans le laboratoire mobile de l'INRB installé sur terrain à Likati. Le dernier cas confirmé a été diagnostiqué le 17 Mai et le ministère de la santé de la RDC a déclaré officiellement la fin de l'épidémie le 02 Juillet 2017, soit 42 jours après qu'aucun autre cas ne soit rapporté dans la zone (Rapport de l'épidémie de la maladie à virus Ebola, zone de santé de Likati, RDC 2017).

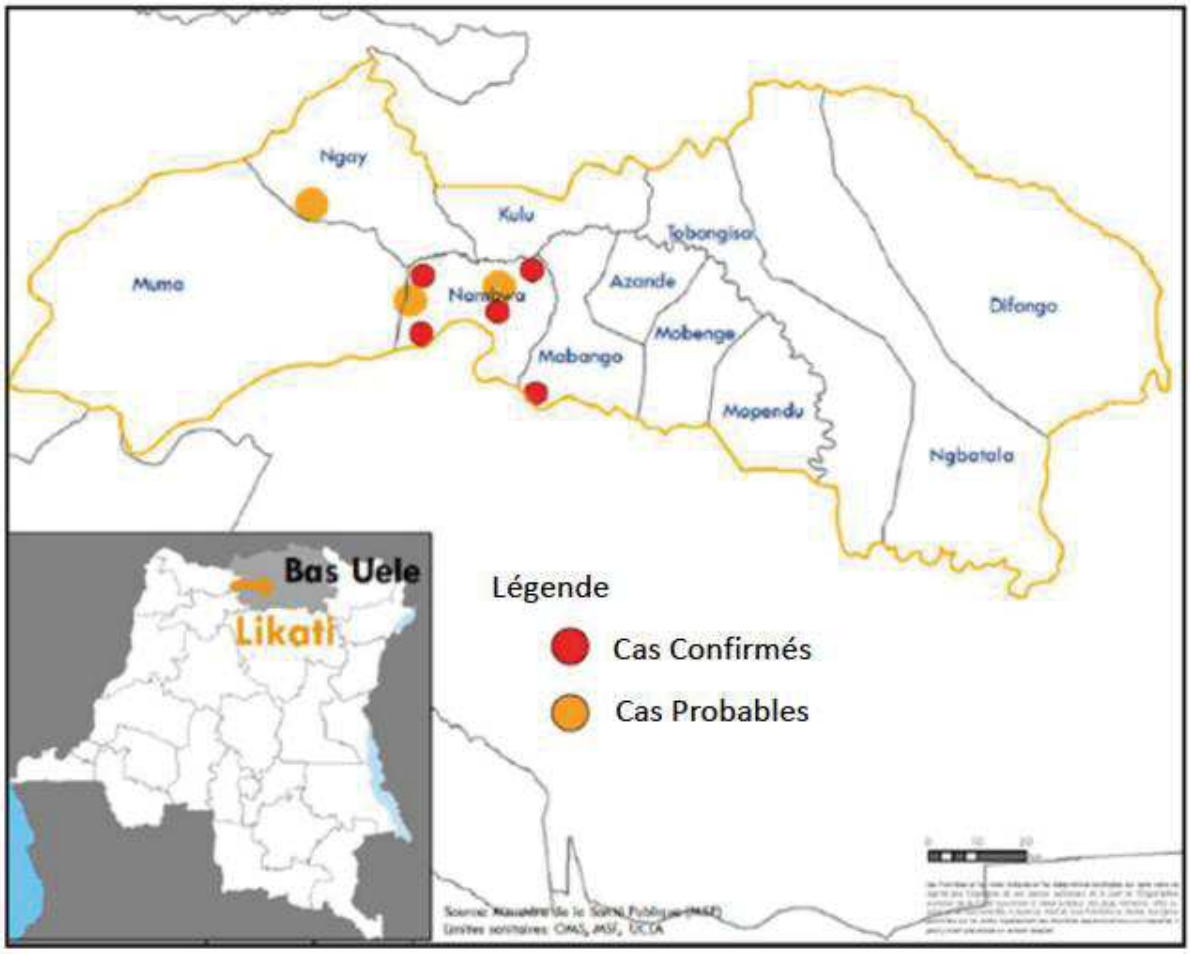


Figure 13. Localisation des cas confirmés et probables dans la zone de santé de Likati, épidémie de la maladie à virus Ebola de 2017, en RDC (adapté du SITREP 28 du 30 Juin 2017) (Ebola Virus Disease, Democratic Republic of Congo : External Situation Report 28, 2017)

Les investigations écologiques ont été conduites du 06 Juillet au 18 Août 2017 principalement à Kaigbono, village où résidait le cas index, dans la zone de santé de Likati. Les activités de terrain étaient difficiles et ont été interrompues à cause de la saison de pluie, entrainant une baisse importante du rendement de notre travail sur terrain.

Selon les récits des villageois, le cas index aurait été en contact, dans les trois semaines avant le début des symptômes, avec deux carcasses d'animaux morts. Il s'agit d'un potamochère roux (*Potamochoerus porcus*), dont le contact remontait à environ 13 jours avant le début des symptômes. Le crâne de l'animal a été retrouvé par l'équipe d'investigation écologique à environ 700 m du village de Kaigbono. Plusieurs personnes dans le village auraient manipulé cette

carcasse (transport, dépeçage et consommation), mais curieusement il a été le seul à développer la maladie.



Figure 14. Crâne du potamochère retrouvé à 700 m du village de Kaigbono, dans la zone de santé de Likati (photos obtenues par courtoisie des membres de l'équipe d'investigation écologique).

Environ 7 jours avant le début des symptômes, il a été également en contact avec des carcasses des chauves-souris frugivores chassées régulièrement dans la zone. Des migrations des chauves-souris sont rapportées par les villageois, habituellement entre Mars et Juillet de chaque année. Pendant notre investigation, des colonies de chauves-souris ont été identifiées, parmi lesquelles on retrouve certaines espèces telles que : *Eidolon helvum*, *Hypsignathus monstrosus* et *Epomops franqueti*. Ces chauves-souris sont régulièrement chassées et consommées par la communauté.



Figure 15. Viande boucanée de chauve-souris consommée par les habitants à Kaigbono (photos obtenues par courtoisie des membres de l'équipe d'investigation écologique).

Les analyses des écouvillons réalisés sur le crâne du potamochère étaient négatives à la RT-PCR pour la recherche de l'ARN du virus Ebola. Toutefois, il est possible qu'après autant de jours, le virus n'ait pas survécu dans les restes de cette carcasse. Cependant, le fait que plusieurs personnes aient manipulé cette carcasse et seule une personne ait développé la maladie semble écarter cet animal comme source probable de contamination. L'autre hypothèse est celle de la chauve-souris dont il a été la seule personne à consommer les carcasses, d'après les récits des villageois, environ 7 jours avant le début des symptômes. Nous rapportons dans ce travail, les investigations écologiques qui ont été menées à la recherche du réservoir du virus Ebola dans la zone de santé de Likati, quelques jours après la fin de l'épidémie de la maladie à virus Ebola de 2017 en RDC. Nous allons également présenter les résultats des analyses réalisées sur les échantillons obtenus au cours de ces investigations.

MATERIELS ET METHODES

Site d'étude

Les prélèvements ont été réalisés principalement à Kaigbono, le village où résidait le cas index. Kaigbono est un petit village de moins de 50 habitants, situé près de la rive de la rivière Likati. Il y a environ 60 ans, il y avait une grande plantation de palmeraie et le village était accessible par

route. Mais actuellement, le village n'est accessible que par la rivière Likati ou par des sentiers étroits à travers la forêt.

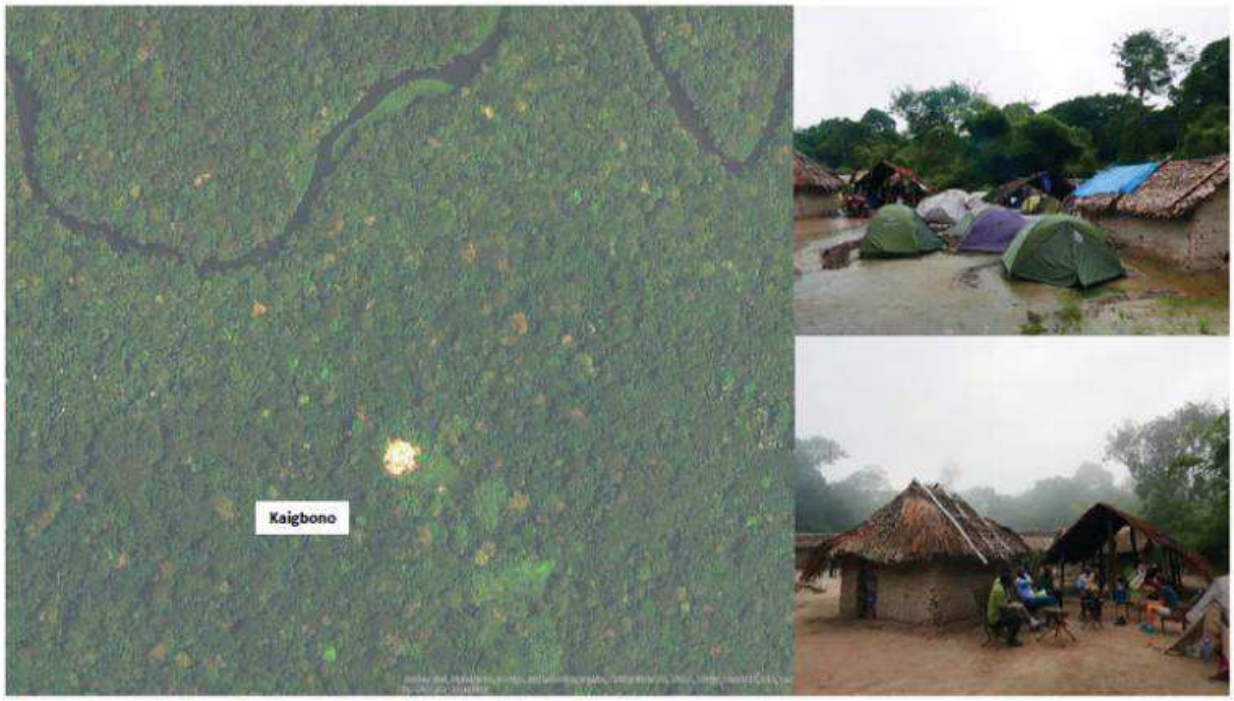


Figure 16. Vue aérienne du site et village des pécheurs de Kaigbono dans le district de Likati, province de Bas-Uélé, RDC (Photos obtenues par courtoisie des membres de l'équipe d'investigation écologique).

Likati est l'un des districts de la province du Bas-Uélé, au nord de la République Démocratique du Congo (RDC). Il est isolé et d'accès difficile surtout en saison de pluie, avec des réseaux de transport et de communication limités. Ce district comprend une population de plus de 80.000 habitants dont plus de 70% vivent principalement de la chasse, de la cueillette et de la pèche. La zone de santé de Likati est subdivisée en 11 aires de santé, correspondant aux différents villages, comprenant chacune un centre de santé. Les infrastructures de ces formations sanitaires sont en majorité en état de vétusté avancée avec des conditions d'hygiène très précaires. La région est caractérisée par un climat tropical, la végétation est dominée par la savane parsemée de forêt-galerie. Il y a une grande activité minière clandestine autour de cette zone (Rapport de l'épidémie de la maladie à virus Ebola, zone de santé de Likati, RDC 2017).



Figure 17. Voies d'accès au district de Likati, province de Bas-Uélé, RDC (Photos obtenues par courtoisie des membres de l'équipe).

Equipe de recherche

Une équipe de recherche a été constituée sous le leadership de l'INRB, incluant : Université de Kisangani (RDC), Unité de TRANSVIHMI (IRD/INSERM/Université de Montpellier, France), Institut Robert Koch (Allemagne), National Institute of Health (Etats-Unis), Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique (Musée des sciences naturelles), Université d'Anvers (Belgique) et Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (Belgique).

Collecte des échantillons

Entre le 06 Juillet et le 18 Août 2017, nous avons réalisé des prélèvements de chauves-souris, rongeurs, des musaraignes, d'une mangouste, des primates non humains et d'un potamochère. Nous avons également collecté des fèces de chauves-souris.

Plusieurs prélèvements ont été fait sur chaque animal ; le sang total, les écouvillons oraux et rectaux, ainsi que les échantillons d'organes tels que poumon, foie et rate.

Les chauves-souris étaient capturées la nuit à l'aide des filets placés dans leurs sites de repos ou de recherche de nourriture ; les rongeurs et les autres petits mammifères terrestres étaient capturés à l'aide des pièges de type Sherman. Pour les primates non humains, les prélèvements étaient occasionnels à partir de la viande de brousse ramenée par un chasseur.

Les échantillons de sang étaient soit conservés directement dans du tampon AVL (Qiagen, Inc., Pays-Bas) soit prélevés sur papier filtre de type Sérobuvard (LDA22®, Zoopole, Ploufragan, France) ou Whatman 903 (GE Healthcare, Feasterville-Trevose, PA, USA), séché à l'air libre, conservé à la température ambiante pendant 2 à 3 semaines, puis transférés à – 20°C pour une conservation plus longue jusqu'au moment des analyses de laboratoire, comme décrit précédemment (Ahuka-Mundeke et al., 2017).

Les tissus et les crottes étaient conservés dans du tampon AVL (Qiagen, Inc., Pays-Bas) ou RNA*later* (Ambion, Austin, TX), gardés à la température ambiante sur terrain pendant 2 à 3 semaines et ensuite transférés à -20 ou -80°C pour une conservation plus longue.



Figure 18. Capture d'animaux et prélèvements d'échantillons par les équipes d'investigation écologique (photos obtenues par courtoisie des membres de l'équipe).

Confirmation moléculaire des espèces

Nous avons confirmé l'identification des espèces enregistrées sur le terrain à l'aide de tests moléculaires. Pour les chauves-souris, nous avons amplifié un fragment d'environ 800 pb du cytochrome b de la mitochondrie en utilisant les amorces cytb-L14724 (avant) et cytb-H15506 (inverse). Nous avons substitué l'amorce cytb-L14724 par cytb-L140217 (5'-ATGACCAACATCC-GAAAATCNCAC-3') pour améliorer les performances de la PCR pour certaines espèces (De Nys et al., 2018). Pour les autres espèces animales, nous avons amplifié un fragment d'environ 386 pb de l'ARN ribosomique 12S mitochondrial (12S-L01091--5'AAAAAGCTTCAAACTGGGATTAGATACCCCACTAT-3'(sens) et 12S-H01478--5'-TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'(antisens)) ou un fragment d'environ 201 à 217 pb de l'ARN ribosomique 16S mitochondrial (5'-AYAAGACGAGAAGACCC-3' (sens) et 5'-GATTGCGCTGT-TATTCC-3' (antisens)) (Van der Kuyl et al., 2000 ; Sarri et al., 2014). Nous avons purifié les produits de PCR via un gel d'agarose (1%) et directement séquencés sur un séquenceur ABI 3500 (Applied

Biosystems, Courtaboeuf, France). Nous avons effectué des analyses BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) pour identifier les espèces les plus similaires. Pour les échantillons avec peu ou pas de similarité (<97%) avec des espèces dans la GenBank, nous avons effectué des analyses phylogénétiques avec des séquences nouvellement obtenues et des séquences de référence pour les différentes espèces en utilisant des méthodes de maximum de vraisemblance mises en œuvre avec PhyML (http: //www.atgc- montpellier.fr/phyml/) pour déterminer le genre.

Extraction des acides nucléiques

Plusieurs méthodes ont été utilisées par différentes équipes, notamment : Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat No./ID: 52906) pour les écouvillons et le sang total ; Qiagen Rneasy Mini kit (Cat No./ID: 74106) pour les tissus obtenus à partir des prélèvements d'organes et NucliSENS miniMag (bioMérieux, Inc.) pour le sang total, DBS, et les tissus, très performant particulièrement pour l'extraction des acides nucléiques à partir du sang séché sur papiers filtres (Guichet E et al., 2018 ; Irwin DM et al., 1991).

Recherche des anticorps anti-virus Ebola

La détection des anticorps anti-virus Ebola a été réalisé à l'aide de deux techniques principalement : (1) ELISA pour la détection des anticorps IgG dirigés contre la glycoprotéine (GP) du virus Ebola (http://www.4adi.com/ccpc2762-29330-human-anti-zaire-ebola-virus-glycoprotein-28gp29-ig-elisa-kit-ae-320620-1.htm#) et (2) Luminex utilisant les protéines recombinantes de NP-ZEBV, GP-ZEBVkiss, GP-ZEBVmay, VP40-ZEBV, NP-SEBV, GP-SEBV, VP40-SEBV, GP-BEBV, VP40-BEBV, GP-REBV. Ce dernier a été validé chez les survivants de la maladie à virus Ebola en Guinée et adapté pour la détection des anticorps chez certaines espèces animales (Ayouba et al., 2017).

Détection de l'ARN du virus Ebola par la RT-PCR

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la recherche de l'ARN viral, notamment : la plateforme Idylla ciblant les glycoprotéines du virus Ebola et du virus Sudan (Cnops et al., 2016) ; ITM GP qPCR ciblant la glycoprotéine du virus Ebola (Cnops et al., 2016) ; NIH Pan Filo L qPCR ciblant

l'ARN polymérase (L) du virus Ebola et du virus Sudan (Emmie de Wit et al., 2016) et VP35 qPCR ciblant la protéine virale (VP) 35, protocole modifié de He et al. (He B et al., 2015).



Figure 19. Analyses sérologiques et RT-PCR réalisées au laboratoire de virologie à l'INRB, Kinshasa, RDC.

RESULTATS

Entre le 06 Juillet et le 18 Août 2017, nous avons obtenu des prélèvements de 488 animaux, notamment : chauves-souris (n=141), rongeurs (n=241), musaraignes (n=79), mangouste (n=1), primates non humains (n=5) et potamochère (n=1).

Tableau 15 montre le nombre d'échantillons collectés des différentes espèces. Les espèces ont été confirmées par séquençage du cytochrome b et/ou de l'ARN ribosomique 12S mitochondrial sur 334/488 (68,4%) animaux dans les laboratoires de l'Unité TRANSVIHMI de l'IRD Montpellier en France et de l'Institut Robert Koch en Allemagne. Parmi les 141 chauves-souris, 39 proviennent d'au moins 6 espèces différentes d'insectivores et les 102 frugivores représentent au moins 6 espèces dont 4 soupçonnées de jouer un rôle dans l'écologie du virus Ebola (*E. helvum*, *E. franqueti*, *H. monstrosus*, *M. torquata*). Parmi les 241 rongeurs, au moins 17 espèces sont représentées et au moins 9 parmi les musaraignes.

Il y avait également 96 prélèvements fécaux de chauves-souris, tous provenant d'une colonie d'*Eidelon helvum* et confirmé par séquençage de l'ARN ribosomique 12S.

Sur les 488 animaux, nous avons prélevé au total 1.619 échantillons repartis de la manière suivante : échantillons de poumons (n=387), foie (n=388), rate (n=387), sang total (n=301) et écouvillons oraux et rectaux (n=156). En plus, pour la quasi-totalité d'animaux, un échantillon de sang a été prélevé dans un tube sec et/ou sur papier buvard.

La recherche des anticorps anti-virus Ebola a été réalisée chez 384/488 (78,7%) animaux, essentiellement sur les échantillons de sang total séché sur papiers filtres avec ELISA (n=62) et Luminex (n=384), et tous les résultats étaient négatifs. Pour environ 100 échantillons, les tests sérologiques n'ont pas été réalisés car les échantillons étaient disponibles en trop faible quantité ou mal conservés avec les conditions d'humidité élevée sur le terrain. Les 96 échantillons de fèces des chauves-souris ont été transférés au laboratoire de TRANSVIHMI de l'IRD-Montpellier, parmi lesquels 92 ont été analysés par la méthode de Luminex pour la recherche des anticorps anti-virus Ebola, car 4 échantillons n'étaient pas de bonne qualité. Toutes les analyses étaient négatives.

Au total, 413/488 (84,6%) animaux avaient au moins un échantillon analysé par RT-PCR à la recherche de l'ARN du virus Ebola et tous les résultats étaient également négatifs. Mais si on considère en termes d'échantillon, seuls 1.029/1.715 (60%) ont été analysés. En principe, la probabilité de détecter le virus Ebola est plus élevée dans la rate et 361/387 (93,3%) des échantillons de rate ont été analysés. Nous avons aussi analysé les échantillons de poumons (83/387 ; 21,4%), foie (85/303 ; 21,9%), fèces (92/96 ; 95,8%), sang total (252/301 ; 83,7%) et les écouvillons (156/156 ; 100%) par RT-PCR et tous étaient négatifs.

Tableau 15. Nombre d'animaux prélevés dans cette étude repartis selon leurs espèces

	Genre	**Espèce**	**nombre**
Primates non humains	*Cercopithecus*	*sp*	2
		ascanius	2
	Colobus	*sp*	1
Mangouste	*Atilax*	*paludinosus*	1
Chauves-souris Insectivores	*Hipposideros*	sp	26
	Pipistrellus	sp.1	1
	Neoromicia	*nanus*	1
	Myotis	*bocagii*	3
	Glauconycteris	*variegata*	1
	Rhinolophus	sp	4
	Indéterminé		3
Chauves-souris Frugivores	*Casinycteris*	*argynnis*	11
	Eidolon	*helvum*	14
	Epomops	*franqueti*	31
	Hypsignathus	*monstrosus*	5
	Megaloglossus	*woermanni*	11
	Myonycteris	*torquata*	27
	Indéterminé		3
Rongeurs	*Anomalurus*	*derbianus*	1
	Atherurus	*africanus*	1
	Grammomys	sp	2
	Graphiurus	sp	1
	Hybomys	*lunaris*	20
	Hylomyscus	*stella*	7
		alleni	5
	Lophuromys	sp	3
		dudui	14
	Malacomys	sp	2
		natalensis	2
	Mus (Nannomys)	sp	72
	Praomys	*jacksoni*	67
		misonnei	9
		verschureni	1
	Thamnomys	sp.1	1
	Funisciurus	sp.1	2
	Indéterminé		51
Musaraignes	*Crocidura*	*caliginea*	8
		crenata	3
		denti	7
		latuna	3
		ludia	1
		oliveiri	10
		sp	42
	Paracrocidura	*schoutedeni*	2
	Scutisorex	*somereni*	3
Potamochère	*Potamochoerus*	*porcus*	1

DISCUSSION

Au 11 Mai 2017, le ministère de la santé de la RDC a déclaré la 8ème épidémie de la maladie à virus Ebola à Likati, dans la province de Bas-Uélé. Au total huit cas ont été enregistrés dont cinq confirmés et trois probables, parmi lesquels quatre sont décédés. Plus de quatre décennies après la découverte du virus Ebola, son réservoir demeure encore inconnu. Pour tenter de résoudre cette énigme, nous avons mis en place un consortium, sous la coordination de l'INRB, ayant pour objectif de conduire des investigations écologiques à la recherche des sources de contamination et du réservoir du virus Ebola à Kaigbono, dans la zone de santé de Likati. Nous avons focalisé nos investigations dans le village de Kaigbono, lieu de résidence du cas index, pour maximiser nos chances à retrouver la source de contamination du cas index et aussi le réservoir du virus Ebola, au cas où aucune notion de voyage n'avait été rapporté par les proches du cas index pendant la période présumée de l'infection.

Au total, 1.619 échantillons de 488 animaux ont été prélevés, notamment des chauves-souris, des rongeurs, des musaraignes, des primates non humains, une mangouste et des restes de crane d'un potamochère, contact du cas index. Nous avons également collecté des échantillons des guanos des chauves-souris. Les analyses de laboratoire ont été réalisés par plusieurs équipes parfois travaillant ensemble, utilisant différentes techniques pour maximiser les chances de détecter soit les anticorps spécifiques soit au mieux l'ARN du virus Ebola dans ces échantillons. Sur les 488 animaux prélevés, 384 (78,7%) ont été analysés pour la détection des anticorps spécifiques du virus Ebola, plus 92 échantillons de crottes des chauves-souris analysés par le Luminex, et 413 (84,6%) avaient au moins un échantillon analysé par RT-PCR pour la détection de l'ARN du virus Ebola. Bien que, tous les résultats soient négatifs, cela représente 60% (1.029/1.715) du total des échantillons. Les échantillons testés en majorité étaient les écouvillons (100%), les fèces (95,8%), les échantillons de rate (93,3%) et le sang total (83,7%). D'après les études réalisées chez les macaques, il a été démontré que le virus Ebola cible principalement deux organes : le foie et la rate (Geisbert et al., 2003). En plus, l'ARN du virus Ebola a été détecté dans le foie et la rate de trois différentes espèces de chauves-souris au Gabon (Leroy et al., 2005), parmi celles qui n'avaient pas d'anticorps anti-virus Ebola aux tests sérologiques (Leroy et al. 2005). Les échantillons de reins, cœur et poumons étaient négatifs à la PCR (Leroy et al., 2005).

Une fois de plus, la viande de brousse et surtout les chauves-souris sont incriminées comme source de contamination lors d'une épidémie de la maladie à virus Ebola. Sur les animaux analysés, 93,3% ont eu un échantillon de rate analysés parmi ceux dont les échantillons de foie ne sont pas encore analysés. Il est peu probable que les échantillons de foie de ces mêmes animaux soient positifs à la RT-PCR alors que leurs échantillons de rate sont négatifs.

Le retard observé sur le déroulement des analyses de laboratoire est dû à plusieurs raisons : les difficultés logistiques pour l'approvisionnement en réactifs (délai important entre les commandes et la livraison des réactifs, transport, douane, procédures administratives très lourdes, etc.) ; transport des échantillons vers les laboratoires collaborateurs pour d'autres analyses (Luminex, identification moléculaire des espèces, PCR sur les fèces des chauves-souris, etc.) ce qui allonge le délai d'attente des résultats ; et surtout le peu de staff disponible au laboratoire à cause de nouvelles flambées épidémiques survenues quelques mois plus tard à Bikoro et ensuite au Nord Kivu et Ituri, au cours de la même année 2018, en RDC et qui ont mobilisés la plupart des activités du personnel.

Il a été rapporté que le virus Ebola pouvait survivre, dans les conditions de laboratoires, un peu moins de 7 jours dans les tissus musculaires d'un macaque mort et l'ARN viral était détectable jusqu'à 10 semaines chez les macaques après euthanasie (Prescott et al., 2015). Mais, il est possible que le temps assez long, environ 3 à 4 mois, entre la période d'infection du probable cas index et le lancement des investigations écologiques pourrait avoir un impact négatif sur la survie du virus dans l'échantillon du sanglier avec lequel le cas index a été en contact, si cet animal était la source de contamination. Aussi il est à noter, que le nombre d'échantillons collecté et testé est relativement faible, vu le nombre d'animaux dans des colonies de chauves-souris et la faible prévalence du virus Ebola comme observée dans notre étude précédente. Les chances de trouver les animaux jouant un rôle comme réservoir ou source de contamination est probablement plus élevé au début des épidémies et pour cela nous avons planifier cette étude écologique au plutôt. Malheureusement, la collecte d'échantillons a été laborieuse et difficile avec les fortes pluies, et la mission a été interrompue.

Néanmoins, les efforts pour retrouver le réservoir de ce virus doivent être poursuivis car c'est le seul moyen qui nous permettra de prévenir efficacement les prochaines épidémies.

Travaux de Thèse

Deuxième Partie :

Caractériser les virus Ebola chez l'homme pendant les épidémies

Chapitre 1. Rapid Confirmation of the Zaire Ebola Virus in the Outbreak of the Equateur Province in the Democratic Republic of Congo: Implications for Public Health Interventions

Clinical Infectious Diseases® 2019; 68(2): 330–3. DOI: 10.1093/cid/ciy527

Résumé (en Français)

Introduction

La République Démocratique du Congo (RDC) a déclaré le 8 mai 2018 une nouvelle épidémie de la maladie à virus Ebola à Bikoro, dans la province de l'Équateur. Des interventions d'urgence ont été mises en place, telles que la surveillance active, le dépistage actif avec des laboratoires mobiles déployés sur les sites affectés, la recherche des contacts, la prévention des infections et les enterrements dignes et sécurisés. Toutefois, en 2017, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a recommandé le déploiement du candidat vaccin rVSV-ZEBOV comme mesure supplémentaire de prévention et de contrôle en cas d'une épidémie causée par le virus Ebola Zaïre (EBOV). Cependant, 4 espèces de virus Ebola ont été rapportées en Afrique : Zaïre (EBOV), Soudan (SUDV), Bundibugyo (BDBV) et Taï Forest (TAFV). Alors que 7 des 8 épidémies précédentes en RDC étaient dues à EBOV, BDBV était responsable de l'épidémie à Isiro en 2012, et les épidémies précédentes au Soudan du Sud étaient toutes proches de la frontière avec la RDC et étaient dues au SUDV. Par conséquent, il est donc important de confirmer rapidement la souche virale du tout nouveau foyer pour garantir l'utilité de la vaccination anti-EBOV. Nous décrivons ici la réaction rapide du laboratoire qui a conduit à la confirmation du virus EBOV lors de la dernière épidémie et soulignons les implications de la détection virale rapide pour les interventions de santé publique.

Méthodes

Amplification par PCR

L'ARN viral a été extrait de 140 µl de sang total prélevé chez 5 individus suspects d'être infectés par le virus Ebola à Bikoro/Iboko. Après préparation de l'ADN complémentaire, une amplification d'un petit fragment de la région VP35 (217 pb) a été réalisé suivant un protocole modifié adapté de He et collaborateurs.

Analyse des séquences

Les produits de PCR ont été barre-codés et regroupés à l'aide du kit de codes-barres natifs (Oxford Nanopore Technologies). Ensuite, des librairies de séquençage ont été générées en utilisant le kit de séquençage d'ADN génomique EXP-NBD103 / SQK-LSK208 (Oxford Nanopore Technologies) et ont été chargées sur une Flow Cell R9. Les données génétiques ont été recueillies pendant 1 heure. Le basecalling a été réalisé avec la version 2.1.10 du logiciel ONT Albacore Sequencing Pipeline et le demultiplexage avec Porechop 0.2.3. Les analyses phylogénétiques ont été effectuées à l'aide de méthodes de maximum de vraisemblance.

Résultats

Les 2 échantillons témoins positifs de Boende 2014 ont été amplifiés avec succès et aucun produit de PCR n'a été obtenu pour l'échantillon négatif. Seuls les 2 échantillons de Bikoro / Iboko 2018 qui avaient été testés initialement positifs avec les tests de diagnostic commerciaux étaient également positifs avec la PCR VP35. L'arbre phylogénétique a montré que les nouvelles souches de la neuvième épidémie d'Ebola en RDC appartiennent à l'espèce Ebola Zaïre (EBOV).

Discussion

Dix jours seulement après la déclaration de la neuvième épidémie d'Ebola, la souche du virus a été confirmée comme appartenant à l'espèce Zaïre (EBOV). Comme lors de l'épidémie en Afrique de l'Ouest, le séquençage par nanopores à l'aide du dispositif MinION s'est révélé utile pour la confirmation rapide de l'agent pathogène et l'identification des souches. La caractérisation virale

rapide de la souche a permis l’utilisation du candidat vaccin rVSV-ZEBOV dans la stratégie de vaccination en ceinture telle que recommandée par l'OMS.

Rapid Confirmation of the Zaire Ebola Virus in the Outbreak of the Equateur Province in the Democratic Republic of Congo: Implications for Public Health Interventions

Clinical Infectious Diseases® 2019; 68(2): 330–3. DOI: 10.1093/cid/ciy527

Placide Mbala-Kingebeni,[1,2,3] Christian-Julian Villabona-Arenas,[3] Nicole Vidal,[3]Jacques Likofata,[4] Justus Nsio-Mbeta,[5] Sheila Makiala-Mandanda,[1,2] Daniel Mukadi,[1,2] Patrick Mukadi,[1,2] Charles Kumakamba,[1,6] Bathe Djokolo,[5] Ahidjo Ayouba,[3] Eric Delaporte,[3] Martine Peeters,[3] Jean-Jacques Muyembe Tamfum,[1,2] and Steve Ahuka-Mundeke[1,2]

[1]National Institute of Biomedical Research

[2]Service de Microbiologie, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Democratic Republic of Congo;

[3]Recherches translationelles sur le virus de l'immunodéficience et les maladies infectieuses, Institut de Recherche pour le Développement, University of Montpellier, Institut national de la santé et de la recherche médicale, France;

[4]Laboratoire Provinciale, Mbandaka

[5]Direction Générale de Lutte contre la Maladie and [6]Metabiota Inc., Kinshasa, Democratic Republic of Congo

ABSTRACT

Ten days after the declaration of the Ebola outbreak in the Democratic Republic of Congo, rapid identification of the species Zaire Ebola virus using partial gene amplification and nanopore sequencing backed up the use of the recombinant vesicular stomatitis virus–Zaire Ebola virus vaccine in the recommended ring vaccination strategy.

Keywords: Ebola; Democratic Republic of Congo; nanopore sequencing.

INTRODUCTION

The Democratic Republic of Congo (DRC) declared a new outbreak of Ebola virus disease (EVD) on 8 May 2018. Initially, a report from the Provincial Health Division of the Equateur Province at the end of April informed the national authorities of 21 cases of potential hemorrhagic fever, including 17 deaths in the Ikoko-Impenge health area. Deployed disease experts on site identified 5 possible cases on 5 May and a blood sample was taken from each individual, 2 who were hospitalized in Bikoro and 3 at the health centre of Iboko. Samples were sent to Institut National de Recherche Biomédicale (INRB) in Kinshasa, and the presence of Ebola virus was identified in 2 samples on 7 May (WHO, Sitrep-EVD-DRC-20180605). The samples tested positive with the OraQuick Ebola Rapid Antigen test (OraSure Technologies) and with the RealStar Zaire Ebolavirus reverse-transcription polymerase chain reaction (PCR) kit 1.0 (Altona Diagnostics).

Proven emergency responses such as enhanced surveillance, active case finding, contact tracing, infection prevention, safe burials, and diagnosis with deployment of mobile laboratories on site were implemented rapidly. However, in 2017, the World Health Organization (WHO) recommended the deployment of the recombinant vesicular stomatitis virus–Zaire Ebola virus (rVSV-ZEBOV) candidate vaccine as an additional measure for prevention and control in the event of novel Zaire Ebola virus (EBOV) outbreaks (WHO, SAGE meeting-Conclusions and Recommendations). This vaccine has been shown to be effective and safe and has been used during the epidemic decline of EBOV in Guinea in 2015 and during the flare-up of the disease in rural Guinea in 2016 (Henao-Restrepo et al., 2015; Gsell et al., 2017). However, 4 species of Ebola

viruses have been documented in Africa: Zaire (EBOV), Sudan (SUDV), Bundibugyo (BDBV), and Tai Forest (Kuhn et al., 2014). Whereas 7 of the 8 previous EBOV epidemics in DRC were due to EBOV, BDBV was responsible for the outbreak in Isiro in 2012, and previous outbreaks in South Sudan were all close to the border with DRC and were due to SUDV (Pigott et al., 2016). Therefore, it is thus important to confirm rapidly the viral strain of any new outbreak to guarantee the utility of anti-EBOV vaccination. Here, we describe the rapid laboratorial response that led to the confirmation of EBOV in the latest outbreak and highlight the implication of rapid viral detection for public health interventions.

MATERIALS AND METHODS

PCR Amplification

Viral RNA was extracted from 140 µL of whole blood collected from the 5 clinically suspected Ebola virus–infected individuals from Bikoro/Iboko using the Nuclisens kit (bioMérieux) and following the manufacturer's instructions. After preparation of complementary DNA with GoScript Reverse Transcriptase (Promega, France), amplification of a small fragment of the VP35 region was attempted in a semi-nested PCR with a modified protocol adapted from He and colleagues (He et al., 2015). Three additional samples were included as controls: 2 EBOV positive and 1 negative from the outbreak in Boende in 2014. In the first round, a 217-bp fragment was targeted with primers VP35-F: 5'-AT-YATGTATGATCACYTVCCWGG-3' and VP35-R: AGCGR ATGTGGATSACRGGT-3'. In the second round, a 184-bp product was amplified with primers VP35-R and VP35-in-F: 5'-GCTTTYCAYCAAYTAGTRCAAG-3'.

Sequence Analysis

First-round VP35 PCR products from positive samples were barcoded and pooled using the Native Barcoding Kit (Oxford Nanopore Technologies). Sequencing libraries were generated from the barcoded products using the Genomic DNA Sequencing Kit EXP-NBD103/SQK-LSK208 (Oxford Nanopore Technologies) and were loaded onto a R9 flow cell. Genetic data was collected for 1 hour.

Bioinformatics and Phylogenetic Analysis

Basecalling of sequenced data was done with ONT Albacore Sequencing Pipeline software version 2.1.10. Adapter removal and demultiplexing were achieved with Porechop 0.2.3.

Filovirus genus references were retrieved from the Hemorrhagic Fever Viruses (HFV) database at the Los Alamos National Laboratory. Multireference pre-alignment analysis of quality and error profiles using reads with basecall quality ≥11 was done with the software package NanoOK 1.10. Ebola virus reads were corrected with Canu 1.6, and consensus sequences were produced by alignment of reads to the corresponding Ebola virus reference genome following signal-level analysis using Nanopolish 0.9.

One sequence per outbreak was retrieved from the HFV database and used for phylogenetic inference together with the nanopore consensus sequences. We also included a previously obtained VP35 sequence from an unpublished strain from the outbreak in Likati in 2017. Phylogenetic analyses were done using maximum likelihood methods with approximate likelihood ratio test nonparametric branch support based on a Shimodaira-Hasegawa–like procedure using PhyML version 3.1 software. The HKY85 model plus a discrete gamma model were used as nucleotide substitution models.

RESULTS

The 2 positive control samples from Boende 2014 were successfully amplified and no PCR product was obtained for the negative sample. The 2 samples from Bikoro/Iboko 2018 that tested initially positive with the commercial tests were also positive in the VP35 PCR, 2 other samples had a weak PCR product, and the remaining sample resulted in no amplification. We attempted sequencing on the 6 samples with PCR amplification. After 1 hour, between 400 and >4000 reads were obtained depending on the sample. NanoOK report indicated that >95% of the reads from the 2 known positive samples from Bikoro/ Iboko and the 2 positive control samples from Boende mapped to the EBOV species. The remaining reads and the reads from the samples with weak positive PCR product did not align to any filovirus genera and were queried in BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), and the best hits pointed to human DNA. Consensus sequences were produced for the new EBOV strains and aligned with reference sequences from previous Ebola outbreaks including the 5 Ebola virus species and other filoviruses such as Marburg. The

phylogenetic tree shown in Figure 13 underscores that this highly conserved region is discriminatory between Ebola virus species and illustrates that the new strains from the ninth Ebola outbreak in DRC belong to the Ebola Zaire species (EBOV).

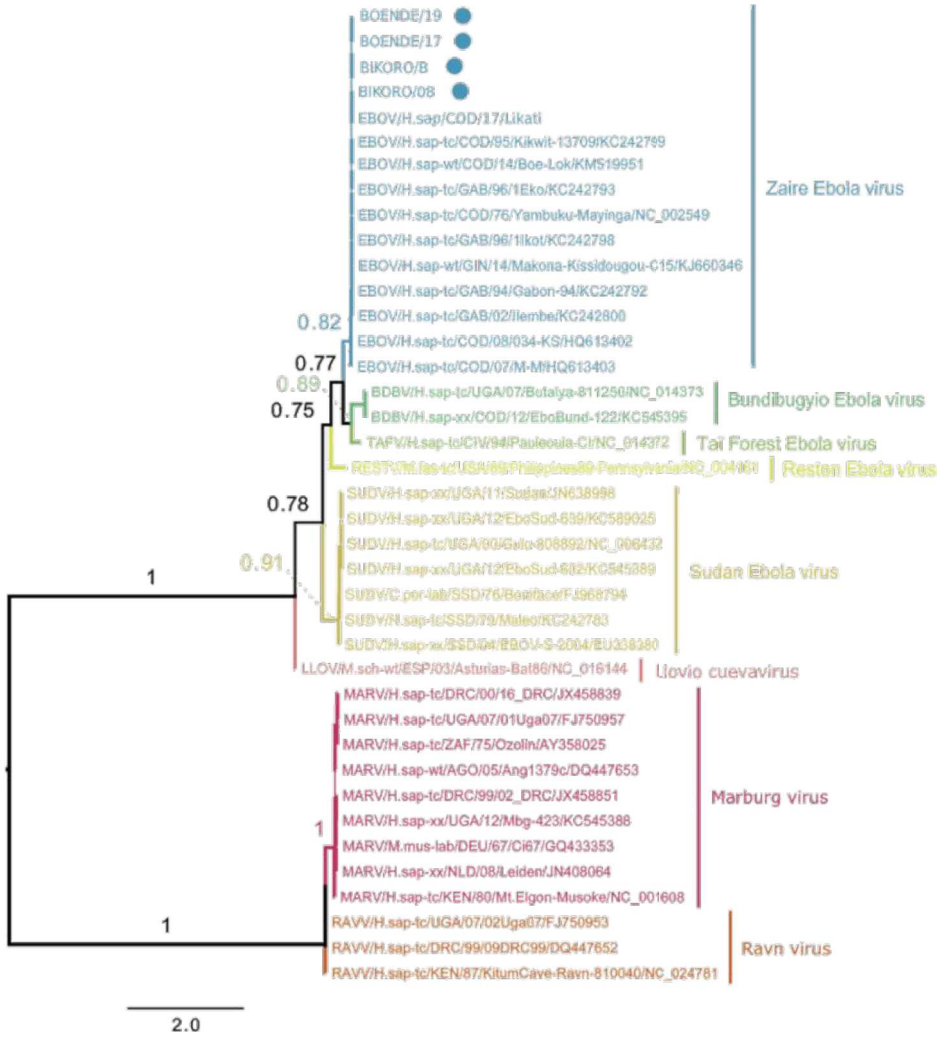


Figure 20. Maximum likelihood tree showing phylogenetic relationships of samples from Bikoro/Iboko 2018 and other filovirus using partial VP35 sequences. Approximate likelihood ratio test nonparametric branch supports based on a Shimodaira-Hasegawa–like procedure are shown for the main nodes. The new strains from Bikoro/Itipo (2018) and the control samples from Boende (2014) are highlighted with a dot.

The laboratory results of the 5 suspected cases and the clinical signs and history for each patient are summarized in Supplementary Table 1. Overall, all 5 patients had diarrhea, severe fatigue, and abdominal pain. Additional symptoms were muscle or joint pain and anorexia for 4 of them.

Three patients had also gum and/or nose bleeding among symptoms, but only 1 of them was confirmed as infected with Ebola virus by sequence and PCR analysis.

DISCUSSION

After only 10 days of the ninth Ebola outbreak declaration, the virus strain was confirmed as belonging to the Zaire species (EBOV). As in the outbreak in West Africa, nanopore sequencing using the MinION device proved useful for quick pathogen confirmation and strain identification (Quick et al., 2016; Hoenen et al., 2016). The device provided speed (library preparation, basecalling of preliminary read data and multireference pre-alignment took <6 hours) and ease of use besides portability advantages over other sequencing machines. The rapid viral characterization of the strain backed up the rVSV-ZEBOV candidate vaccine for the ring vaccination strategy recommended by WHO (WHO, SAGE meeting-Conclusions and Recommendations). Today >1000 people have been vaccinated, mainly health professionals and people exposed to patients with confirmed EBOV and their contacts (WHO, Sitrep-EVD-DRC-20180605). Nevertheless, further efforts to increase adequate hygiene practices and safe burials must also be continued.

Previous outbreaks in DRC were in very remote locations or small towns, but this new outbreak affected simultaneously at least 3 different locations in the Equateur Province. It included 2 remote sites, Bikoro and Iboko/Itipo health areas, and cases in Mbandaka, a city of >1 million inhabitants and with transport and port links to the rest of the country and neighboring countries. The current outbreak is thus complex with the potential for urban and larger geographic spread. It was thus urgent to start rapidly the ring vaccination to stop the spread of the virus.

DRC had already experienced 8 other Ebola outbreaks since 1976 (Pigott et al., 2016). The country has thus implemented a strategy at the national level to rapidly identify a potential new outbreak. This includes rapid reporting of clinical suspected cases and shipment of samples to the reference laboratory at INRB in Kinshasa for confirmation. In the current situation, the health service from Equateur Province gave the alert in late April. Nevertheless, the clinical presentations of the 5 suspected cases illustrate how difficult it is to distinguish Ebola from some other diseases without laboratory confirmation. A similar alert was issued in February in the same area with 15 cases, among which 8 individuals died, but no laboratory confirmation occurred (unpublished data).

This observation underscores that the outbreak may have started earlier and emphasizes the potential of Ebola outbreaks to go unrecognized in remote areas. However, any relation between the 2 alerts remains to be examined.

Each EVD outbreak is the result of a cross-species transmission event from a reservoir or an intermediate/amplifying animal host species (Pigott et al., 2016). This new outbreak, together with the large outbreak in West Africa, illustrates the major consequences of recurrent zoonotic spills. Studies on the ecology and animal reservoir of Ebola viruses are thus urgently needed so exposure to infection can be anticipated or avoided. Finally, the advantages provided by novel diagnostic technologies such as nanopore sequencing using the MinION device highlight the importance of local capacity-building programs for rapid pathogen confirmation and corresponding public health interventions.

Notes

Acknowledgments

We thank the Democratic Republic of Congo (DRC) Ministry of Health and the World Health Organization office in DRC.

Financial support

This work was supported in part by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Research and action targeting emerging infectious diseases; the Capacity building and surveillance for Ebola virus disease project funded by the European Union; the International Mixt Laboratory “PreVIHMI” of the Institut de Recherche pour le Developpement; and the Christophe Mérieux Prize 2015 awarded to Professor J. J. Muyembe Tamfum.

Potential conflicts of interest

All authors : No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Clinical Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Supplementary Table 1. Clinical signs and history of the 5 first suspected cases

Table 1 : Characteristics of the five patients analyzed on 7 May to declare the nineth Ebola outbreak inthe Democratic Republic of Congo.

Patient ID	clinical symptons	age	sex	village	OraQuick	Altona	sequence
18FVH007	diarrhea, severe fatigue, abdominal pain, difficulty breathing	34	M	Ikoko (Bikoro Healt Zone)	neg	neg	neg
18FH008	vomiting / nausea, anorexia, diarrhea, severe fatigue, abdominal pain, joint pain, difficulty swallowing, difficulty breathing, vomiting of blood, nose bleeding	46	M	Ikoko (Bikoro Healt Zone)	pos	pos	EBOV
18FVH009	headache, anorexia, diarrhea, severe fatigue, abdominal pain, muscle or joint pain, difficulty swallowing, gum and nose bleeding	31	F	Ikoko (Bikoro Healt Zone)	neg	neg	neg
18FVH011	headache, anorexia, diarrhea, severe fatigue, abdominal pain, muscle or joint pain, difficulty swallowing, gum and nose bleeding	45	F	Ikoko (Bikoro Healt Zone)	neg	neg	neg
18FVH012	anorexia, diarrhea, intense fatigue, abdominal pain, muscle or joint pain, breathing difficulties	40	F	Bowanza (Bikoro Healt Zone)	pos	pos	EBOV

Chapitre 2. 2018 Ebola virus disease outbreak in Equateur Province, Democratic Republic of the Congo: a retrospective genomic characterization

Lancet Infect Dis. 2019 Jun;19(6):641-647. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30124-0. Epub 2019 Apr 15.

Editorial comment ; Carroll MW. Retrospective versus real-time Ebola virus sequencing. The Lancet Infectious Diseases, Volume 19, Issue 6, June 2019, Pages 567-568

Résumé (en Français)

Contexte

Le 8 Mai 2018, la RDC a déclaré sa neuvième épidémie de la maladie à virus Ebola survenue dans la province de l'Équateur, où au total 54 cas ont été documentés et 33 décès. La fin de cette épidémie a été officiellement déclarée le 24 Juillet 2018. Tous les cas provenaient de trois zones de santé (Bikoro, Iboko et Wangata) situées dans la région nord-ouest de la province de l'Équateur en RDC, près du lac Tumba. Nous avons procédé à la caractérisation génomique rétrospective de cette épidémie et nous avons évalué les tests de diagnostic, le candidat vaccin et les agents thérapeutiques expérimentaux utilisés au cours de cette épidémie dans la province de l'Équateur.

Méthodes

Traitement des échantillons et séquençage

Les extractions d'ARN des échantillons des cas confirmés de la maladie à virus Ebola ont été réalisées à l'aide du kit d'extraction d'ARN viral Qiagen QIAamp (Qiagen, Hilden, Allemagne) et

testés par RT-qPCR sur terrain et une seconde analyse a été réalisée à l'INRB à Kinshasa, à l'aide du test Cepheid Xpert Ebola. La qualité des ARN a été évaluée à l'aide d'un bioanalyseur Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, Californie, États-Unis). Puis, les ARN de bonne qualité ont été séquencés avec des méthodes d'enrichissement viral ciblé, comme décrit précédemment par Mate SE et al., en utilisant un système Illumina iSeq100 (Illumina Technologies, San Diego, Californie, États-Unis).

Evolution moléculaire

Toutes les séquences obtenues des cas confirmés de cette épidémie ont été déposées dans la GenBank, avec les informations sur le lieu et la date de prélèvement des échantillons. Les alignements ont été réalisées dans Geneious, version 11.1.4, en utilisant MAFFT, version 7.388 pour distinguer lorsqu'il s'agit d'un seul ou de plusieurs passages du virus de la faune à l'homme. Les analyses phylogénétiques avec maximum de vraisemblance ont été utilisées pour estimer les distances entre les séquences (de la racine à l'extrémité). Nous avons ainsi estimé le temps du plus récent ancêtre commun des séquences de cette épidémie.

Tests de diagnostic

Pendant cette épidémie, différents tests de diagnostic ont été déployés sur terrain : des tests de RT-qPCR ciblant la polymerase (L), la nucléoprotéine (NP) et le test multiplex Cepheid Xpert ciblant la nucléoprotéine (NP) et la glycoprotéine (GP). Nous avons évalué environ 25 tests de diagnostic, en incluant les trois déployés sur terrain, en comparant leurs amorces et sondes avec les séquences obtenues au cours de cette épidémie. Le nombre et les positions des discordances observés au cours de ces analyses ont été rapportés.

Confirmation de la liaison des anticorps

Des candidats vaccins et des traitements à base d'anticorps monoclonaux, dirigés contre la glycoprotéine du virus Ebola, ont été développés. Nous avons réalisé des analyses in silico pour évaluer l'affinité du vaccin rVSV-ZEBOV et des anticorps monoclonaux (ZMaap et mAb114) et prédire si les modifications des acides aminés dans le génome du virus Ebola de cette épidémie

ne pourraient pas affecter leur liaison aux épitopes respectifs. Un test de cytométrie en flux *in vitro* a été utilisé pour évaluer la capacité de liaison des composants individuels du cocktail d'anticorps monoclonal ZMapp.

Résultats

Grace au séquençage de nouvelle génération, nous avons produit 16 génomes complets du virus Ebola à partir des échantillons des cas confirmés. L'analyse phylogénétique de ces génomes et des 1.011 génomes obtenus de la GenBank a révélé un groupe distinct confirmant un nouveau variant du virus Ebola, pour lequel nous proposons le nom « Tumba ». Ce nouveau variant semble avoir évolué à un rythme plus lent que les autres variants du virus Ebola (0,69 ~ 10– substitutions par site et par an avec « Tumba » contre 1,06 ~ 10–. Substitutions par site et par an sans « Tumba »). Nous avons trouvé peu de discordance entre les séquences dans les régions cibles et les sites antigéniques des tests évalués. Nous avons identifié neuf modifications d'acides aminés dans la glycoprotéine de surface du virus Ebola, dont l'une a entraîné une réduction de la liaison de l'anticorps 13C6 contenu dans le cocktail ZMapp.

Discussion

Moins de six semaines après la déclaration officielle de l'épidémie, nous avons mis en place, à l'INRB, un laboratoire de séquençage de nouvelle génération avec la technologie Illumina (iSeq100) en utilisant des protocoles pour générer des génomes complets du virus Ebola. L'analyse des séquences obtenues de cette épidémie a révélé que l'agent pathogène en cause était un nouveau variant du virus Ebola que nous avons nommé « Tumba ». Grace aux analyses phylogénétiques et bayésiennes, nous avons noté que le variant EBOV/''Tum'' était plus proche de EBOV/''Lom'' identifié lors de l'épidémie de la maladie à virus Ebola à Boende, dans la province de la Tshuapa (province adjacente à celle de l'Equateur), en RDC. Et ce variant semble avoir évolué à un rythme plus lent que les autres variants du virus Ebola.

Nous avons effectué des tests in-silico sur les outils de diagnostic et les contre-mesures médicales disponibles et déployés sur terrain. Sur les trois tests RT-qPCR déployés sur terrain, une seule discordance a été notée dans la région cible du test Cepheid Xpert Ebola. Cependant, il est peu probable que cette disparité affecte la sensibilité ou la spécificité de ce test. Nos données

suggèrent que les différences d'acides aminés observées dans le variant EBOV/''Tum'' devraient avoir peu d'effet sur le vaccin rVSVΔG-ZEBOV-GP et le traitement aux anticorps monoclonaux. Nous avons identifié un nouveau changement d'acide aminé (Arg266Gly) dans l'échantillon du patient BIK012, qui se trouvait à proximité de l'épitope de liaison de l'anticorps monoclonal 13C6, un des anticorps monoclonaux du ZMaap. Les tests in vitro ont révélé une réduction de l'affinité de liaison, montrant que cette mutation affectait la liaison de l'anticorps monoclonal 13C6 à la glycoprotéine (GP) «Tum» + Arg266Gly. Cette mutation Arg266Gly n'a été retrouvée que dans un échantillon et les deux anticorps monoclonaux restants du ZMaap n'étaient pas affectés ; Par conséquent, l'efficacité globale de ZMapp ne devrait pas être affectée. Ces résultats soulignent l'importance des données de séquençage pour permettre une évaluation rapide des immunothérapies ciblant la glycoprotéine (GP1,2) du virus Ebola.

2018 Ebola virus disease outbreak in Équateur Province, Democratic Republic of the Congo: a retrospective genomic characterization

www.thelancet.com/infection Published online April 15, 2019 http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30124-0

Placide Mbala-Kingebeni MD[abc*], Catherine B Pratt MSc[df*], Michael R Wiley PhD[df*], Moussa M Diagne PhDh*, Sheila Makiala-Mandanda PhDac, Amuri Aziza MSca, Nicholas Di Paola ScDd, Joseph A Chitty BSd, Mamadou Diop MSch, Ahidjo Ayouba PhDb, Nicole Vidal PhDb, Ousmane Faye PhDh, Oumar Faye PhDh, Stormy Karhemere DVMa, Aaron Aruna MPHi, Justus Nsio MPHi, Felix Mulangu MPHi, Daniel Mukadi MDc, Patrick Mukadi MDa, John Kombe MPHi, Anastasie Mulumba MDj, Sophie Duraffour PhDjk, Jacques Likofatal, Elisabeth Pukuta MSca, Katie Caviness PhDd, Maggie L Bartlett BSdg, Jeanette Gonzalez MSd, Timothy Minogue PhDe, Shanmuga Sozhamannan PhDmn, Stephen M Gross PhDo, Gary P Schroth PhDo, Jens H Kuhn MDp, Eric F Donaldson PhDq, Eric Delaporte PhDb, Mariano Sanchez-Lockhart PhDdg, Martine Peeters PhDb, Jean-Jacques Muyembe-Tamfum PhDac, Amadou Alpha SallPhDh†, Gustavo Palacios PhDd†, Steve Ahuka-Mundeke PhDca†

[a] Institut National de Recherche Biomédicale, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo ; [b] TransVIHMI, Institut de Recherche pour le Développement, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Montpellier, Montpellier, France ; [c] Service de Microbiologie, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo; [d] Center for Genome Sciences, US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Frederick, MD, USA; [e] Diagnostics Services Division, US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Frederick, MD, USA; [f] College of Public Health, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA; [g] Department of Pathology and Microbiology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA; [h] Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Senegal ; [i] Direction Générale de Lutte contre la Maladie, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo ; [j] Monsieur le Représentant de l'Organisation Mondiale de la Santé, Democratic Republic of the Congo ; [k] Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, Germany; [l] Laboratoire Provinciale, Mbandaka, Democratic Republic of the Congo; [m] Defense Biological Product Assurance Office, Joint Program Executive Office for Chemical, Biological, Radiological and Nuclear Defense—Joint Project Management Office for Guardian, Frederick, MD, USA; [n] Logistics Management Institute, Tysons, VA, USA ; [o] Illumina, San Diego, CA, USA; [p] Integrated Research Facility at Fort Detrick, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Frederick, MD, USA; [q] Division of Antiviral Products, Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, USA

* Contributed equally

† Joint senior authors

Summary

Background

The 2018 Ebola virus disease (EVD) outbreak in Equateur Province, Democratic Republic of the Congo, began on May 8, and was declared over on July 24; it resulted in 54 documented cases and 33 deaths. We did a retrospective genomic characterisation of the outbreak and assessed potential therapeutic agents and vaccine (medical countermeasures).

Methods

We used target-enrichment sequencing to produce Ebola virus genomes from samples obtained in the 2018 Equateur Province outbreak. Combining these genomes with genomes associated with known outbreaks from GenBank, we constructed a maximum-likelihood phylogenetic tree. In-silico analyses were used to assess potential mismatches between the outbreak strain and the probes and primers of diagnostic assays and the antigenic sites of the experimental rVSVΔG-ZEBOV-GP vaccine and therapeutics. An in-vitro flow cytometry assay was used to assess the binding capability of the individual components of the monoclonal antibody cocktail ZMapp.

Findings

A targeted sequencing approach produced 16 near-complete genomes. Phylogenetic analysis of these genomes and 1011 genomes from GenBank revealed a distinct cluster, confirming a new Ebola virus variant, for which we propose the name “Tumba”. This new variant appears to have evolved at a slower rate than other Ebola virus variants (0.69 Å~ 10–. substitutions per site per year with “Tumba” vs 1.06 Å~ 10–. substitutions per site per year without “Tumba”). We found few sequence mismatches in the assessed assay target regions and antigenic sites.

We identified nine amino acid changes in the Ebola virus surface glycoprotein, of which one resulted in reduced binding of the 13C6 antibody within the ZMapp cocktail.

Interpretation

Retrospectively, we show the feasibility of using genomics to rapidly characterise a new Ebola virus variant within the timeframe of an outbreak. Phylogenetic analysis provides further indications that these variants are evolving at differing rates. Rapid in-silico analyses can direct in-vitro experiments to quickly assess medical countermeasures.

Funding: Defense Biological Product Assurance Office.

INTRODUCTION

On May 8, 2018, the Democratic Republic of the Congo declared an outbreak of Ebola virus disease (EVD) caused by Ebola virus (EBOV) (Ebola Outbreak Epidemiology Team, April-May 2018). The outbreak, which was officially declared over on July 24, 2018, included 54 documented EVD cases (38 laboratory-confirmed, 16 probable) and 33 deaths (case fatality rate 61.1%). All of the cases originated from three health zones (Bikoro, Iboko, and Wangata) located in the northwestern region of the Democratic Republic of the Congo's Equateur Province near Lake Tumba (Ntomba) (WHO, Sitrep 17, 2018). This epidemic was the ninth recorded EVD outbreak in the country. Previous EVD outbreaks occurred in 1976, 1977, 1995, 2007, 2008–09, 2014, and 2017, and an additional EVD outbreak, caused by Bundibugyo virus, in 2012 (Kuhn et al., 2018). On Aug 1, 2018, the tenth EVD outbreak in the Democratic Republic of the Congo was declared in the country's northeastern North Kivu Province (Mbala-Kingebeni et al., 2019). Multiple EVD outbreaks have also occurred in other parts of Middle Africa (defined according to UN Statistics Division geographical locations), including Republic of the Congo and Gabon, and a single outbreak occurred in Western Africa from 2013–16 (appendix). As part of the public health response for the 2018 Equateur Province EVD outbreak, Institut National de Recherche Biomédicale (INRB, Kinshasa, the Democratic Republic of the Congo), in collaboration with international partners, deployed three mobile laboratories in July, 2018, to each of the affected areas: Bikoro (Bikoro health zone), Itipo (Iboko health zone), and Mbandaka (Wangata health zone). Clinical samples (n=432; serum, urine, and saliva) were collected from people with

suspected EVD and tested in the mobile laboratories. Of these samples, 51 (collected from 38 confirmed cases) tested positive for EBOV RNA by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). Previous efforts at INRB using Oxford Nanopore Technologies' MinION device confirmed EBOV as the cause of the outbreak by sequencing a small fragment of the EBOV VP35 gene (polymerase cofactor) (Mbala-Kingebeni et al., 2019). To further characterise the EBOV variant causing the 2018 Equateur Province outbreak, we used the Illumina iSeq100 to obtain whole-genome sequences of EBOV from 38 positive cases, and compared the sequencing data with EBOV sequences from previous outbreaks in Africa. Additionally, we assessed the diagnostic assays, preventive vaccine, and immunotherapeutics against the EBOV variant circulating during the Equateur Province outbreak.

METHODS

Sample processing and sequencing

Whole-blood or saliva samples from patients with confirmed EBOV during the 2018 Equateur Province EVD outbreak, which had been subsequently stored at INRB, were used. The samples had been processed in mobile laboratories using the Qiagen QIAamp viral RNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and tested using RT-qPCR assays (appendix) by the outbreak response teams. Samples were re-tested at INRB with the Cepheid Xpert Ebola assay (Pinsky et al., 2015) and RNA quality was assessed with an Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Because of the possibility of RNA degradation, samples were processed for sequencing with viral targeted-enrichment methods, as previously described (Mate et al., 2015) and sequenced with an Illumina iSeq100 system (Illumina Technologies, San Diego, CA, USA). The consensus genome sequences were deposited in GenBank (MH733477–MH733491; appendix). Further details of sequencing methods can be found in the appendix. The study was approved by the Ministry of Health of the Democratic Republic of the Congo and oral consent was obtained from all patients before sample collection.

Molecular evolution and rate analysis

All EBOV near-complete genomes (sequences >17 kb in length) associated with known outbreaks were downloaded from GenBank, along with sampling location and date, and sequences with

long stretches of ambiguous bases and duplicates were removed. Alignments were done in Geneious, version 11.1.4, using MAFFT, version 7.388 (Katoh et al., 2013) To distinguish between a single spillover and multiple spillovers of EBOV into the human population, maximum-likelihood phylogenies were generated by use of RaxML (Stamatakis et al., 2014) with the GTRCAT model with 1000 bootstrap replicates. The maximum-likelihood phylogenies were used for estimates of root-to-tip distances, regression slopes, and correlations using TempEst (Rambaut et al., 2016) with the best-fitting root option. Tip divergence data were exported and mapped with linear regression (95% prediction interval) in Rstudio, version 3.2.3, with the R Stats and ggplot2 packages. Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees, version 1.8.4 (Drummond et al., 2012) was used to generate Bayesian phylogenies for each alignment. The initial dataset was reduced to representative sequences from each outbreak that were comparable with previous datasets (appendix) (Gire et al., 2014; Park et al., 2015) These phylogenies incorporated tip date information (ie, sample collection dates) to fit the genetic data to a molecular clock. Epidemiological data from outbreak records were used to predict the month of collection when specific dates were not available for a historical sample; otherwise, dates were parsed with appropriate variable precision. Each analysis consisted of 10 Å~ 10^8 to 50 Å~ 10^8 Markov chain Monte Carlo steps (25% of which were discarded as burn in), and parameters and trees were sampled every 100 000 generations. Extended information about partitions, substitution models, priors, and model testing is presented in the appendix. We also assessed the time to the most recent common ancestor of the Equateur Province outbreak sequences. If the time to the most recent common ancestor is substantially older than any associated epidemiological data, it could indicate two or more spillover events because the amount of genetic diversity cannot be accounted for within the short timeframe (Pybus et al., 2009).

Diagnostic assay analysis

During the outbreak, readily available assays targeting the RNA-directed RNA polymerase (L) gene (De Wit et al., 2016) a modified version of a nucleoprotein (NP) gene assay (Weidmann et al., 2004) and the multiplexed Cepheid Xpert Ebola assay (targeting glycoprotein [GP] and NP genes) (Pinsky et al., 2015) were used in the mobile laboratories to identify EBOV-positive samples. An in-silico analysis of 25 diagnostic assays was done by mapping primer and probe sequences for each assay to the available EBOV genome sequences from the 2018 Equateur

Province outbreak (appendix). The number and position of nucleotide mismatches within each primer and probe were identified and confirmed by a pairwise alignment (appendix).

Antibody binding confirmation

Multiple experimental monoclonal antibody therapeutics, directed to the EBOV glycoprotein (GP1,2), have been developed to treat EVD. Rapid in-silico analyses with the published binding regions for ZMapp and monoclonal antibody 114 were done to predict whether amino acid changes within the 2018 Equateur Province EBOV variant could affect the binding of antibodies with defined epitopes (appendix) (Davidson et al., 2015; Murin et al., 2014). We did in-vitro analyses to test binding affinity between the individual ZMapp monoclonal antibodies (13C6, 2G4, and 4G7) and the GP1,2 of the 2018 Equateur Province EBOV variant. Amino acid changes specific to the 2018 Equateur Province EBOV GP1,2 were introduced into an EBOV GP1,2 Kikwit expression plasmid by site-directed mutagenesis using Phusion polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and the primers listed in the appendix (GPKik; GenBank accession number AAQ55048.1). We generated a construct encoding all the amino acid changes found in the GP1,2 of the 2018 Equateur Province EBOV variant (GP“Tum”) and an additional construct with the Arg266Gly mutation (GP“Tum”+Arg266Gly). Constructs were confirmed with Sanger sequencing (Macrogen USA, Gaithersburg, MD) using inhouse primers specific to the plasmid backbone. Human embryonic kidney-derived 293T cells (CRL-3216; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were transfected with GPKik or one of the two constructs and processed by flow cytometry using the individual ZMapp monoclonal antibodies conjugated with phycoerythrin or allophycocyanin. Monoclonal antibody binding to GP1,2 variants of the 2018 Equateur Province EBOV was compared with binding to GPKik (gating strategy shown in the appendix). Monoclonal antibody 6D8 served as a positive binding control because its epitope is conserved between the EBOV/Kik and the 2018 Equateur Province EBOV variants (appendix). Data were collected with the BD LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analysed with FlowJo software, version 10.4.2. Detailed methods are available in the appendix.

Role of the funding source

The funder of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

RESULTS

On May 28, 2018, teams from the Institut Pasteur de Dakar (Dakar, Senegal) and the US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (Frederick, MD, USA) were invited to establish a genomics laboratory in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo (figure 14). The genomics laboratory was fully operational by June 14, 2018. After training local scientists on the Illumina iSeq100 sequencer, excess diagnostic samples from serum and saliva obtained from 38 patients diagnosed with EVD arrived at INRB, and initial sequencing efforts yielded 16 near-complete viral genome sequences (15 coding-complete and one draft) with a mean genome coverage of 99.64% (SD 0.62; appendix). Using the newly sequenced genomes, we estimated the most recent common ancestor to be April 26 (95% highest posterior density [HPD] April 10–May 8), 2018, which corresponds with the earliest probable EVD cases (figure 15). We estimated a maximum likelihood phylogenetic tree incorporating the 15 coding complete genomes from the 2018 Equateur Province EVD outbreak and 1011 other near complete EBOV genomes from GenBank (figure 3; appendix). This phylogenetic tree showed that all the sequences from the 2018 Equateur Province EVD outbreak clustered together, which together with the most recent common ancestor, is evidence of a single spillover event. The Equateur Province outbreak sequences are distinct from previous outbreaks, justifying the establishment of a new EBOV variant. Because of the proximity of the outbreak to Lake Tumba, we propose the variant be named “Tumba” (abbreviated to “Tum”), following current conventions (Kuhn et al., 2017). The topology of the maximum-likelihood phylogenetic tree (figure 16) shows that the closest relative to EBOV/“Tum” is the EBOV variant Lomela (EBOV/Lom) from the 2014 Democratic Republic of the Congo outbreak that occurred in Tshuapa Province, adjacent to Equateur Province (appendix). Similar to EBOV/Lom (De Wit et al., 2016), EBOV/“Tum” had a shorter branch length than expected (the number of substitutions per site resembled variants sampled from over 20 years ago) demonstrating a lower substitution rate than other EBOV variants (figure 16). We did

regression analysis of the root-to-tip distances over time (figure 16). The EBOV variants from outbreaks that started before 2014 lie close to the line of best fit, and within the 95% prediction interval, indicating a strong correlation between time and distance. However, both EBOV/“Tum” and EBOV/Lom fall below the linear regression line and outside the prediction interval. This position suggests a deviation from the clock-like evolution typically associated with EBOV and a slower than expected evolutionary rate. A Bayesian phylogenetic inference was used to examine the temporal relationships of EBOV/“Tum” within 50 EBOV genomes. The topologies of the maximum-likelihood (figure 16) and Bayesian phylogenetic (appendix) trees were in agreement, and once again, the closest relative of EBOV/“Tum” was EBOV/Lom, sharing a common ancestor around mid-2011 (95% HPD 2007 14; appendix). Estimates of the inter-outbreak (substitutions per site per year estimated using all EBOV variants) rate with inclusion of EBOV/“Tum” and EBOV/Lom converge on a mean rate of 0.69 Å~ 10–. substitutions per site per year (95% HPD 0.55–0.83 Å~ 10–.; appendix). The use of single representative datasets eliminates the potential bias created by the unequal representation of sequence data from past EVD outbreaks. We calculated inter-outbreak rates from single representative datasets before EBOV/Mak (Caroll et al., 2013) including EBOV/Mak (Park et al., 2015) and with all outbreaks including EBOV/“Tum” and EBOV/Lom (appendix). A trend was observed where the overall rate decreased with the addition of EBOV/“Tum” and EBOV/Lom.

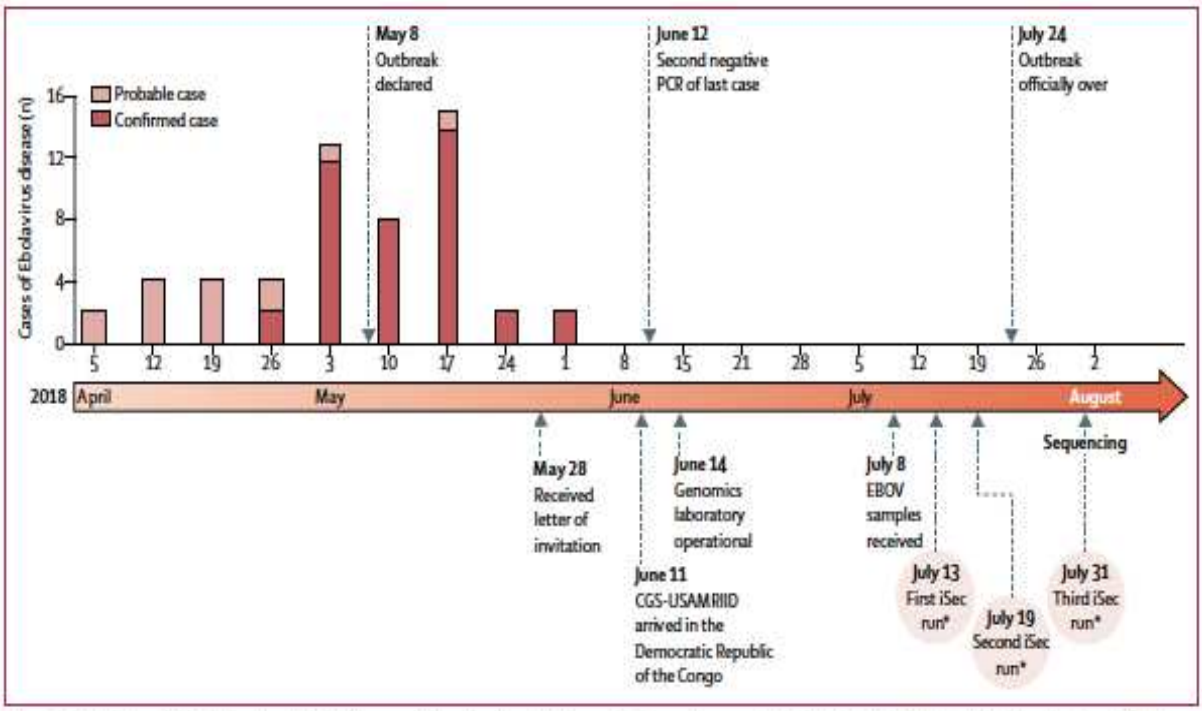


Figure 21. A timeline of the Ebola virus (EBOV) disease outbreak and establishment of genomics capacity at the Institut National de Recherche Biomédicale, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. The week of onset of illness for each probable and confirmed case is shown. Sequences were generated on the following day. CGS-USAMRIID-Center for Genome Sciences-USArmy Medical Research Institute of Infectious Diseases.

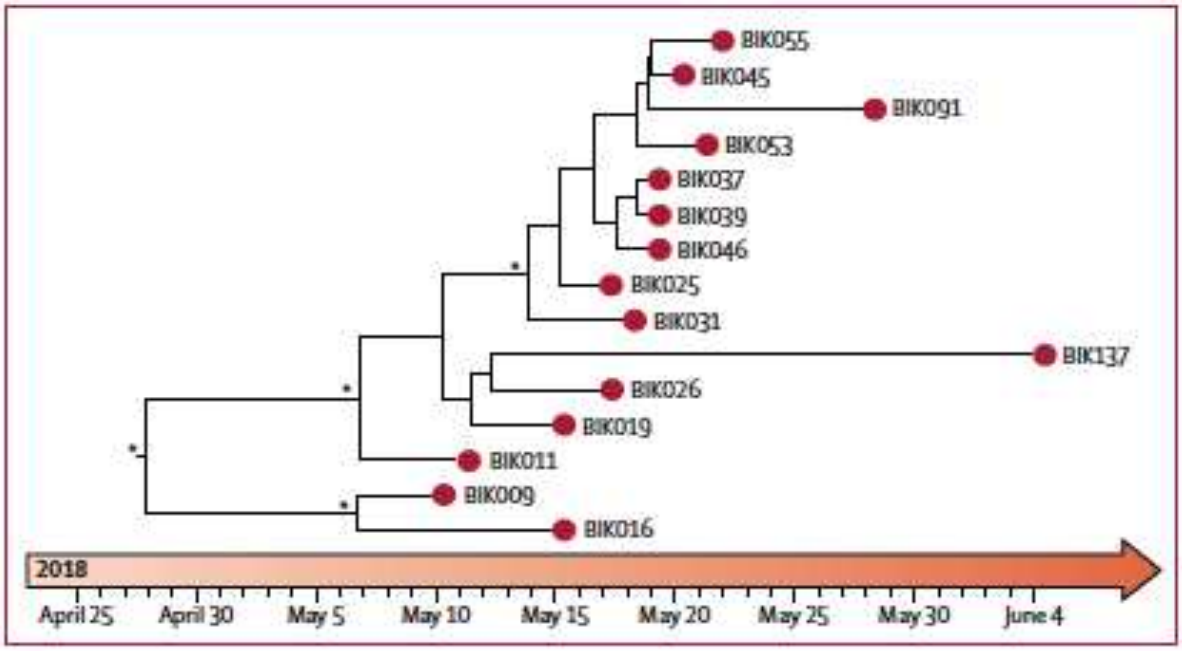


Figure 22. Phylogenetic analysis of the 2018 Equateur Province Ebola virus disease (EVD) outbreak. A temporally scaled maximum clade credibility tree from BEAST of the 2018 Equateur Province EVD outbreak with individual variants labelled. Posterior probabilities of more than 0.7.

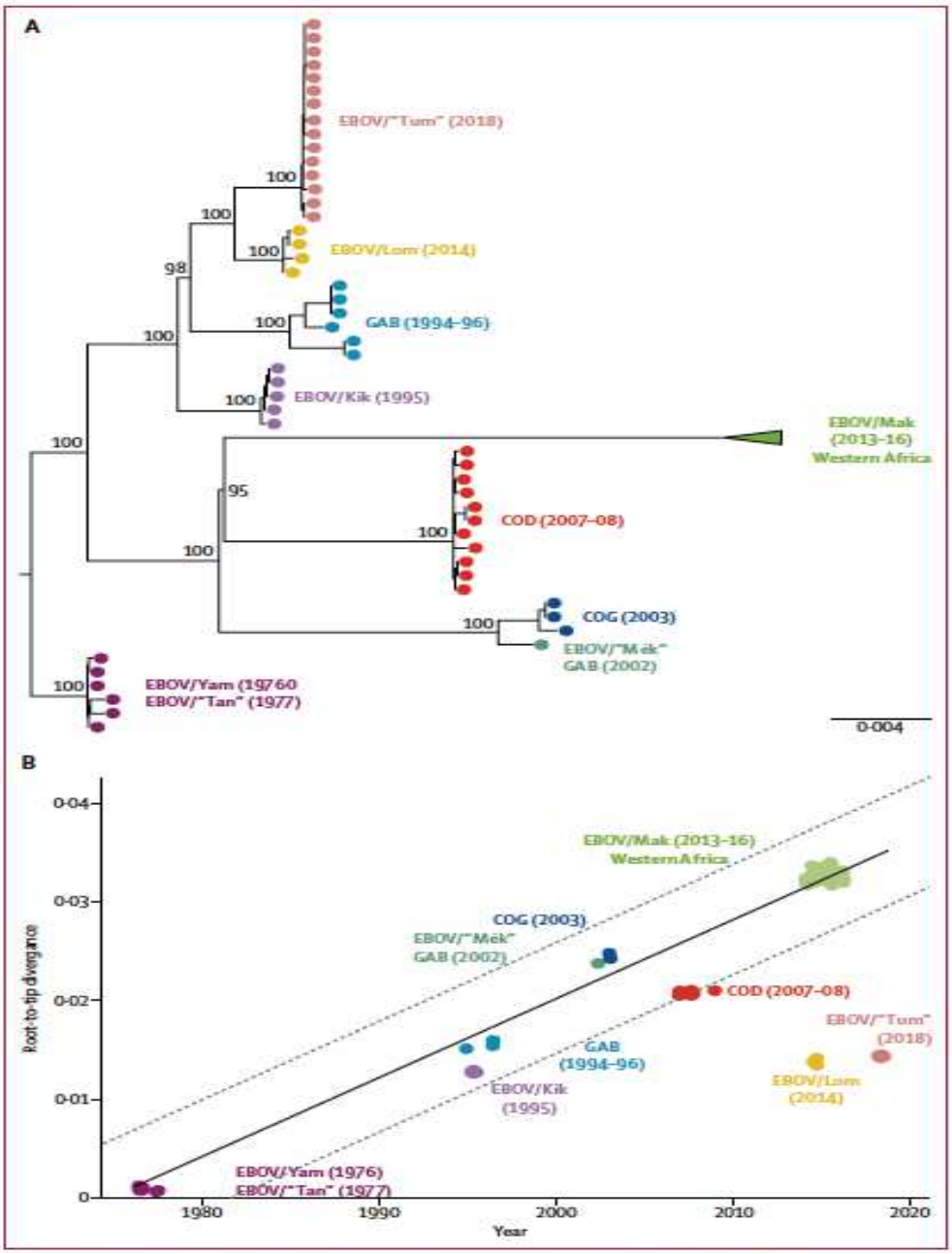


Figure 23. Phylogenetic and root-to-tip distance analysis of near-complete Ebola virus (EBOV) sequences. (A) A maximum-likelihood tree outgroup rooted with the EBOV/Yam and EBOV/''Tan'' variants using 1026 sequences. Numbers near nodes indicate percentage bootstrap values after 1000 replicates. Trees are scaled by subtitutions per site. (B) Root-to-tip divergence linear regression analysis using TempEst and R studio software of 1026 sequences, with outgroup rooted to the 1976 EBOV Yambuku clade. A 95% prediction interval is shown using dashed lines. The R2 is 0.53 using Pearson's product-moment correlation p<0.001. COD-Democratic Republic of Congo. COG-Republic of Congo. GAB-Gabon.

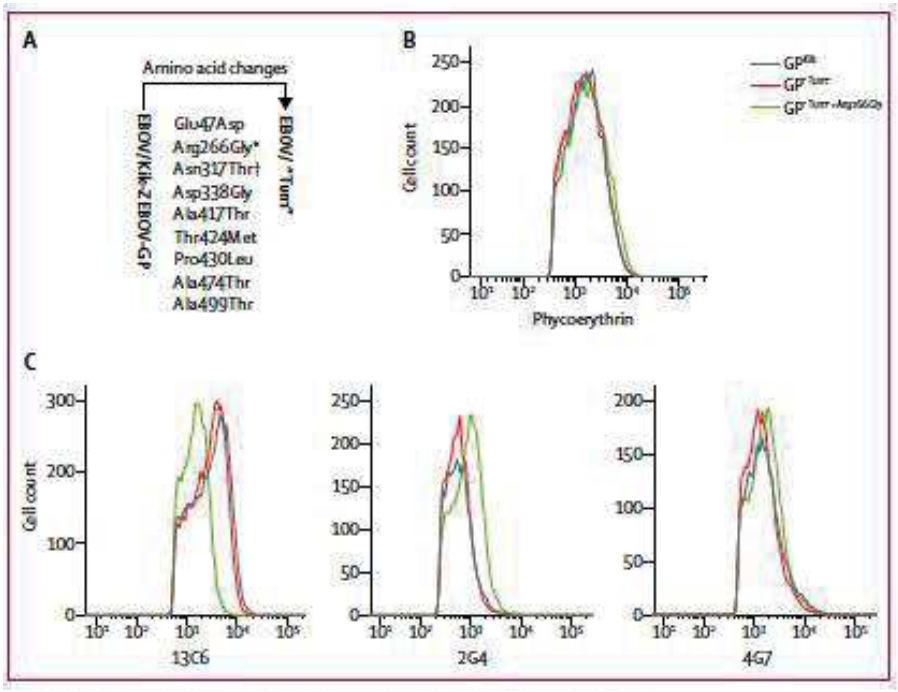


Figure 24. Binding of ZMapp monoclonal antibodies to EBOV/''Tum'' glycoprotein. (A) Amino acid changes between the EBOV/Kik GP1,2 and the 16 EBOV/''Tum''GP1,2 sequences. Changes were noted in all sequences, except where marked. Histogram plots compare cell counts with log fluorescence intensity and overlay cell population bound by the (B) phycoerythrin-conjugated binding control monoclonal antibodies 13C6, 2G4 et 4G7. EBOV-Ebolavirus, GP-glycoprotein. *Only found in patient sample BIK012. Only found in patient sample BIK091.

The intra-outbreak (substitutions per site per year estimated from an outbreak of a single EBOV variant) rate is an estimation of the rate of evolution within an outbreak. Before EBOV/"Tum", EBOV/Mak was the only variant with a large number of sequences across a suitable timeframe to calculate an intra-outbreak rate. With the 15 coding complete EBOV/"Tum" genomes, we estimated an intra outbreak rate of 3.6 Å~ 10–. (95% HPD 1.22–5.99 Å~ 10–.), a considerably higher mean rate than observed for EBOV/Mak (appendix). We tested three diagnostic PCR assays in silico for potential target erosion (appendix). Only a single mismatch was found in the middle of the reverse primer in the Cepheid Xpert Ebola NP assay. An analysis of additional assays and the polymorphisms and amino acid changes can be found in the appendix. The EBOV/"Tum" GP1,2 sequences were analysed to determine the proximity of any mutations to the known ZMapp monoclonal antibody binding sites (figure 17). Only the Arg266Gly mutation found in

patient sample BIK012 raised concerns because of its close proximity to residues Thr270 and Lys272, amino acids known to be part of the 13C6 monoclonal antibody binding site (appendix). An in-vitro assay was used to assess binding affinity between each individual ZMapp monoclonal antibody (13C6, 2G4, and 4G7) and EBOV/“Tum” GP1,2 (GP“Tum” and GP“Tum”+Arg266Gly). The monoclonal antibodies readily bound to GP“Tum” and GP“Tum”+Arg266Gly (figure 17), except monoclonal antibody 13C6, which exhibited reduced fluorescence when tested with GP“Tum”+Arg266Gly, indicating decreased binding efficiency of 13C6.

DISCUSSION

The generation of near-complete EBOV genomes was used extensively to characterise the 2013–16 Western African EVD outbreak. Approximately 5% of the confirmed cases were characterised genomically (Dudas et al., 2014). Initially, data were generated in laboratories outside of the affected countries, with the establishment of in-country sequencing later in the outbreak (Kugelman et al., 2015; Quick et al., 2016; Smits et al., 2015). Within 10 days of the 2018 Equateur Province EVD outbreak declaration, the MinION platform was used to sequence a short amplicon from the first two samples that were transported back to INRB (Mbala-Kingebeni et al., 2019). Less than 6 weeks after the declaration of the outbreak, a sequencing capacity incorporating the Illumina iSeq100 and protocols for generation of coding-complete EBOV genomes was established at INRB. As the outbreak was quickly contained, the near-complete viral genome data generated from the 2018 Equateur Province outbreak became part of a retrospective study. All sequencing data were generated at INRB within a productive international collaboration that included scientists from the Democratic Republic of the Congo, France, Senegal, and the USA, providing a functional in-country genomics capacity that was available for the start of the 2018 EVD outbreak in North Kivu. The sequencing analysis of the 2018 Equateur Province EVD outbreak revealed that the causative agent was a novel EBOV variant that we are calling “Tumba”. EBOV/“Tum” has evolved at a slower rate than other EBOV variants on the basis of on maximum-likelihood phylogenetic estimation, root-to-tip distances, and Bayesian analysis (figures 16; appendix). Reduced rates of evolution have been documented before from EVD cases caused by persistently infected sources (Blackley et al., 2016; Whitmer et al., 2018) and from the EBOV variant that caused the 2014 Democratic Republic of the Congo outbreak, EBOV/Lom (Lam et al., 2014). EBOV/Lom is, phylogenetically, the closest relative of EBOV/“Tum”, and the outbreaks

occurred in adjacent provinces. When EBOV/“Tum” and EBOV/Lom sequences were used in the calculation of inter-outbreak rates, we saw a reduction in the mean rate compared with previously calculated rates. All three of the estimates presented in the appendix used datasets of different sizes, which has an effect on the value of the mean rate (appendix). The use of single representatives for each outbreak (appendix) produced the same trend (ie, addition of EBOV/Lom and EBOV/“Tum” reduced the mean inter-outbreak rate) and is a simple way to standardise inter-outbreak rate analysis. We estimated a high intra-outbreak evolutionary rate compared with EBOV/Mak. However, the high mean value and wide distribution is probably the result of having a small sample size and incomplete purifying selection (Gire et al., 2014; Park et al., 2015). An early estimation with the first 81 EBOV/Mak genomes calculated a mean rate of 1.5 Å~ 10–. substitutions per site per year, but this decreased to 1.2 Å~ 10–. Substitutions per site per year when it was re-estimated at the end of the outbreak with more than 1500 genomes (Holmes et al., 2016) (appendix). Despite differences in rates of evolution between EBOV/Mak and EBOV/“Tum” (figure 16), the intra-outbreak rates of these variants are similar. This similarity suggests that EBOV/“Tum” did not intrinsically acquire mutations at a lower rate than EBOV/Mak because of functional changes within the viral genome— something that can be confirmed through viral growth kinetic studies. An alternative explanation is that EBOV/Lom and EBOV/“Tum” are both maintained in a reservoir characterised by a lower mutation rate, similar to the observation in the persistently infected human cases from the 2013–16 Western African outbreak. However, there is still much to be learned regarding the yet-to-be discovered reservoir hosts of EBOV, the complexity of its maintenance in nature, and the bottlenecks that might occur during spillover into the human population.

As part of the retrospective analysis of the 2018 Equateur Province EVD outbreak, we did rapid in-silico testing on available and deployed diagnostics and medical countermeasures. Of the three deployed RT-qPCR assays, only a single mismatch was found in the Cepheid Xpert Ebola NP target region. However, a single mismatch distant from the 3' end of a primer is unlikely to affect sensitivity or specificity (Lefever et al., 2013) Our data suggest that the amino acid differences in EBOV/“Tum” should have little effect on the rVSVΔG-ZEBOV-GP vaccine (appendix) and immunotherapies. We identified a novel amino acid change (Arg266Gly) in patient sample BIK012 that was in close proximity to the known binding epitope of monoclonal antibody 13C6 (appendix) (Davidson et al., 2015). Within an 8-day timeframe, invitro testing revealed a reduced

binding affinity, showing that this mutation affected binding of the 13C6 monoclonal antibody to GP“Tum”+Arg266Gly. The Arg266Gly mutation was only found in one sample, and the two remaining monoclonal antibodies were not affected by any mutations; thus, if deployed, overall ZMapp effectiveness would likely have been maintained. Overall, these results emphasise the power of sequencing data to enable the quick assessment of immunotherapies targeting the EBOV GP1,2.

Our heavy reliance on in-silico analyses is the main limitation in determining whether available medical countermeasures would be effective in treating a novel EBOV variant. However, in silico analyses are a fast and affordable approach to generate data while an outbreak is occurring, and they help to guide the downstream functional in-vitro and in-vivo studies that are time consuming and costly. We showed the usefulness of in-silico observations directing in-vitro assays, with the rapid discovery of the reduced binding of 13C6 monoclonal antibody to GP“Tum”+Arg266Gly. Although these data should not be used in isolation to determine the use of experimental medical countermeasures, they add to the very limited body of evidence. In such cases, we believe these data, coupled with a physician’s post-treatment observations, could be used to direct the choice of treatment when multiple experimental therapies are available. With the ability to rapidly identify and characterise the causative agent of an outbreak, the most appropriate diagnostics, preventive measures, and treatment options can be deployed. As sequencing becomes more readily available, we anticipate these applications and analyses will become more streamlined and a part of the routine outbreak response procedures. INRB is now equipped to do these analyses in real-time for future disease outbreaks, as already shown in the response to the 2018 North Kivu and Ituri EVD outbreak.

Contributors

PM-K, CBP, MRW, SK, SMG, GPS, EFD, ED, MS-L, MP, J-JM-T, AAS, GP, and SA-M conceived and designed the analysis. PM-K, CBP, AAz, MMD, SM-M, AAy, NV, OusF, OumF, AAr, JN, FM, DM, PM, JK, AM, SD, JL, EP, KC, and JG collected the data. PM-K, CBP, MRW, MMD, SM-M, AAy, NDP, JAC, MD, KC, MLB, TM, and SS did the analysis. PM-K, CBP, MRW, MMD, NDP, KC, JHK, GP, and SA-M wrote the Article.

Declaration of interests

Illumina donated the iSeq100, reagent cartridges, and flow cells to INRB. Illumina paid the costs for attendance of PM-K at the American Society of Tropical Medicine & Hygiene 2018 conference. MRW reports non-financial support from Illumina during the conduct of the study. CBP, MMD, SM-M, AAz, NDP, JAC, MD, AAy, NV, OusF, OumF, SK, AAr, JN, FM, DM, PM, JK, AM, SD, JL, EP, KC, MLB, JG, TM, SS, SMG, GPS, JHK, EFD, ED, MS-L, MP, J-JM-T, AAS, GP, SA-M declare no competing interests.

Acknowledgments

This work was supported by the Defense Biological Product Assurance Office through a task order awarded to the National Strategic Research Institute (FA4600-12-D-9000). We thank Bojan Obradovic, Bryan Crane, Phill Schaecher, Daniel Brekken, Amanda Young, and Jonathan Hetzel from Illumina for reagents and support setting up the iSeq100. We thank Laura Bollinger (Integrated Research Facility-Frederick, Frederick, MD, USA) and Jason Ladner (Northern Arizona University) for critically editing this manuscript. JHK's participation was funded, in part, through Battelle Memorial Institute's prime contract with the US National Institute of Allergy and Infectious Diseases under contract number HHSN272200700016I. This Article represents the opinions of the authors and does not represent the official policy or views of the US Department of the Army, the US Department of Defense, the US Department of Health and Human Services, the US Government, nor the institutions or companies affiliated with the authors.

Appendix

Establishment of a Genomic Capacity in the Democratic Republic of the Congo to Characterize the May–July 2018 Équateur Province Ebola Virus Disease Outbreak

Placide Mbala-Kingebeni[1,2,3]*, Catherine B. Pratt[4,5]*, Michael R. Wiley[4,5]*, Moussa M. Diagne[6]*, Sheila Makiala-Mandanda[1,3], Amuri Aziza[1], Nicholas Di Paola[4], Joseph A. Chitty[4], Mamadou Diop[6], Ahidjo Ayouba[2], Nicole Vidal[2], Ousmane Faye[6], Oumar Faye[6], Stomy Karhemere[1], Aaron Aruna[7], Justus Nsio[7], Felix Mulangu[7], Daniel Mukadi[3], Patrick Mukadi[1], John Kombe[7], Anastasie Mulumba[8], Sophie Duraffour[8,9], Jacques Likofata[10], Elisabeth Pukuta[1], Katie Caviness[4], Maggie L. Bartlett[4,11], Jeanette Gonzalez[4], Timothy Minogue[12], Shanmuga Sozhamannan[13,14], Stephen M. Gross[15], Gary P. Schroth[15], Jens H. Kuhn[16], Eric F. Donaldson[17], Eric Delaporte[2], Mariano Sanchez-Lockhart[4,11], Martine Peeters[2], Jean-Jacques Muyembe-Tamfum[1,3], Amadou Alpha Sall[6$], Gustavo Palacios[4$#], Steve Ahuka-Mundeke[1,3$]

• Institut National de Recherche Biomédicale (INRB), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.

• TransVIHMI, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Montpellier, Montpellier, France
• Service de Microbiologie, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.

• Center for Genome Sciences, United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID), Fort Detrick, Frederick, Maryland, USA.
• College of Public Health, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA.

• Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Senegal.

• Direction Générale de Lutte contre la Maladie (DLM), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.

• Monsieur le Représentant de l'Organisation Mondiale de la Santé, Boîte postale 1899 Kinshasa Gombe, Democratic Republic of the Congo.
• Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, Germany.

• Laboratoire Provinciale, Mbandaka, Democratic Republic of the Congo.

• Department of Pathology & Microbiology. University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA.

• Diagnostics Services Division, United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID), Fort Detrick, Frederick, Maryland, USA.
• Defense Biological Product Assurance Office, Joint Program Manager Guardian, Frederick, Maryland, USA.

• The Tauri Group, LLC., Alexandria, Virginia, USA.

• Illumina, Inc., San Diego, California, USA.

• Integrated Research Facility at Fort Detrick, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Fort Detrick, Frederick, Maryland, USA.
• Division of Antiviral Products, Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, Silver Spring, Maryland USA.

* These authors contributed equally.

$ These senior authors contributed equally.

#Corresponding Author: Gustavo Palacios, PhD; Director, Center for Genome Sciences, United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID), 1425 Porter Street, Room 632, Fort Detrick, Frederick, Maryland 21702, USA; Phone: +1-301-619-8732. Email: gustavo.f.palacios.ctr@mail.mil.

1. Background

1.1 Ethics statement

This study was approved by the Ministry of Health (MoH) in the Democratic Republic of the Congo (DRC). Oral consent was obtained at the patients' homes or in the Ebola Treatment Units prior to any sample collection by a team, including staff members of the MoH. The de-identified human diagnostic surveillance samples analyzed were also reviewed for the applicability of human subjects protection regulations under the project, "Sequencing of Samples in the Democratic Republic of the Congo (DRC)," United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID) Office of Human Use and Ethics Log Number FY18–21.

1.2 Mobile diagnostic laboratories in the field

Three mobile laboratories were set up in the field by Institut National de Recherche Biomédicale (INRB), with partners, in Bikoro, Itipo and Mbandaka. Bikoro laboratory was based at the General Reference Hospital of Bikoro close to the Ebola treatment unit (ETU) managed by Medecins Sans Frontieres (MSF), and staffed by four scientists (3 INRB and 1 Institute of Tropical Medicine Antwerp). Itipo laboratory was based at the Health Reference Center of Itipo, staffed by three scientists (1 INRB, 1 Institut Pasteur de Dakar (IPD) and 1 local), with cold chain supported by ALIMA. Mbandaka laboratory was based in the ETU managed by MSF located approximately 15km (southwest) from Mbandaka city, and staffed by three scientists (1 INRB, 1 IPD and 1 MSF). Each laboratory had access to generator power, one fridge (+4 ^{o}C) and one freezer (-20°C). Mbandaka laboratory was the only laboratory based within an ETU, in a temporary tent construction. The two other laboratoriess were based in hospital buildings.

All of the positive samples presented in this paper were tested at the Bikoro laboratory. The Bikoro laboratory performed EBOV diagnostics with assays targeting the *L* gene, [1] a modified version of an *NP* gene assay [2] and the multiplexed cartridge -based *GP*/*NP* gene Cepheid Xpert Ebola assay on the GeneXpert platform. The Itipo laboratory performed diagnostics using the modified *NP* and the GeneXpert assay, and the Mbandaka laboratory solely used the GeneXpert assay.

2. Methods

2.1 Sample processing and sequencing – extended method

We decided to deploy illumina technology for several reasons. The small size of the iSeq100 and the ability to just plug it in and function without the need of a trained technician for setup. The higher quality data achieved by the Illumina iSeq100 enables full genome characterization, which is crucial to evaluate the efficacy of medical countermeasures (MCMs) giving confidence in all single nucleotide polymorphism (SNPs) that are detected. Samples with degraded RNA can be processed with a higher success rate using Illumina library preparation kits (i.e. Truseq RNA Exome), as the long-read length advantage of the MinION is nullified and need for amplicon sequencing for low viral load samples will also be affected by poor RNA quality. Illumina based sequencing allowed for the use of the same protocol on all sample types without having to make any modifications.

RNA sequencing libraries were prepared using the KAPA RNA HyperPrep kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA), with xGen Dual Index UMI Adaptors (Integrated DNA Technologies, Skokie, IL, USA) following manufacturers' guidelines. RNA was fragmented at 94ºC for 0.5–2 min (depending on the quality of the RNA), and 20 ng of fragmented (6 min fragmentation at 94ºC) cervical adenocarcinoma (HeLa- S3) Total RNA (Ambion, Foster City, CA, USA) was spiked into each sample to facilitate optimal ligation efficiency and library preparation. Enrichment-based EBOV sequencing was performed using the Illumina TruSeq RNA Exome (formerly TruSeq RNA Access) enrichment reagents. One-quarter quantities of these reagents were used for singleplex enrichment with a custom EBOV biotinylated probe set, including 1,897 unique probes of 80 nt in length (Twist Biosciences, San Francisco, CA, USA).[3] Analysis of data was performed as described previously [3] using a Dell Precision laptop (m6800, 32g RAM, Intel Xeon 4 core) with all scripts and programs preloaded before shipment. Only bases with a Phred quality score R20 or better were used for consensus calling. Subsequently, the sequences of the earliest isolate of the local (Équateur Province) EBOV variant was used as a reference (MH733477) for the final analysis and imputation of SNPs.

2.2 Bayesian analysis using BEAST – extended method

Phylogenetic relationships and evolutionary rates were modeled according to the Hasegawa - Kishino-Yano 85 (HKY85) [4] model with gamma-distributed rate variation among sites (HKY85 + Γ4), which were independently inferred (unlinked) across three partitions (codon positions 1 and 2, non-coding, and codon position 3). This model was supported by jModeltest2 [5] and extensively used in previous analyses.[6] Partitions shared an uncorrelated lognormal relaxed molecular clock, which allowed different lineages to evolve at different rates over time,[7] a non-parametric coalescent 'SkyGrid' model (number of grid points + 1 = 50) as a prior density across trees,[8] and an evolutionary rate prior (gamma distribution, shape = 0.001, scale = 1,000). Tracer v.1.6 [9] was used to ensure run convergence (effective sample size >200) and TreeAnnotator1.8.4 [10] was used to calculate a maximum-clade credibility (MCC) tree using a posterior probability limit of 0.7, which removes summary statistics from nodes with low support. To explore the intra-outbreak analysis of 15 coding-complete Équateur Province outbreak sequences, the same partition scheme, nucleotide substitution model, and rate prior were used but with a strict clock model and with exponential coalescent tree prior, for a better fit to the data. Combinations of a strict clock, uncorrelated lognormal relaxed clock, random local clock, constant tree prior and SkyGrid tree

prior were evaluated for inter- and intra-outbreak using path sampling and stepping-stone sampling with default chain lengths and steps.[11]

2.3 Antibody binding confirmation – extended method

Human embryonic kidney derived 293T cells (CRL-3216, ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Corning, NY, USA) with 10% HyClone characterized fetal bovine serum (FBS; GE Healthcare Lifesciences, Pittsburg, PA, USA), 2 mM of HyClone l-glutamine (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 U/ml of penicillin (ThermoFisher Scientific), and 100 µg/ml of streptomycin (ThermoFisher Scientific) and maintained at 37°C in a humidified 5% CO2 atmosphere. 293T cells were transfected with the plasmid encoding EBOV/Kik GP 1,2 or 2018 Équateur Province EBOV GP1,2 using TransIT -LT1 transfection reagent (Mirus Bio, Madison, WI, USA) per manufacturer guidelines. GP1,2 expression was driven via a tetracycline inducible promoter by the addition of doxycycline (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After 24 h of induction, cells were collected and processed for flow cytometry with the LIVE/DEAD fixable aqua stain (Invitrogen) to gate for live/dead cells and the 6D8 monoclonal antibody (control antibody) and individual ZMapp monoclonal antibodies (13C6, 2G4, 4G7). Monoclonal antibodies (mAbs) were conjugated with phycoerythrin (PE) (6D8, mouse IgG2a) or allophycocyanin (APC) (13C6/2G4/4G7, human IgG) using a species- and isotype -specific Zenon antibody labeling kit (ThermoFisher Scientific) and used to assess antibody binding to the different EBOV GP1,2 constructs. Samples were analyzed on a BD LSRFortessa cell analyzer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and data were analyzed with FlowJo software version 10.4.2 (TreeStar, Ashland, OR, USA). Intact cells were gated using forward scatter (FSC-A) by side scatter (SSC-A), single cells were gated from the intact cell population using side scatter width by area (SSC-W x SSC-A), and live cells were defined as those negative for the LIVE/DEAD fixable aqua stain. PE- and APC-positive populations were determined using untransfected HEK 293T cells stained with mAbs as described above.

3 Results

3.1 Establishment of a genomic capacity at INRB to sequence samples from the 2018 Équateur Province EVD outbreak - extended

On May 28 th 2018, teams from the Institut Pasteur de Dakar (IPD) and the United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID) received a letter of invitation from the Director -General of INRB to establish a genomics laboratory in Kinshasa, DRC (Figure 1, Figure 2a). Personnel arrived in DRC on June 11th 2018 with all the required reagents and equipment, including an Illumina iSeq100 sequencer. All components were transported via checked baggage on the airplane, with sufficient reagents for whole genome sequencing of 96 samples (listed in Appendix, page s 6- 7). The genomics lab was fully operational by June 14th 2018 and a set of non-EBOV samples were loaded onto the iSeq100 June 19th 2018.

Two INRB scientists were trained in the following aspects of next generation sequencing (NGS): library preparation, iSeq100 loading, and data analysis. EBOV-positive samples arrived from the field on July 8th 2018. The trainees started library preparation of seven samples and loaded the iSeq100 on July 13th 2018. An additional two sequencing runs were performed with 16 and 10 samples on July 19th 2018 and July 31st 2018, respectively. These initial sequencing efforts at INRB yielded 16 near-complete viral genome sequences (15 coding-complete and 1 draft) with an average genome coverage of 99.64% (97.88% to 99.91%).

3.2 Limited signature erosion indicated that deployed PCR-based diagnostic assays were appropriate for detecting EBOV/"Tum"

A further twenty-one detection assays were also tested *in silico*. Eleven sets exhibited at least one mismatch across the primers and probe after alignment to the EBOV/"Tum" genomes (**Table S5**). Four primer sets had two mismatches in one or more primer/probe sets. The majority of the diagnostic assays with mismatches in primer/probe regions targeted the EBOV L gene, the largest EBOV gene and the one that accumulated the highest number of SNPs among EBOV/"Tum" genomes. Together, our results indicate that PCR- based EBOV diagnostic assays would benefit from being continuously assessed with each newly emerging EBOV variant, as early as possible, to ensure that the most appropriate diagnostic assays are used during the outbreak.

3.3 Changes in antigenic sites of the 2018 Équateur Province Ebola virus variant glycoprotein should not affect rVSVΔG-ZEBOV-GP vaccine or mAb114 efficacy

The Merck V920 recombinant vesicular stomatitis Indiana virus encoding EBOV/Kik GP1,2 (rVSVΔG-ZEBOV-GP) was deployed for the vaccination of health-workers and first responders, and for ring vaccination in Bikoro, Itipo, and Mbandaka. To evaluate the changes in this protein, we compared EBOV/"Tum" GP 1,2 to the EBOV/Kik sequence, AY354458 (Table S8). A total of nine amino acid differences were observed. Seven of these amino acid differences (E047D, D338G, A417T, T424M, P430L, A474T, A499T) are present in all of the 16 EBOV/"Tum" GP1,2 protein sequences, and two are only present in single EBOV/"Tum" GP1,2 sequence (R266G from

patient BIK012 and N317T from patient BIK091). The SNP that causes the R266G mutant in patient BIK012 (A->G position 6834) had a frequency of 0.5 at a site of only 2x coverage, multiple re -sequencing attempts failed to expand this coverage. Although this change was observed only once, we include it for further antigen assessment, as the assessment was designed to have the most conservative approach to MCM evaluation. None of these amino acid changes occur inside regions deemed important in the structure and function of GP1,2.[12-15] These changes therefore should have little or no effect on the efficacy of the V920 vaccine-generated immunity against EBOV/"Tum" infection. Further testing should be conducted to ensure V920 would provide protection against EBOV/"Tum" infection.

Rapid *in silico* analyses including evaluation of known monoclonal antibody (mAb) crystal structures and/or amino acid positions known to be important for mAb binding may be useful to identify amino acid changes that may affect binding of therapeutic mAbs. For effective *in silico* analyses, mAbs must be well characterized with a known crystal structure and/or binding epitope. Here, we provide an *in silico* analysis of mAb114 using the known crystal structure. mAb114 was the only monoclonal antibody treatment approved by the DRC Ministry of Health ethics committee during the 2018 Équateur Province outbreak. It was developed from antibodies that were isolated from a survivor 11 years after the 1995 outbreak in DRC (EBOV/Kik).[16] Since we were unable to obtain mAb114 for testing, we analyzed previously published structural and antibody binding data to assess binding. Utilizing the crystal structure of mAb114 bound to EBOV GP1,2 (Figure S4), we identified critical residues on the GP core (residues 113–121) likely to be important for mAb114 binding.[16,17] Since it was also reported that mAb114 and mAb 13C6 compete for binding, we also evaluated residues at the glycan cap and critical residues for 13C6 binding (270 and 272). EBOV/"Tum" GP mutations were not found in the residues deemed important for mAb114 recognition of EBOV GP, making it likely mAb114 can bind to the DRC outbreak GP. However, *in vitro* testing should be performed to confirm this analysis since residues in close proximity to the binding site can affect binding, and those effects cannot be evaluated *in silico*.

4 List of consumables and equipment transported to DRC to perform sequencing.

CONSUMABLES

Transported and stored at -20°C

Manufacturer	Item	Quantity
Agilent	Bioanalyzer RNA Pico Ladder	1 tube
IDT	xGen Dual Index UMI Adapters—Tech Access	1 plate
Illumina	iSeq reagent cartridge	8 kits
Illumina	PhiX Control v3	4 x 10ul
Illumina	TruSeq® RNA Enrichment (12 enrichments)	2 kits
Invitrogen	HeLa-S3 Total RNA	100ul
KAPA	KAPA RNA HyperPrep kit (96 libraries)	1 kits
KAPA	qPCR Complete kit (universal) reagents	2 kits
Twist Biosciences	USAMRIID Twist v1 probes (EBOV-specific probes)	300ul

Transported and stored at 4°C

Manufacturer	Item	Quantity
Agencourt	AMPure XP beads	20 mls
Agilent	Bioanalyzer RNA 6000 Pico kit	1 kits
Agilent	DNA 1000 Kit	1 kits
Agilent	High Sensitivity DNA Kit	2 kits
Illumina	iSeq flow cell	8 flow cells

Illumina	TruSeq® RNA Enrichment (12 enrichments)	2 kits
KAPA	RNA HyperPrep kit (96 libraries)	1 kits

Transported and stored at room temperature

Manufacturer	Item	Quantity
Agilent	Bioanalyzer RNA Pico Microfluidic chips	1 kits
Agilent	Bioanalyzer HS DNA Microfluidic chips	2 kits
Agilent	Bioanalyzer DNA 1000 Microfluidic chips	1 kits
Agilent	Bioanalyzer test Chip Kit	1 kit
Ambion	Nuclease-free water	4 x 50ml
Applied Biosystems	qPCR plates	1 x 20 plates
Eppendorf	1.5ml tubes	4 x 50 tubes
Fisher Scientific	Pipette basin	4 x pack of 10

Qiagen	QIAamp Viral RNA Extraction kit	1 kit
Rainin	Tips 1000ul filter	2 boxes of 96
Rainin	Tips LTS tips 20ul filter	80 boxes of 96
Rainin	Tips LTS 200ul Filter	70 boxes of 96
Thermo Scientific	50ml falcon tube	1 pack of 25
USA Scientific	0.2ml PCR tubes	5 x 120 tubes

EQUIPMENT

Manufacturer	Item	Quantity
Agilent	Bioanalyzer 2100	1 item
Bulldog	iQ Bioshaker	1 item
Dell	Laptop (for analysis)	1 item
Illumina	iSeq100 sequencer	1 item
Rainin	10ul Pipette	1 item
Rainin	20ul pipette	1 item
Rainin	100ul Pipette	1 item
Rainin	200ul pipette	1 item
Rainin	1000ul Pipette	1 item
Rainin	20ul 8 channel pipette	1 item
Rainin	200ul 8 channel pipette	1 item

5 References

2 de Wit E, Rosenke K, Fischer RJ, et al. Ebola laboratory response at the Eternal Love Winning Africa Campus, Monrovia, Liberia, 2014-2015. *J Infect Dis* 2016; **214**(suppl 3): S169-S76.

3 Weidmann M, Muhlberger E, Hufert FT. Rapid detection protocol for filoviruses. *J Clin Virol* 2004; **30**(1):94-9.

4 Mate SE, Kugelman JR, Nyenswah TG, et al. Molecular evidence of sexual transmission of Ebola virus. *N Engl J Med* 2015; **373**(25): 2448-54.

5 Hasegawa M, Kishino H, Yano T-a. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution* 1985; **22**(2): 160-74.

6 Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 2012; **9**(8): 772.

7 Liu SQ, Rayner S, Zhang B. How Ebola has been evolving in West Africa. *Trends Microbiol* 2015; **23**(7):

387-8.

8 Minin VN, Bloomquist EW, Suchard MA. Smooth skyride through a rough skyline: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics. *Mol Biol Evol* 2000; **25**: 1459-71.

9 Gill MS, Lemey P, Faria NR, Rambaut A, Shapiro B, Suchard MA. Improving Bayesian population dynamics inference: a coalescent-based model for multiple loci. *Mol Biol Evol* 2013; **30**(3): 713-24.

10 Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol* 2018; **67**(5): 901-4.

11 Rambaut A. TreeAnnotator. 1.6.1 ed; 2010.

12 Baele G, Lemey P, Bedford T, Rambaut A, Suchard MA, Alekseyenko AV. Improving the accuracy of demographic and molecular clock model comparison while accommodating phylogenetic uncertainty. *Mol Biol Evol* 2012; **29**(9): 2157-67.

13 Chandran K, Sullivan NJ, Felbor U, Whelan SP, Cunningham JM. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* 2005; **308**(5728): 1643-5.

14 Dias JM, Kuehne AI, Abelson DM, et al. A shared structural solution for neutralizing ebolaviruses. *Nat Struct Mol Biol* 2011; **18**(12): 1424-7.

15 Lee JE, Fusco ML, Hessell AJ, Oswald WB, Burton DR, Saphire EO. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature* 2008; **454**(7201): 177-82.

16 Miller EH, Obernosterer G, Raaben M, et al. Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor. *EMBO J* 2012; **31**(8): 1947-60.

17 Corti D, Misasi J, Mulangu S, et al. Protective monotherapy against lethal Ebola virus infection by a potently neutralizing antibody. *Science* 2016; **351**(6279): 1339-42.

18 Misasi J, Gilman MS, Kanekiyo M, et al. Structural and molecular basis for Ebola virus neutralization by protective human antibodies. *Science* 2016; **351**(6279): 1343-6.

19 Pinsky BA, Sahoo MK, Sandlund J, et al. Analytical performance characteristics of the Cepheid GeneXpert Ebola assay for the detection of Ebola virus. *PLoS One* 2015; **10**(11): e0142216.
20 Gire SK, Goba A, Andersen KG, et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* 2014; **345**(6202): 1369-72.
21 Sanchez A, Ksiazek TG, Rollin PE, et al. Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. *J Infect Dis* 1999; **179 Suppl 1**: S164-9.
22 Trombley AR, Wachter L, Garrison J, et al. Comprehensive panel of real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for detection and absolute quantification of filoviruses, arenaviruses, and New World hantaviruses. *Am J Trop Med Hyg* 2010; **82**(5): 954-60.
23 Towner JS, Sealy, T.K., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T. . High-throughput molecular detection of hemorrhagic fever virus threats with applications for outbreak settings. *Journal of Infectious Diseases* 2007; **196**(Suppl 2): S205-S12.
24 Zhai J, Palacios G, Towner JS, et al. Rapid molecular strategy for filovirus detection and characterization. *J Clin Microbiol* 2007; **45**(1): 224-6.
25 Panning M LT, Olschlager S, Eickmann M, Becker S, Raith S, Courbot MC, Nilsson M, Gopal R, Lundkvist A, di Caro A, Brown D, Meyer H, Lloyd G, Kummerer BM, Gunther S, Drosten C. Diagnostic reverse-transcription polymerase chain reaction kit for filoviruses based on the strain collections of all European biosafety level 4 laboratories. *Journal of Infectious Diseases* 2007; **196**(Suppl 2): S199-204.
26 Gilda Grard RB, Jean-Jacques Muyembe Tamfum, Joseph Fair, Nathan Wolfe, Pierre Formenty, Janusz Paweska, and Eric Leroy. Emergence of Divergent Zaire Ebola Virus Strains in Democratic Republic of the Congo in 2007 and 2008. *The Journal of Infectious Diseases* 2011; **204**: S776–S84.
27 Gustavo Palacios TB, Vishal Kapoor, Omar Jabado, Zhiqiang Liu, Marietjie Venter, Junhui Zhai, Neil Renwick, Allen Grolla, Thomas W. Geisbert, Christian Drosten, Jonathan Towner, Jingyue Ju, Janusz Paweska, Stuart T. Nichol, Robert Swanepoel, Heinz Feldmann, Peter B. Jahrling, and W. Ian Lipkin. MassTag Polymerase Chain Reaction for Differential Diagnosis of Viral Hemorrhagic Fevers. *Emerging Infectious Diseases* 2006; **12**(4): 692-5.
28 Leroy EM1 BS, Lu CY, McCormick JB, Georges AJ, Georges-Courbot MC, Lansoud-Soukate J, Fisher-Hoch SP. Diagnosis of Ebola haemorrhagic fever by RT-PCR in an epidemic setting. *Journal of Medical Virology* 2000; **60**(4): 463-7.
29 Morvan JM, Deubel V, Gounon P, et al. Identification of Ebola virus sequences present as RNA or DNA in organs of terrestrial small mammals of the Central African Republic. *Microbes Infect* 1999; **1**(14): 1193-201.
30 Sanchez A, Lukwiya M, Bausch D, et al. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J Virol* 2004; **78**(19): 10370-7.
31 Strong JE, Wong G, Jones SE, et al. Stimulation of Ebola virus production from persistent infection through activation of the Ras/MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(46): 17982-7.
32 Gunther S, Asper M, Roser C, et al. Application of real-time PCR for testing antiviral compounds against Lassa virus, SARS coronavirus and Ebola virus in vitro. *Antiviral Res* 2004; **63**(3): 209-15.

33 Koehler JW, Hall AT, Rolfe PA, et al. Development and evaluation of a panel of filovirus sequence capture probes for pathogen detection by next-generation sequencing. *PLoS One* 2014; **9**(9): e107007.
34 Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 2013; **30**(4): 772-80

Table S1. Information on the 16 EBOV/"Tum" genomes generated from the May-July 2018 EBOV outbreak in of the Congo.

Lab ID	Genbank Accesion number	Health Zone	Sample Type	Date Onset of Symptoms	Date Sample Collected	Date Sample Tested	Date Sample Sequenced	Gen Stand
BIK009	MH733477	IBOKO	Serum	4-May-18	10-May-18	16-May-18	19-Jul-18	CC
BIK011	MH733478	IBOKO	Serum	4-May-18	11-May-18	16-May-18	19-Jul-18	CC
BIK012*	MH898466	BIKORO	Serum	3-May-18	11-May-18	16-May-18	19-Jul-18	Draft
BIK016	MH733479	IBOKO	Serum	unknown	15-May-18	16-May-18	13-Jul-18	CC
BIK019	MH733480	BIKORO	Serum	13-May-18	15-May-18	16-May-18	13-Jul-18	CC
BIK025	MH733481	IBOKO	Serum	13-May-18	17-May-18	18-May-18	13-Jul-18	CC
BIK026	MH733482	IBOKO	Serum	8-May-18	17-May-18	18-May-18	13-Jul-18	CC
BIK031	MH733483	IBOKO	Serum	5-May-18	18-May-18	19-May-18	13-Jul-18	CC
BIK037	MH733484	IBOKO	Serum	18-May-18	19-May-18	20-May-18	31-Jul-18	CC
BIK039	MH733485	IBOKO	Serum	15-May-18	19-May-18	20-May-18	13-Jul-18	CC
BIK045	MH733486	IBOKO	Saliva	15-May-18	20-May-18	21-May-18	19-Jul-18	CC
BIK046	MH733487	IBOKO	Saliva	7-May-18	19-May-18	21-May-18	19-Jul-18	CC
BIK053	MH733488	IBOKO	Serum	20-May-18	21-May-18	22-May-18	19-Jul-18	CC
BIK055	MH733489	IBOKO	Serum	20-May-18	22-May-18	23-May-18	19-Jul-18	CC
BIK091	MH733490	IBOKO	Serum	23-May-18	28-May-18	29-May-18	31-Jul-18	CC
BIK137	MH733491	IBOKO	Serum	2-Jun-18	4-Jun-18	6-Jun-18	31-Jul-18	CC

*Consensus genome is based on 2x coverage, with an R at site 6834 indicating an A or G at that position

CC denotes coding-complete genome

Table S2. List of the 1,026 sequences included in the maximum-likelihood phylogenetic analysis

GenBank Accession number (tip)	Country	Date	Distance	Residual
KJ660348.2	Guinea	2014.25	0.031769633	1.99E-04
KX000399.1	Guinea	2014.186301	0.031929905	4.10E-04
KX000400.1	Guinea	2014.210959	0.031930905	3.92E-04
KY425657.1	Guinea	2014.210959	0.031985712	4.46E-04
KY425645.1	Guinea	2014.210959	0.031985712	4.46E-04
KX000398.1	Guinea	2014.186301	0.031931905	4.12E-04
KT013255.3	Guinea	2014.210959	0.03187745	3.38E-04
KT013254.3	Guinea	2014.210959	0.03187745	3.38E-04
KR817199.1	Guinea	2014.276712	0.03187647	2.84E-04
KR817200.1	Guinea	2014.279452	0.03171824	1.24E-04
KR817198.1	Guinea	2014.273973	0.031770814	1.81E-04
KR817183.1	Guinea	2014.243836	0.031981259	4.15E-04
KR817195.1	Guinea	2014.254795	0.031977484	4.03E-04
KR817179.1	Guinea	2014.235616	0.032035666	4.76E-04
KR817207.1	Guinea	2014.353425	0.032142493	4.88E-04
KR817210.1	Guinea	2014.364384	0.032470109	8.07E-04
KR817212.1	Guinea	2014.383562	0.032373443	6.95E-04
KR817226.1	Guinea	2014.438356	0.032214678	4.92E-04
KR817209.1	Guinea	2014.356164	0.032091556	4.35E-04
KR817208.1	Guinea	2014.356164	0.032251924	5.95E-04
KR817211.1	Guinea	2014.375342	0.032074454	4.02E-04
KR817215.1	Guinea	2014.391781	0.032090046	4.05E-04
KR817214.1	Guinea	2014.386301	0.032090046	4.09E-04
KR817204.1	Guinea	2014.328767	0.032089957	4.55E-04
KR817206.1	Guinea	2014.345205	0.032143549	4.96E-04
KR817205.1	Guinea	2014.345205	0.032250369	6.03E-04
KR817194.1	Liberia	2014.246575	0.031823041	2.55E-04

KR534543.1	Guinea	2014.756164	0.032356795	3.77E-04
KR534549.1	Guinea	2014.764384	0.032357795	3.72E-04
KR534581.1	Guinea	2014.731507	0.032410313	4.51E-04
KR534574.1	Guinea	2014.813699	0.032197384	1.71E-04
KR534573.1	Guinea	2014.813699	0.03230299	2.77E-04
KR534572.1	Guinea	2014.810959	0.03230299	2.79E-04
KU296481.1	SierraLeone	2015.178082	0.03273496	4.15E-04
KU296764.1	SierraLeone	2015.224658	0.032842471	4.85E-04
KR534556.1	Guinea	2014.772603	0.032411525	4.19E-04
KR534571.1	Guinea	2014.810959	0.03235906	3.35E-04
KR534546.1	Guinea	2014.764384	0.032412482	4.26E-04
KR534591.1	Guinea	2014.764384	0.03236006	3.74E-04
KR534544.1	Guinea	2014.756164	0.032305661	3.26E-04
KR534545.1	Guinea	2014.761644	0.032305661	3.22E-04
KR534558.1	Guinea	2014.780822	0.032573901	5.74E-04
KR534569.1	Guinea	2014.808219	0.032518355	4.97E-04
KR534537.1	Guinea	2014.739726	0.032306658	3.40E-04
KR534583.1	Guinea	2014.750685	0.032306658	3.32E-04
KR817218.1	Guinea	2014.413699	0.032142528	4.39E-04
KR817216.1	Guinea	2014.391781	0.032035678	3.50E-04
KR534509.1	Guinea	2014.558904	0.032194952	3.75E-04
KR534510.1	Guinea	2014.567123	0.032142537	3.16E-04
KR817225.1	Guinea	2014.438356	0.032194899	4.72E-04
KR817223.1	Guinea	2014.435616	0.032250263	5.30E-04
KR817213.1	Guinea	2014.383562	0.032409407	7.31E-04
KR817217.1	Guinea	2014.40274	0.032516335	8.22E-04
KR817224.1	Guinea	2014.435616	0.032196865	4.76E-04
KR817107.1	Guinea	2014.542466	0.032461865	6.55E-04
KR817230.1	Guinea	2014.465753	0.032140761	3.96E-04
KR817237.1	Guinea	2014.479452	0.032089511	3.33E-04
KR817222.1	Guinea	2014.435616	0.032088081	3.67E-04
KR817196.1	Guinea	2014.263014	0.032034682	4.53E-04

KR817185.1	Guinea	2014.243836	0.032410061	8.44E-04
KR817184.1	Guinea	2014.243836	0.032088499	5.23E-04
KR817186.1	Guinea	2014.241096	0.031904463	3.41E-04
MF102255.1	Guinea	2014.35	0.032036062	3.84E-04
KR817188.1	Guinea	2014.232877	0.031949295	3.92E-04
KJ660347.2	Guinea	2015.586301	0.031660765	-9.89E-04
KT013256.4	Guinea	2014.213699	0.031821654	2.80E-04
KY425648.1	Guinea	2014.213699	0.031822654	2.81E-04
KY425633.1	Guinea	2014.213699	0.031822654	2.81E-04
KP096421.1	Guinea	2014.25	0.031820654	2.50E-04
KC242786.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2007.85	0.020573842	-0.005830376
KC242789.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2007.85	0.020628312	-0.005775907
KC242789.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2007.85	0.020628312	-0.005775907
KC242785.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2007.85	0.02068277	-0.005721448
KC242790.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2007.85	0.020736283	-0.005667935
HQ613403.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2007.85	0.020523419	-0.005880799
KC242784.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2007.85	0.020682756	-0.005721462
KC242787.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2007.85	0.020523417	-0.005880801
KC242788.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2007.85	0.020951153	-0.005453065
KC242788.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2007.85	0.020951153	-0.005453065
HQ613402.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2008.99	0.02101183	-0.006312702
KC242800.1	Gabon	2002.75	0.023759111	0.001472089
KF113529.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2003.75	0.024256171	0.001161856
KF113529.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2003.75	0.024256171	0.001161856
KP 113528.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2003.75	0.024765992	0.001671677
KY425647.1	DemocraticRepublicoftheCongo	1976.85	0.001159299	-2.19E-04
KY425639.1	DemocraticRepublicoftheCongo	1976.85	0	-0.001378123
KC242791.1	DemocraticRepublicoftheCongo	1977.75	6.74E-04	-0.001430266
KC242801.1	DemocraticRepublicoftheCongo	1976.85	7.81E-04	-5.97E-04
KM655246.1	DemocraticRepublicoftheCongo	1976.85	9.44E-04	-4.34E-04
AF086833.2	DemocraticRepublicoftheCongo	1976.85	7.82E-04	-5.96E-04
KC242796.1	DemocraticRepublicoftheCongo	1995.44	0.012719904	-0.003665803

KR867676.1	Zaire	1995.44	0.012719657	-0.00366605
AY354458.1	DemocraticRepublicoftheCongo	1995.44	0.012826464	-0.003559243
JQ352763.1	DemocraticRepublicoftheCongo	1995.44	0.01285438	-0.003531327
JQ352763.1	Zaire	1995.44	0.01285438	-0.003531327
KC242792.1	Gabon	1994.95	0.015137756	-8.52E-04
KC242797.1	Gabon	1996.75	0.015408156	-0.002035105
KC242795.1	Gabon	1996.75	0.015408156	-0.002035105
KC242793.1	Gabon	1996.75	0.015407156	-0.002036105
KC242798.1	Gabon	1996.75	0.015965519	-0.001477743
KC242794.1	Gabon	1996.75	0.015965519	-0.001477743
KM519951.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2014.64	0.013441281	-0.018444459
KP271018.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2014.64	0.013874153	-0.018011587
KP271020.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2014.64	0.013764861	-0.01812088
KR819004.1	DemocraticRepublicoftheCongo	2014.64	0.013710865	-0.018174875
MH733477	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.014357107	-0.020555983
MH733478	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.014356892	-0.020556198
MH733479	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.014409428	-0.020503662
MH733480	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.014306405	-0.020606686
MH733481	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.014411402	-0.020501689
MH733482	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.014306405	-0.020606686
MH733483	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.014307405	-0.020605686
MH733484	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.014468001	-0.020445089
MH733485	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.014309405	-0.020603686
MH733486	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.014363047	-0.020550043
MH733487	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.014310405	-0.020602686
MH733488	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.44	0.014410433	-0.020543022
MH733489	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.46	0.014412461	-0.02055714
MH733490	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.014305411	-0.02060768
MH733491	DemocraticRepublicoftheCongo	2018.39	0.01425191	-0.02066118
KJ660346.2	Guinea	2014.24	0.031716217	1.53E-04
KT013259.3	Guinea	2014.205479	0.031929922	3.95E-04
KR817219.1	Guinea	2014.424658	0.032210577	4.99E-04

KR817182.1	Guinea	2014.243836	0.032153143	5.87E-04
KR817236.1	SierraLeone	2014.476712	0.031931334	1.77E-04
KR817233.1	Liberia	2014.465753	0.031984754	2.40E-04
KR817220.1	Guinea	2014.424658	0.032120306	4.08E-04
KM034561.1	SierraLeone	2014.34	0.032121306	4.78E-04
KM034561.1	SierraLeone	2014.40274	0.032121306	4.27E-04
KR817231.1	Liberia	2014.465753	0.032119306	3.74E-04
KR817227.1	SierraLeone	2014.446575	0.03214491	4.15E-04
KR817239.1	Liberia	2014.490411	0.032144963	3.80E-04
KM034559.1	SierraLeone	2014.40274	0.031916898	2.23E-04
KR817242.1	Guinea	2014.520548	0.031932295	1.43E-04
KR105215.1	SierraLeone	2014.509589	0.032040121	2.60E-04
KR817123.1	Liberia	2014.6	0.032362457	5.09E-04
KR817132.1	Guinea	2014.660274	0.032363457	4.61E-04
KR817146.1	Guinea	2014.808219	0.032577094	5.56E-04
KR817147.1	Guinea	2014.808219	0.032577442	5.56E-04
KR534575.1	Guinea	2014.786301	0.032419855	4.16E-04
KR817141.1	Guinea	2014.794521	0.032580777	5.70E-04
KR817148.1	Guinea	2014.816438	0.032527974	5.00E-04
KR817168.1	Guinea	2014.936986	0.032635116	5.10E-04
KR817163.1	Guinea	2014.915068	0.032581312	4.74E-04
KR817165.1	Guinea	2014.920548	0.032578247	4.66E-04
KR534557.1	Guinea	2014.775342	0.032473315	4.78E-04
KR817166.1	Guinea	2014.923288	0.032795571	6.81E-04
KR817169.1	Guinea	2014.942466	0.03290167	7.72E-04
KR817100.1	Guinea	2015.027397	0.032580336	3.82E-04
KR817161.1	Guinea	2014.89589	0.032527825	4.36E-04
KR534588.1	Guinea	2014.652055	0.032365457	4.70E-04
KX009899.1	Liberia	2014.679452	0.032684222	7.67E-04
KT725281.1	Liberia	2014.652055	0.032684532	7.89E-04
KR817137.1	Guinea	2014.772603	0.032523247	5.30E-04
KR817134.1	Guinea	2014.663014	0.032630269	7.26E-04

KR817138.1	Guinea	2014.772603	0.03279125	7.98E-04
KR817135.1	Guinea	2014.772603	0.032631024	6.38E-04
KR817075.1	Guinea	2014.69589	0.032579129	6.48E-04
KR534538.1	Guinea	2014.750685	0.032630958	6.56E-04
KR534530.1	Guinea	2014.720548	0.032471257	5.20E-04
KP260799.1	Mali	2014.808219	0.032470253	4.49E-04
KR534561.1	Guinea	2014.786301	0.032470787	4.67E-04
KR534539.1	Guinea	2014.750685	0.032577087	6.02E-04
KR534512.1	Guinea	2014.610959	0.032527676	6.65E-04
KR534536.1	Guinea	2014.731507	0.032581351	6.22E-04
KR534552.1	Guinea	2014.767123	0.032529676	5.41E-04
KR534563.1	Guinea	2014.79726	0.032637409	6.25E-04
KR534523.1	Guinea	2014.657534	0.032583675	6.84E-04
KR534553.1	Guinea	2014.769863	0.032527676	5.37E-04
KR534565.1	Guinea	2014.794521	0.032527676	5.17E-04
KR534518.1	Guinea	2014.635616	0.032525676	6.43E-04
KP260802.1	Mali	2014.863014	0.032737342	6.72E-04
KP260800.1	Mali	2014.863014	0.032632538	5.67E-04
KP260801.1	Mali	2014.887671	0.032684942	5.99E-04
KR534513.1	Guinea	2014.616438	0.032362457	4.96E-04
KR817149.1	Guinea	2014.819178	0.032521635	4.91E-04
KR817150.1	Guinea	2014.824658	0.032521635	4.87E-04
KR817096.1	Guinea	2015.00274	0.032627413	4.49E-04
KR817098.1	Guinea	2015.008219	0.032627413	4.44E-04
KR817093.1	Guinea	2014.978082	0.032684074	5.25E-04
KR817094.1	Guinea	2014.983562	0.032684075	5.21E-04
KR817173.1	Guinea	2014.953425	0.032630546	4.92E-04
KR817091.1	Guinea	2014.964384	0.032579024	4.31E-04
KR817097.1	Guinea	2015.00274	0.032631818	4.53E-04
KR817171.1	Guinea	2014.950685	0.032576024	4.39E-04
KR817177.1	Guinea	2014.961644	0.032575024	4.30E-04
KR817128.1	Liberia	2014.624658	0.032468246	5.95E-04

KR817127.1	Liberia	2014.624658	0.032521758	6.48E-04
KR817170.1	Guinea	2014.942466	0.032522804	3.93E-04
KT725270.1	Liberia	2014.747945	0.032632043	6.59E-04
KR817130.1	Guinea	2014.641096	0.032682136	7.96E-04
KX013094.1	Nigeria	2014.594521	0.032522727	6.74E-04
KX013093.1	Nigeria	2014.594521	0.032419486	5.70E-04
KX013098.1	Nigeria	2014.594521	0.032420486	5.71E-04
KX013092.1	Nigeria	2014.589041	0.032635252	7.91E-04
KX013097.1	Nigeria	2014.591781	0.032418486	5.72E-04
KX013099.1	Nigeria	2014.589041	0.032417486	5.73E-04
KT587346.1	Liberia	2014.676712	0.03236505	4.50E-04
KT725279.1	Liberia	2014.868493	0.032633637	5.63E-04
KT725259.1	Liberia	2014.619178	0.032311579	4.43E-04
KX009912.1	Liberia	2014.89863	0.032477565	3.83E-04
KT725287.1	Liberia	2014.783562	0.032476705	4.75E-04
KT725385.1	Liberia	2014.687671	0.032260673	3.36E-04
KT725263.1	Liberia	2014.687671	0.032366532	4.42E-04
KY744597.1	Liberia	2015.884932	0.032416474	-4.74E-04
KY744596.1	Liberia	2015.890411	0.03241643	-4.79E-04
KR817121.1	Guinea	2014.589041	0.032307059	4.62E-04
KR817245.1	Liberia	2014.526027	0.032255013	4.61E-04
KR817145.1	Guinea	2014.805479	0.032521963	5.03E-04
KR817089.1	Guinea	2014.758904	0.032630521	6.49E-04
KR817087.1	Guinea	2014.747945	0.032791172	8.18E-04
KY007522.1	Liberia	2016.248634	0.033115909	-6.85E-05
KR817153.1	Guinea	2014.838356	0.032634326	5.88E-04
KR817143.1	Guinea	2014.794521	0.032471483	4.61E-04
KR817159.1	Guinea	2014.865753	0.032473875	4.06E-04
KR817082.1	Guinea	2014.742466	0.032896801	9.28E-04
KR817088.1	Guinea	2014.758904	0.03257609	5.94E-04
KR817084.1	Guinea	2014.745205	0.032949298	9.79E-04
KR817067.1	Guinea	2014.665753	0.032415881	5.09E-04

KR817072.1	Guinea	2014.682192	0.032362766	4.43E-04
KR817126.1	Guinea	2014.621918	0.032310308	4.39E-04
KR817070.1	Guinea	2014.673973	0.032468965	5.56E-04
KR817069.1	Guinea	2014.665753	0.032469901	5.63E-04
KR817077.1	Guinea	2014.69863	0.032309072	3.76E-04
KR817078.1	Guinea	2014.69863	0.032256672	3.24E-04
KR817167.1	Guinea	2014.936986	0.03257553	4.50E-04
KR817164.1	Guinea	2014.923288	0.032523025	4.09E-04
KR817152.1	Guinea	2014.832877	0.032521901	4.80E-04
KR817151.1	Guinea	2014.832877	0.032628527	5.87E-04
KR653263.1	SierraLeone	2014.676712	0.032632563	7.17E-04
KR105256.1	SierraLeone	2014.550685	0.032416113	6.02E-04
KM233054.1	SierraLeone	2014.430137	0.032149884	4.34E-04
KT725379.1	Liberia	2014.717808	0.032417526	4.69E-04
KR817106.1	Guinea	2015.082192	0.03268401	4.41E-04
KT725363.1	Liberia	2014.624658	0.032312078	4.39E-04
KT725383.1	Liberia	2014.624658	0.032365989	4.93E-04
KT725335.1	Liberia	2014.627397	0.032365989	4.90E-04
KU220281.1	Liberia	2014.646575	0.032259782	3.69E-04
KU220276.1	Liberia	2015.526027	0.032314338	-2.87E-04
KU220271.1	Liberia	2015.49589	0.032315338	-2.61E-04
KU220272.1	Liberia	2015.49863	0.032367928	-2.11E-04
KU220278.1	Liberia	2014.643836	0.032260782	3.72E-04
KT725391.1	Liberia	2014.775342	0.032208272	2.13E-04
KT725369.1	Liberia	2014.649315	0.032209272	3.16E-04
KX009892.1	Liberia	2014.652055	0.032370679	4.75E-04
KX009897.1	Liberia	2014.673973	0.032314087	4.01E-04
KP240933.1	Liberia	2014.761644	0.032578176	5.94E-04
KX009905.1	Liberia	2014.772603	0.032313751	3.21E-04
KT725276.1	Liberia	2014.726027	0.032421887	4.67E-04
KU220282.1	Liberia	2014.646575	0.032313092	4.22E-04
KT725337.1	Liberia	2014.632877	0.032314092	4.34E-04

KT725368.1	Liberia	2014.747945	0.033068957	0.001096073
KT725257.1	Liberia	2014.621918	0.032294616	4.23E-04
KT725348.1	Liberia	2014.621918	0.0323477	4.77E-04
KY558987.1	Liberia	2014.665753	0.032293141	3.87E-04
KT725255.1	Liberia	2014.684932	0.03251165	5.90E-04
KT725333.1	Liberia	2014.876712	0.032783656	7.07E-04
KT725326.1	Liberia	2014.649315	0.032459975	5.67E-04
KT725268.1	Liberia	2014.750685	0.032512886	5.38E-04
KT725393.1	Liberia	2014.865753	0.032512734	4.45E-04
KM034557.1	SierraLeone	2014.4	0.032190246	4.98E-04
KM233062.1	SierraLeone	2014.441096	0.032191246	4.66E-04
KT725311.1	Liberia	2014.605479	0.03229983	4.42E-04
KT725325.1	Liberia	2014.717808	0.032407102	4.59E-04
KT725308.1	Liberia	2014.717808	0.032462071	5.14E-04
KT725362.1	Liberia	2014.717808	0.032408011	4.59E-04
KT725260.1	Liberia	2014.682192	0.032514305	5.95E-04
KY558985.1	Liberia	2014.665753	0.032566637	6.60E-04
KX009907.1	Liberia	2014.882192	0.032514172	4.33E-04
KT725283.1	Liberia	2014.649315	0.032394324	5.01E-04
KT725330.1	Liberia	2014.857534	0.03266182	6.00E-04
KY558984.1	Liberia	2014.915068	0.032767789	6.60E-04
KT725288.1	Liberia	2014.972603	0.032877129	7.23E-04
KX009911.1	Liberia	2014.89863	0.032823102	7.29E-04
KX009904.1	Liberia	2014.772603	0.032608242	6.15E-04
KT725296.1	Liberia	2014.69863	0.032502745	5.70E-04
KT725352.1	Liberia	2014.69863	0.032465586	5.33E-04
KY558988.1	Liberia	2014.580822	0.03241263	5.75E-04
KY558986.1	Liberia	2014.832877	0.032767134	7.26E-04
KT725388.1	Liberia	2014.50411	0.032448897	6.73E-04
KT725285.1	Liberia	2014.789041	0.032612798	6.07E-04
KT725324.1	Liberia	2014.545205	0.032503984	6.95E-04
KT725331.1	Liberia	2014.638356	0.032556917	6.73E-04

KX009900.1	Liberia	2014.682192	0.032662741	7.43E-04
KX009910.1	Liberia	2014.89863	0.032878689	7.84E-04
KT725323.1	Liberia	2014.742466	0.032825748	8.57E-04
KT725303.1	Liberia	2014.846575	0.032608847	5.56E-04
KU220284.1	Liberia	2015.041096	0.032661127	4.52E-04
KT725341.1	Liberia	2014.649315	0.032337846	4.45E-04
KT725342.1	Liberia	2014.90137	0.032876	7.79E-04
KT725254.1	Liberia	2014.857534	0.032607711	5.46E-04
KR006947.1	Liberia	2014.852055	0.032660656	6.04E-04
KM233084.1	SierraLeone	2014.452055	0.032199269	4.65E-04
KM233055.1	SierraLeone	2014.430137	0.032200269	4.84E-04
KR105200.1	SierraLeone	2014.454795	0.032201269	4.65E-04
KM233072.1	SierraLeone	2014.449315	0.032202269	4.70E-04
KR817111.1	Liberia	2014.553425	0.032576591	7.61E-04
KR817081.1	Guinea	2014.742466	0.032863783	8.95E-04
KR817115.1	Liberia	2014.561644	0.032845035	0.001022551
KR817085.1	Guinea	2014.747945	0.032874342	9.01E-04
KR817108.1	Liberia	2014.553425	0.032577675	7.62E-04
KR817109.1	Liberia	2014.553425	0.032472455	6.57E-04
KR817112.1	Liberia	2014.553425	0.032471744	6.56E-04
KR817110.1	Liberia	2014.553425	0.032365442	5.50E-04
KR817125.1	Liberia	2014.616438	0.032470317	6.04E-04
KR817116.1	Guinea	2014.580822	0.032526632	6.89E-04
KR817117.1	Guinea	2014.580822	0.032528632	6.91E-04
KR817071.1	Guinea	2014.673973	0.032686476	7.73E-04
KR817119.1	Guinea	2014.580822	0.032527632	6.90E-04
KR817118.1	Guinea	2014.580822	0.032525632	6.88E-04
KT725297.1	Liberia	2014.649315	0.032525157	6.32E-04
KR817232.1	Liberia	2014.465753	0.032364444	6.19E-04
KR817234.1	Liberia	2014.465753	0.032365936	6.21E-04
KM233080.1	SierraLeone	2014.452055	0.032306064	5.72E-04
KR817241.1	Liberia	2014.50411	0.033650121	0.001874084

KM034558.1	SierraLeone	2014.40274	0.032363728	6.70E-04
KM034551.1	SierraLeone	2014.39726	0.032364728	6.75E-04
KM034551.1	SierraLeone	2016.095628	0.032364728	-6.96E-04
KM233074.1	SierraLeone	2014.449315	0.032400915	6.69E-04
KM233103.1	SierraLeone	2014.454795	0.032400915	6.65E-04
KR817238.1	SierraLeone	2014.482192	0.032470052	7.12E-04
KT725356.1	Liberia	2014.652055	0.032420783	5.25E-04
KU156714.1	SierraLeone	2014.460274	0.032313882	5.73E-04
KR817228.1	SierraLeone	2014.449315	0.032417853	6.86E-04
KR817068.1	Guinea	2014.665753	0.032578151	6.72E-04
KM233107.1	SierraLeone	2014.457534	0.032255604	5.17E-04
KM233097.1	SierraLeone	2014.452055	0.032255706	5.22E-04
KM034553.1	SierraLeone	2014.4	0.032305405	6.13E-04
KM034553.1	SierraLeone	2016.174863	0.032305405	-8.19E-04
KM233066.1	SierraLeone	2014.446575	0.032304539	5.75E-04
KM233067.1	SierraLeone	2014.452055	0.032304539	5.71E-04
KM233087.1	SierraLeone	2014.452055	0.032303441	5.69E-04
KM233088.1	SierraLeone	2014.457534	0.032303441	5.65E-04
KM233105.1	SierraLeone	2014.457534	0.032194246	4.56E-04
KM233078.1	SierraLeone	2014.452055	0.032192246	4.58E-04
KU156715.1	SierraLeone	2014.460274	0.032188209	4.48E-04
KY401659.1	Liberia	2014.632877	0.032292992	4.13E-04
KP178538.1	Liberia	2014.586301	0.032292992	4.51E-04
KT725349.1	Liberia	2014.649315	0.032400387	5.07E-04
KY401672.1	Guinea	2014.819178	0.032346717	3.16E-04
KY401675.1	Guinea	2014.810959	0.032347717	3.24E-04
KY401674.1	Guinea	2014.808219	0.032348717	3.27E-04
KY401673.1	Guinea	2014.939726	0.032454907	3.27E-04
KM233044.1	SierraLeone	2014.421918	0.032237787	5.28E-04
KR817129.1	Liberia	2014.638356	0.032416891	5.32E-04
KT725347.1	Liberia	2014.649315	0.03225769	3.64E-04
KR817158.1	Guinea	2014.865753	0.032579055	5.11E-04

KR817172.1	Guinea	2014.950685	0.032685841	5.49E-04
KR817174.1	Guinea	2014.950685	0.032685951	5.49E-04
KR817155.1	Guinea	2014.852055	0.032580055	5.23E-04
KR817157.1	Guinea	2014.865753	0.032630533	5.63E-04
KR817104.1	Guinea	2015.065753	0.032472333	2.43E-04
KR817103.1	Guinea	2015.057534	0.032472333	2.50E-04
KR817102.1	Guinea	2015.038356	0.032419841	2.13E-04
KR817105.1	Guinea	2015.071233	0.032419841	1.86E-04
KR817092.1	Guinea	2014.972603	0.03236563	2.11E-04
KR817162.1	Guinea	2014.915068	0.032365452	2.58E-04
KM233053.1	SierraLeone	2014.424658	0.032148913	4.37E-04
KM233056.1	SierraLeone	2014.430137	0.032096507	3.80E-04
KM233092.1	SierraLeone	2014.452055	0.032205485	4.71E-04
KR105248.1	SierraLeone	2014.542466	0.032258896	4.52E-04
KR105325.1	SierraLeone	2014.706849	0.032366144	4.26E-04
KR653280.1	SierraLeone	2014.706849	0.032314496	3.75E-04
KR653250.1	SierraLeone	2014.720548	0.032314496	3.64E-04
KR105321.1	SierraLeone	2014.706849	0.032318496	3.79E-04
KR105324.1	SierraLeone	2014.712329	0.032372148	4.28E-04
KR105328.1	SierraLeone	2014.720548	0.032319496	3.69E-04
KR653255.1	SierraLeone	2014.79726	0.032531114	5.18E-04
KR105311.1	SierraLeone	2014.684932	0.032316496	3.94E-04
KR534540.1	Guinea	2014.750685	0.032368076	3.93E-04
KM233086.1	SierraLeone	2014.452055	0.032152956	4.19E-04
KM233095.1	SierraLeone	2014.452055	0.032152956	4.19E-04
KM233096.1	SierraLeone	2014.452055	0.032152956	4.19E-04
KM233096.1	SierraLeone	2015.175342	0.032152956	-1.65E-04
KR534514.1	Guinea	2014.619178	0.032204382	3.35E-04
KR105244.1	SierraLeone	2014.536986	0.032205382	4.03E-04
KR653303.1	SierraLeone	2014.734247	0.03263416	6.72E-04
KR105315.1	SierraLeone	2014.693151	0.032528894	6.00E-04
KR653286.1	SierraLeone	2014.690411	0.032528894	6.02E-04

KR653296.1	SierraLeone	2014.657534	0.032475313	5.75E-04
KR105293.1	SierraLeone	2014.621918	0.032259026	3.88E-04
KM233063.1	SierraLeone	2014.443836	0.032097507	3.70E-04
KR105218.1	SierraLeone	2014.515068	0.032207468	4.23E-04
KR105249.1	SierraLeone	2014.545205	0.032263239	4.54E-04
KR653265.1	SierraLeone	2014.652055	0.032424279	5.29E-04
KR105342.1	SierraLeone	2014.731507	0.032316508	3.57E-04
KR105343.1	SierraLeone	2014.731507	0.032370023	4.10E-04
KR653233.1	SierraLeone	2014.756164	0.03237004	3.91E-04
KR653241.1	SierraLeone	2014.643836	0.032264003	3.75E-04
KR105330.1	SierraLeone	2014.723288	0.032477624	5.25E-04
KR105207.1	SierraLeone	2014.468493	0.032102507	3.55E-04
KR105225.1	SierraLeone	2014.523288	0.032103507	3.12E-04
KR105241.1	SierraLeone	2014.517808	0.032209547	4.22E-04
KM233106.1	SierraLeone	2014.457534	0.032100507	3.62E-04
KR105221.1	SierraLeone	2014.520548	0.032100507	3.11E-04
KR105222.1	SierraLeone	2014.523288	0.032102507	3.11E-04
KR105229.1	SierraLeone	2014.526027	0.032105507	3.12E-04
KR105224.1	SierraLeone	2014.523288	0.032159098	3.68E-04
KM233047.1	SierraLeone	2014.432877	0.032106507	3.88E-04
KR105271.1	SierraLeone	2014.591781	0.032157085	3.10E-04
KM233116.1	SierraLeone	2014.421918	0.032103507	3.94E-04
KM233035.1	SierraLeone	2014.416438	0.032157131	4.52E-04
KR653304.1	SierraLeone	2014.832877	0.032211759	1.70E-04
KR653274.1	SierraLeone	2014.775342	0.032211758	2.17E-04
KM233038.1	SierraLeone	2014.419178	0.032103507	3.96E-04
KM233108.1	SierraLeone	2014.460274	0.032102507	3.62E-04
KM233057.1	SierraLeone	2014.435616	0.032098507	3.78E-04
KR653291.1	SierraLeone	2014.723288	0.032529686	5.77E-04
KR105298.1	SierraLeone	2014.630137	0.032425687	5.48E-04
KR105300.1	SierraLeone	2014.643836	0.032641022	7.52E-04
KR653230.1	SierraLeone	2014.753425	0.033069983	0.001092676

KR653257.1	SierraLeone	2014.843836	0.032480303	4.30E-04
KR105331.1	SierraLeone	2014.723288	0.032480308	5.27E-04
KU052669.1	UnitedKingdom	2015.767123	0.032638981	-1.57E-04
KU052670.1	UnitedKingdom	2015.767123	0.032638981	-1.57E-04
KP658432.1	UnitedKingdom	2014.991781	0.032531774	3.62E-04
KP759768.1	SierraLeone	2014.824658	0.033017228	9.82E-04
KP759728.1	SierraLeone	2014.769863	0.032694279	7.04E-04
KU296820.1	SierraLeone	2014.994521	0.032748259	5.76E-04
KU296772.1	SierraLeone	2015.035616	0.033017529	8.12E-04
KU296563.1	SierraLeone	2015.024658	0.033178938	9.83E-04
KU296710.1	SierraLeone	2015.013699	0.032965449	7.78E-04
KU296359.1	SierraLeone	2015.027397	0.032965449	7.67E-04
KP759714.1	SierraLeone	2014.758904	0.032534032	5.52E-04
KU296407.1	SierraLeone	2015.049315	0.032855017	6.39E-04
KP759759.1	SierraLeone	2014.813699	0.032639578	6.14E-04
KU296467.1	SierraLeone	2015.112329	0.032909514	6.42E-04
KP759733.1	SierraLeone	2014.769863	0.032479356	4.89E-04
KT357818.1	SierraLeone	2015.169863	0.032747604	4.34E-04
KU296762.1	SierraLeone	2014.917808	0.032747462	6.37E-04
KU296616.1	SierraLeone	2015.145205	0.032747596	4.54E-04
KU296369.1	SierraLeone	2015.145205	0.032748593	4.55E-04
KU296601.1	SierraLeone	2015.142466	0.032748667	4.57E-04
KU296377.1	SierraLeone	2015.057534	0.032533327	3.11E-04
KP759681.1	SierraLeone	2014.830137	0.032478469	4.39E-04
KP759767.1	SierraLeone	2014.821918	0.032640894	6.08E-04
KP759670.1	SierraLeone	2014.750685	0.032640885	6.66E-04
KP759655.1	SierraLeone	2014.816438	0.032588775	5.61E-04
KR653279.1	SierraLeone	2014.668493	0.032531818	6.23E-04
KP759665.1	SierraLeone	2014.830137	0.032477467	4.38E-04
KP759750.1	SierraLeone	2014.789041	0.032476889	4.71E-04
KP759659.1	SierraLeone	2014.821918	0.032476884	4.44E-04
KR534582.1	Guinea	2014.736986	0.032263647	3.00E-04

KP759729.1	SierraLeone	2014.769863	0.032319706	3.29E-04
KP759713.1	SierraLeone	2014.758904	0.032266912	2.85E-04
KP759673.1	SierraLeone	2014.835616	0.032429328	3.86E-04
KR105323.1	SierraLeone	2014.709589	0.032322472	3.81E-04
KR653236.1	SierraLeone	2014.843836	0.032537692	4.87E-04
KU296682.1	SierraLeone	2015.210959	0.032548414	2.02E-04
KU296632.1	SierraLeone	2015.120548	0.032602287	3.29E-04
KY366420.1	SierraLeone	2015.24	0.032495542	1.25E-04
KU296475.1	SierraLeone	2015.20274	0.032497542	1.58E-04
KU296493.1	SierraLeone	2015.186301	0.032497542	1.71E-04
KU296623.1	SierraLeone	2015.191781	0.032496542	1.65E-04
KU296714.1	SierraLeone	2015.046575	0.032494542	2.81E-04
KU296351.1	SierraLeone	2015.161644	0.032547403	2.41E-04
KU296567.1	SierraLeone	2015.161644	0.032494542	1.88E-04
KU296661.1	SierraLeone	2015.112329	0.032494542	2.27E-04
KU296587.1	SierraLeone	2015.084932	0.032547342	3.02E-04
KU296514.1	SierraLeone	2015.210959	0.032655034	3.08E-04
KU296643.1	SierraLeone	2015.156164	0.032651881	3.49E-04
KP759600.1	SierraLeone	2014.835616	0.032451308	4.08E-04
KU296472.1	SierraLeone	2015.063014	0.032511594	2.84E-04
KU296303.1	SierraLeone	2015.024658	0.032565469	3.69E-04
KU296733.1	SierraLeone	2015.00274	0.032620366	4.42E-04
KU296516.1	SierraLeone	2015.005479	0.032625292	4.45E-04
KU296653.1	SierraLeone	2015.224658	0.032734127	3.76E-04
KU296760.1	SierraLeone	2015.150685	0.032735127	4.37E-04
KU296388.1	SierraLeone	2015.115068	0.032736127	4.67E-04
KU296586.1	SierraLeone	2015.147945	0.032737127	4.41E-04
KU296765.1	SierraLeone	2015.112329	0.032739127	4.72E-04
KU296788.1	SierraLeone	2015.142466	0.032740127	4.49E-04
KU296391.1	SierraLeone	2015.112329	0.032793905	5.27E-04
KU296485.1	SierraLeone	2015.153425	0.03279492	4.95E-04
KU296473.1	SierraLeone	2015.109589	0.032856073	5.91E-04

KU296780.1	SierraLeone	2015.131507	0.032857073	5.75E-04
KU296557.1	SierraLeone	2015.136986	0.033073383	7.86E-04
KT357815.1	SierraLeone	2015.153425	0.033020505	7.20E-04
KU296803.1	SierraLeone	2015.230137	0.032912871	5.51E-04
KU296755.1	SierraLeone	2015.117808	0.032914877	6.43E-04
KU296759.1	SierraLeone	2015.150685	0.032915875	6.18E-04
KU296520.1	SierraLeone	2015.260274	0.032916949	5.30E-04
KT357813.1	SierraLeone	2015.134247	0.032972802	6.88E-04
KU296295.1	SierraLeone	2015.112329	0.032868073	6.01E-04
KU296310.1	SierraLeone	2015.142466	0.032975697	6.84E-04
KU296562.1	SierraLeone	2015.150685	0.032922878	6.25E-04
KU296538.1	SierraLeone	2015.164384	0.032923882	6.15E-04
KU296517.1	SierraLeone	2015.139726	0.032872073	5.83E-04
KU296441.1	SierraLeone	2015.10411	0.03292594	6.66E-04
KU296842.1	SierraLeone	2015.147945	0.033544547	0.001248746
KT357817.1	SierraLeone	2015.156164	0.032973798	6.71E-04
KU296635.1	SierraLeone	2015.109589	0.032865073	6.00E-04
KU296768.1	SierraLeone	2015.254795	0.032861073	4.79E-04
KT357816.1	SierraLeone	2015.153425	0.032964683	6.64E-04
KU296652.1	SierraLeone	2015.150685	0.032738127	4.40E-04
KU296832.1	SierraLeone	2015.150685	0.033001881	7.04E-04
KU296719.1	SierraLeone	2015.147945	0.033001881	7.06E-04
KU296640.1	SierraLeone	2015.147945	0.032841284	5.45E-04
KU296360.1	SierraLeone	2015.156164	0.03289628	5.94E-04
KU296542.1	SierraLeone	2015.150685	0.032790516	4.93E-04
KU296692.1	SierraLeone	2015.221918	0.032794516	4.39E-04
KU296383.1	SierraLeone	2015.139726	0.032795516	5.06E-04
KU296604.1	SierraLeone	2015.158904	0.032903252	5.99E-04
KU296771.1	SierraLeone	2015.189041	0.032904234	5.75E-04
KR025228.1	UnitedKingdom	2015.191781	0.033008505	6.77E-04
KU296680.1	SierraLeone	2015.156164	0.032868138	5.66E-04
KU296548.1	SierraLeone	2015.213699	0.032793516	4.45E-04

KU296578.1	SierraLeone	2015.150685	0.032792516	4.95E-04
KU296449.1	SierraLeone	2015.216438	0.032791516	4.40E-04
KU296686.1	SierraLeone	2015.150685	0.032844301	5.46E-04
KU296695.1	SierraLeone	2015.172603	0.032844301	5.29E-04
KU296402.1	SierraLeone	2015.180822	0.032843302	5.21E-04
KU296713.1	SierraLeone	2015.178082	0.032844311	5.24E-04
KU296565.1	SierraLeone	2015.230137	0.032898247	5.36E-04
KU296483.1	SierraLeone	2015.230137	0.03284635	4.84E-04
KU296393.1	SierraLeone	2015.191781	0.03284635	5.15E-04
KU296531.1	SierraLeone	2015.142466	0.032899126	6.08E-04
KU296751.1	SierraLeone	2015.10411	0.03284532	5.85E-04
KU296818.1	SierraLeone	2015.153425	0.032792516	4.92E-04
KU296525.1	SierraLeone	2015.142466	0.032792516	5.01E-04
KU296576.1	SierraLeone	2015.106849	0.032788516	5.26E-04
KU296754.1	SierraLeone	2015.186301	0.032895113	5.68E-04
KT357821.1	SierraLeone	2015.183562	0.033001804	6.77E-04
KY401640.1	SierraLeone	2015.424658	0.03289648	3.77E-04
KY401642.1	SierraLeone	2015.479452	0.03289648	3.33E-04
KY401639.1	SierraLeone	2015.386301	0.033002645	5.14E-04
KY401645.1	SierraLeone	2015.671233	0.032842963	1.25E-04
KU296574.1	SierraLeone	2015.213699	0.032898638	5.50E-04
MF599516.1	SierraLeone	2015.39726	0.032899638	4.03E-04
MF599517.1	SierraLeone	2015.408219	0.032899638	3.94E-04
MF599522.1	SierraLeone	2015.241096	0.033057465	6.86E-04
MF599506.1	SierraLeone	2015.205479	0.0329519	6.10E-04
MF599507.1	SierraLeone	2015.227397	0.0329519	5.92E-04
KT357822.1	SierraLeone	2015.186301	0.032845963	5.19E-04
KT357814.1	SierraLeone	2015.139726	0.032899754	6.11E-04
KU296800.1	SierraLeone	2015.205479	0.032846963	5.05E-04
KU296338.1	SierraLeone	2015.136986	0.032845963	5.59E-04
KU296511.1	SierraLeone	2015.145205	0.032846963	5.53E-04
KU296425.1	SierraLeone	2015.169863	0.033008616	6.95E-04

KU296494.1	SierraLeone	2015.147945	0.032900843	6.05E-04
KY401641.1	SierraLeone	2015.443836	0.032840963	3.06E-04
KU296638.1	SierraLeone	2015.219178	0.032894531	5.41E-04
KU296535.1	SierraLeone	2015.221918	0.032841731	4.86E-04
KU296451.1	SierraLeone	2015.186301	0.032788928	4.62E-04
KU296841.1	SierraLeone	2015.191781	0.032788928	4.58E-04
KU296627.1	SierraLeone	2015.210959	0.032893616	5.47E-04
KU296396.1	SierraLeone	2015.221918	0.032893619	5.38E-04
KU296329.1	SierraLeone	2015.019178	0.032626682	4.35E-04
KU296742.1	SierraLeone	2015.027397	0.032628694	4.30E-04
KU296670.1	SierraLeone	2015.063014	0.032576878	3.50E-04
KU296400.1	SierraLeone	2015.024658	0.032577878	3.82E-04
KU296416.1	SierraLeone	2015.10137	0.032791105	5.33E-04
KU296367.1	SierraLeone	2015.019178	0.032574878	3.83E-04
KU296756.1	SierraLeone	2015.027397	0.032573878	3.75E-04
KU296730.1	SierraLeone	2015.041096	0.032574878	3.65E-04
KU296611.1	SierraLeone	2015.063014	0.032627679	4.00E-04
KU296468.1	SierraLeone	2015.252055	0.032510594	1.31E-04
KU296799.1	SierraLeone	2015.09863	0.032562405	3.06E-04
KP759761.1	SierraLeone	2014.819178	0.03233006	3.00E-04
KU296344.1	SierraLeone	2015.038356	0.032598279	3.91E-04
KU296739.1	SierraLeone	2015.038356	0.032598228	3.91E-04
KP759720.1	SierraLeone	2014.767123	0.032493567	5.05E-04
KU296408.1	SierraLeone	2015.063014	0.032494689	2.67E-04
KU296317.1	SierraLeone	2015.068493	0.032441862	2.10E-04
KU296631.1	SierraLeone	2015.10411	0.03249468	2.34E-04
KT357820.1	SierraLeone	2015.178082	0.032872069	5.52E-04
KU296602.1	SierraLeone	2015.038356	0.032447061	2.40E-04
KP759706.1	SierraLeone	2014.854795	0.033029363	9.70E-04
KU296664.1	SierraLeone	2015.027397	0.033350387	0.001151903
KU296641.1	SierraLeone	2015.169863	0.03329899	9.85E-04
KU296647.1	SierraLeone	2015.131507	0.03329899	0.00101646

MF599505.1	SierraLeone	2015.331507	0.033512249	0.00106826
MF599514.1	SierraLeone	2015.380822	0.033568908	0.001085108
MF599519.1	SierraLeone	2015.216438	0.033568908	0.001217813
KU296319.1	SierraLeone	2015.536986	0.033998336	0.001388465
KU296446.1	SierraLeone	2015.479452	0.033891708	0.001328284
KU296544.1	SierraLeone	2015.454795	0.033892771	0.001349253
KT357859.1	SierraLeone	2015.523288	0.03389476	0.001295948
KU296650.1	SierraLeone	2015.526027	0.034002514	0.00140149
KU296370.1	SierraLeone	2015.520548	0.033894778	0.001298177
KU296430.1	SierraLeone	2015.476712	0.033894779	0.001333567
KU296313.1	SierraLeone	2015.580822	0.03388971	0.001244451
MF599504.1	SierraLeone	2015.336986	0.033566984	0.001118571
KU296561.1	SierraLeone	2015.336986	0.033621862	0.00117345
KU296729.1	SierraLeone	2015.284932	0.033516249	0.00110986
KU296723.1	SierraLeone	2015.284932	0.033516249	0.00110986
KU296790.1	SierraLeone	2015.336986	0.033568105	0.001119693
KU296560.1	SierraLeone	2015.293151	0.033568103	0.001155078
KP759745.1	SierraLeone	2014.791781	0.032331165	3.23E-04
KP759743.1	SierraLeone	2014.791781	0.032277376	2.69E-04
KY401653.1	SierraLeone	2015.534247	0.032747662	1.40E-04
KY401651.1	SierraLeone	2015.457534	0.032749662	2.04E-04
KY401650.1	SierraLeone	2015.419178	0.032749662	2.35E-04
KY401652.1	SierraLeone	2015.49863	0.032748662	1.70E-04
KP759746.1	SierraLeone	2014.794521	0.032479832	4.69E-04
KU296807.1	SierraLeone	2015.019178	0.032640194	4.48E-04
KU296696.1	SierraLeone	2015.024658	0.032641242	4.45E-04
KU296458.1	SierraLeone	2015.019178	0.032641242	4.49E-04
KU296767.1	SierraLeone	2015.021918	0.032642157	4.48E-04

KU296512.1	SierraLeone	2015.019178	0.032642157	4.50E-04
KU296432.1	SierraLeone	2015.00274	0.032589345	4.11E-04
KU296364.1	SierraLeone	2015.019178	0.032697065	5.05E-04
KU296309.1	SierraLeone	2015.019178	0.032643148	4.51E-04
KU296558.1	SierraLeone	2015.019178	0.032643094	4.51E-04
KU296358.1	SierraLeone	2015.027397	0.032644094	4.46E-04
KU296381.1	SierraLeone	2015.021918	0.032644094	4.50E-04
KU296697.1	SierraLeone	2015.139726	0.032748758	4.60E-04
KU296582.1	SierraLeone	2015.030137	0.032695893	4.95E-04
KU296781.1	SierraLeone	2015.057534	0.03274865	5.26E-04
KU296669.1	SierraLeone	2015.087671	0.032803486	5.56E-04
KU296811.1	SierraLeone	2015.065753	0.032803479	5.74E-04
KU296639.1	SierraLeone	2015.306849	0.032856133	4.32E-04
KU296345.1	SierraLeone	2015.317808	0.032962647	5.30E-04
KU296637.1	SierraLeone	2015.057534	0.032854478	6.32E-04
KU296728.1	SierraLeone	2015.115068	0.032960545	6.91E-04
KY401656.1	SierraLeone	2015.493151	0.033228123	6.54E-04
KU296457.1	SierraLeone	2015.10137	0.0328015	5.43E-04
KU296608.1	SierraLeone	2015.090411	0.033068831	8.19E-04
KU296597.1	SierraLeone	2015.09589	0.0328005	5.47E-04
KU296492.1	SierraLeone	2015.117808	0.032908273	6.37E-04
KU296549.1	SierraLeone	2015.093151	0.032855467	6.04E-04
KU296495.1	SierraLeone	2015.060274	0.032855475	6.30E-04
KU296817.1	SierraLeone	2015.090411	0.032802671	5.53E-04
KU296646.1	SierraLeone	2015.084932	0.032749869	5.05E-04
KU296593.1	SierraLeone	2015.060274	0.032803675	5.79E-04
KU296747.1	SierraLeone	2015.087671	0.032751869	5.05E-04
KU296491.1	SierraLeone	2015.076712	0.032859615	6.21E-04
KU296622.1	SierraLeone	2015.082192	0.032856004	6.13E-04
KU296773.1	SierraLeone	2015.076712	0.032801732	5.63E-04
KT357855.1	SierraLeone	2015.145205	0.032800725	5.07E-04
KU296619.1	SierraLeone	2015.09589	0.032800725	5.47E-04

KP759749.1	SierraLeone	2014.794521	0.032478698	4.68E-04
KP759760.1	SierraLeone	2014.810959	0.032585279	5.62E-04
KU296736.1	SierraLeone	2015.142466	0.032905363	6.14E-04
KP759740.1	SierraLeone	2014.742466	0.032421223	4.53E-04
KP759717.1	SierraLeone	2014.764384	0.032420329	4.34E-04
KR653285.1	SierraLeone	2014.810959	0.032527103	5.03E-04
KP728283.1	Switzerland	2014.887671	0.032420957	3.35E-04
KU296612.1	SierraLeone	2015.221918	0.032529529	1.74E-04
KU296677.1	SierraLeone	2015.172603	0.032530573	2.15E-04
KU296478.1	SierraLeone	2015.158904	0.032748138	4.43E-04
KU296305.1	SierraLeone	2015.158904	0.032479731	1.75E-04
KU296552.1	SierraLeone	2015.153425	0.032479731	1.80E-04
KU296624.1	SierraLeone	2015.172603	0.032479731	1.64E-04
KU296505.1	SierraLeone	2015.054795	0.032691001	4.70E-04
KU296382.1	SierraLeone	2015.052055	0.032639207	4.21E-04
KU296672.1	SierraLeone	2015.035616	0.032639207	4.34E-04
KP759702.1	SierraLeone	2014.852055	0.032474735	4.18E-04
KP759603.1	SierraLeone	2014.827397	0.032420192	3.83E-04
KR105285.1	SierraLeone	2014.616438	0.032261713	3.95E-04
KR653232.1	SierraLeone	2014.726027	0.032367881	4.13E-04
KU296464.1	SierraLeone	2015.043836	0.032530604	3.19E-04
KU296813.1	SierraLeone	2015.054795	0.032638351	4.18E-04
KU296386.1	SierraLeone	2015.035616	0.032746141	5.41E-04
KP759688.1	SierraLeone	2014.742466	0.032261713	2.93E-04
KU296572.1	SierraLeone	2015.024658	0.032584711	3.88E-04
KR653246.1	SierraLeone	2014.671233	0.032315704	4.05E-04
KU296812.1	SierraLeone	2014.917808	0.032421632	3.12E-04
KU296774.1	SierraLeone	2014.917808	0.03296135	8.51E-04
KP759690.1	SierraLeone	2014.838356	0.032421491	3.76E-04
KP759738.1	SierraLeone	2014.778082	0.032368705	3.71E-04
KR534534.1	Guinea	2014.728767	0.032424984	4.68E-04
KR534522.1	Guinea	2014.654795	0.032217338	3.20E-04

KR534521.1	Guinea	2014.654795	0.032218317	3.21E-04
KM233098.1	SierraLeone	2014.454795	0.032166889	4.31E-04
KR105205.1	SierraLeone	2014.463014	0.032168889	4.26E-04
KM233112.1	SierraLeone	2014.460274	0.032170889	4.30E-04
KR105226.1	SierraLeone	2014.523288	0.032332701	5.41E-04
KR105251.1	SierraLeone	2014.545205	0.032226442	4.17E-04
KR534584.1	Guinea	2014.750685	0.032227448	2.52E-04
KR534525.1	Guinea	2014.70137	0.032227448	2.92E-04
KR105240.1	SierraLeone	2014.534247	0.032174889	3.75E-04
KR534507.1	Guinea	2014.558904	0.032176889	3.57E-04
KR534519.1	Guinea	2014.638356	0.032230525	3.46E-04
KR105213.1	SierraLeone	2014.506849	0.032287943	5.10E-04
KR105269.1	SierraLeone	2014.591781	0.032342522	4.96E-04
KR105266.1	SierraLeone	2014.589041	0.032342522	4.98E-04
KR105268.1	SierraLeone	2014.591781	0.032449444	6.03E-04
KR653235.1	SierraLeone	2014.673973	0.032341534	4.28E-04
KR817244.1	SierraLeone	2014.526027	0.032443596	6.50E-04
KM233102.1	SierraLeone	2014.454795	0.032249201	5.13E-04
KM233102.1	SierraLeone	2015.260274	0.032249201	-1.37E-04
KR105303.1	SierraLeone	2014.646575	0.032241149	3.50E-04
KP759757.1	SierraLeone	2014.731507	0.03229656	3.37E-04
KP759747.1	SierraLeone	2014.734247	0.032350345	3.89E-04
KP759755.1	SierraLeone	2014.731507	0.032404142	4.45E-04
KR653262.1	SierraLeone	2014.783562	0.032350179	3.49E-04
KR653266.1	SierraLeone	2014.731507	0.032350126	3.91E-04
KU296770.1	SierraLeone	2014.969863	0.032457708	3.06E-04
KU296776.1	SierraLeone	2014.936986	0.032457716	3.32E-04
KU296717.1	SierraLeone	2014.986301	0.03272672	5.61E-04
KU296510.1	SierraLeone	2014.975342	0.032567251	4.11E-04
KU296335.1	SierraLeone	2014.989041	0.03262211	4.55E-04
KU296554.1	SierraLeone	2014.975342	0.03262411	4.68E-04
KU296621.1	SierraLeone	2014.975342	0.03262411	4.68E-04

KU296323.1	SierraLeone	2015.010959	0.03262311	4.38E-04
KU296792.1	SierraLeone	2015.09863	0.032889589	6.34E-04
KU296630.1	SierraLeone	2014.972603	0.032622205	4.68E-04
KU296413.1	SierraLeone	2014.969863	0.032676073	5.24E-04
KU296320.1	SierraLeone	2014.969863	0.032675917	5.24E-04
KU296789.1	SierraLeone	2015.010959	0.032568264	3.83E-04
KU296316.1	SierraLeone	2015.024658	0.032621123	4.25E-04
KU296480.1	SierraLeone	2014.972603	0.032621284	4.67E-04
KR653227.1	SierraLeone	2014.649315	0.032403666	5.10E-04
KR653247.1	SierraLeone	2014.813699	0.032564744	5.39E-04
KR653259.1	SierraLeone	2014.868493	0.032565608	4.95E-04
KR653224.1	SierraLeone	2014.972603	0.032565608	4.11E-04
KR653302.1	SierraLeone	2014.808219	0.032352965	3.31E-04
KU296575.1	SierraLeone	2015.287671	0.032623064	2.14E-04
KU296433.1	SierraLeone	2015.073973	0.032623241	3.87E-04
KU296738.1	SierraLeone	2014.939726	0.032306868	1.79E-04
KU296379.1	SierraLeone	2014.975342	0.032364597	2.08E-04
KU296384.1	SierraLeone	2015.024658	0.032732387	5.36E-04
KR653234.1	SierraLeone	2014.778082	0.032299281	3.02E-04
KR653273.1	SierraLeone	2014.747945	0.032512769	5.40E-04
KR653295.1	SierraLeone	2014.89863	0.032673703	5.79E-04
KU296606.1	SierraLeone	2014.972603	0.032834479	6.80E-04
KR534554.1	Guinea	2014.769863	0.03235005	3.59E-04
KP759672.1	SierraLeone	2014.832877	0.032672277	6.31E-04
KR653283.1	SierraLeone	2014.769863	0.032672149	6.82E-04
KU296373.1	SierraLeone	2014.99726	0.032619982	4.46E-04
KU296836.1	SierraLeone	2015.008219	0.032827986	6.45E-04
KM233115.1	SierraLeone	2014.460274	0.032182889	4.42E-04
KR534532.1	Guinea	2014.723288	0.032181889	2.29E-04
KR534587.1	Guinea	2014.649315	0.032180889	2.88E-04
KR534586.1	Guinea	2014.558904	0.032285486	4.65E-04
KM233061.1	SierraLeone	2014.438356	0.032175889	4.53E-04

KR105228.1	SierraLeone	2014.523288	0.032171889	3.80E-04
KR534529.1	Guinea	2014.720548	0.032169889	2.19E-04
KR105227.1	SierraLeone	2014.523288	0.032380918	5.89E-04
KR534508.1	Guinea	2014.558904	0.032163889	3.44E-04
KR534570.1	Guinea	2014.810959	0.032430188	4.06E-04
KX121424.1	Guinea	2015.293151	0.033074542	6.62E-04
KU296438.1	SierraLeone	2015.326027	0.032913895	4.74E-04
KU296795.1	SierraLeone	2015.254795	0.032700844	3.19E-04
KU296415.1	SierraLeone	2015.230137	0.032700844	3.39E-04
KU296476.1	SierraLeone	2015.156164	0.032591375	2.89E-04
KR534585.1	Guinea	2014.756164	0.032483724	5.04E-04
KR534577.1	Guinea	2014.712329	0.032430273	4.86E-04
KR534527.1	Guinea	2014.715068	0.032321248	3.75E-04
KR534579.1	Guinea	2014.728767	0.032268799	3.11E-04
KR534520.1	Guinea	2014.649315	0.032160889	2.68E-04
KM233110.1	SierraLeone	2014.460274	0.032159889	4.19E-04
KR534515.1	Guinea	2014.621918	0.032210303	3.39E-04
KR534516.1	Guinea	2014.630137	0.032156889	2.79E-04
KY401667.1	SierraLeone	2014.764384	0.032476294	4.90E-04
KT589390.1	SierraLeone	2014.709589	0.032637505	6.96E-04
KY401662.1	SierraLeone	2014.69863	0.032638505	7.05E-04
KY401660.1	SierraLeone	2014.687671	0.032639505	7.15E-04
KY401665.1	SierraLeone	2014.753425	0.032801131	8.24E-04
KY401663.1	SierraLeone	2014.706849	0.032640505	7.01E-04
KP240931.1	SierraLeone	2014.69863	0.032688891	7.56E-04
KR105288.1	SierraLeone	2014.616438	0.032423903	5.57E-04
KR105287.1	SierraLeone	2014.616438	0.032423903	5.57E-04
KR105252.1	SierraLeone	2014.545205	0.032369586	5.60E-04
KR105235.1	SierraLeone	2014.531507	0.032317112	5.19E-04
KR105258.1	SierraLeone	2014.550685	0.032261894	4.48E-04
KM233104.1	SierraLeone	2014.457534	0.032154889	4.16E-04
KP759756.1	SierraLeone	2014.742466	0.032206674	2.38E-04

KP759615.1	SierraLeone	2014.753425	0.032581473	6.04E-04
KP759666.1	SierraLeone	2014.750685	0.032579071	6.04E-04
KP759693.1	SierraLeone	2014.846575	0.032633457	5.81E-04
KP759675.1	SierraLeone	2014.830137	0.032687236	6.48E-04
KP759751.1	SierraLeone	2014.789041	0.032742017	7.36E-04
KP759674.1	SierraLeone	2014.830137	0.032742034	7.03E-04
KR653248.1	SierraLeone	2014.830137	0.032793826	7.55E-04
KR653258.1	SierraLeone	2014.827397	0.032793826	7.57E-04
KR653299.1	SierraLeone	2014.871233	0.032686079	6.14E-04
KP759701.1	SierraLeone	2014.852055	0.032527684	4.71E-04
KP759687.1	SierraLeone	2014.827397	0.032795719	7.59E-04
KR653272.1	SierraLeone	2014.816438	0.032579303	5.51E-04
KP759715.1	SierraLeone	2014.764384	0.032419286	4.33E-04
KP759676.1	SierraLeone	2014.827397	0.032795015	7.58E-04
KP759677.1	SierraLeone	2014.830137	0.0325797	5.40E-04
KR105294.1	SierraLeone	2014.621918	0.032315346	4.44E-04
KR653240.1	SierraLeone	2014.846575	0.032315301	2.63E-04
KR653260.1	SierraLeone	2014.739726	0.032475971	5.10E-04
KU296734.1	SierraLeone	2015.008219	0.032317553	1.35E-04
KU296334.1	SierraLeone	2015.010959	0.032426332	2.41E-04
KT946869.1	SierraLeone	2014.964384	0.032534684	3.87E-04
KU296596.1	SierraLeone	2015.038356	0.032911715	7.04E-04
KU296356.1	SierraLeone	2015.013699	0.032478042	2.91E-04
KU296445.1	SierraLeone	2015.19726	0.032691352	3.56E-04
KU296300.1	SierraLeone	2015.186301	0.032744227	4.17E-04
KR653226.1	SierraLeone	2014.794521	0.032476777	4.66E-04
KR653268.1	SierraLeone	2014.810959	0.03263653	6.13E-04
KR653256.1	SierraLeone	2014.838356	0.032690127	6.44E-04
KU296551.1	SierraLeone	2014.934247	0.032528675	4.05E-04
KU296454.1	SierraLeone	2015.69589	0.033067566	3.29E-04
KR653228.1	SierraLeone	2014.832877	0.032529476	4.88E-04
KU296332.1	SierraLeone	2014.989041	0.032636746	4.69E-04

KU296814.1	SierraLeone	2014.989041	0.032584057	4.17E-04
KU296663.1	SierraLeone	2014.99726	0.032584051	4.10E-04
KP759727.1	SierraLeone	2014.772603	0.032426049	4.33E-04
KP759704.1	SierraLeone	2014.852055	0.032481931	4.25E-04
KP759709.1	SierraLeone	2014.860274	0.03253471	4.71E-04
KR105346.1	SierraLeone	2014.736986	0.032370562	4.07E-04
KP759723.1	SierraLeone	2014.761644	0.032481878	4.98E-04
KP759680.1	SierraLeone	2014.827397	0.032317459	2.80E-04
KP759678.1	SierraLeone	2014.750685	0.032316458	3.41E-04
KP759734.1	SierraLeone	2014.739726	0.032315458	3.49E-04
KP759731.1	SierraLeone	2014.769863	0.032422049	4.31E-04
KP759608.1	SierraLeone	2014.745205	0.032422539	4.52E-04
KP759735.1	SierraLeone	2014.769863	0.032571907	5.81E-04
KP759737.1	SierraLeone	2014.769863	0.032531959	5.41E-04
KP759753.1	SierraLeone	2014.789041	0.032639516	6.33E-04
KP759694.1	SierraLeone	2014.753425	0.032585733	6.08E-04
KU296410.1	SierraLeone	2015.010959	0.032637418	4.52E-04
KP759736.1	SierraLeone	2014.769863	0.032585622	5.95E-04
KP759724.1	SierraLeone	2014.767123	0.032692176	7.04E-04
KP759697.1	SierraLeone	2014.849315	0.032582773	5.28E-04
KP759660.1	SierraLeone	2014.830137	0.03252898	4.90E-04
KU296809.1	SierraLeone	2015.147945	0.03258267	2.87E-04
KU296521.1	SierraLeone	2015.219178	0.032796884	4.44E-04
KU296394.1	SierraLeone	2015.175342	0.03269127	3.73E-04
KU296595.1	SierraLeone	2015.175342	0.03269227	3.74E-04
KU296355.1	SierraLeone	2015.150685	0.03269227	3.94E-04
KP759700.1	SierraLeone	2014.852055	0.032528855	4.72E-04
KP759595.1	SierraLeone	2014.827397	0.032478079	4.41E-04
KP759599.1	SierraLeone	2014.827397	0.032532095	4.95E-04
MF599508.1	SierraLeone	2015.260274	0.032852953	4.66E-04
KP759762.1	SierraLeone	2014.821918	0.032529855	4.97E-04
KR653252.1	SierraLeone	2014.632877	0.03231508	4.35E-04

KR105338.1	SierraLeone	2014.731507	0.03258334	6.24E-04
KR653261.1	SierraLeone	2014.728767	0.03231608	3.59E-04
KR653289.1	SierraLeone	2014.747945	0.032526751	5.54E-04
KP759716.1	SierraLeone	2014.758904	0.032579536	5.98E-04
KR534531.1	Guinea	2014.720548	0.032474317	5.24E-04
KR534578.1	Guinea	2014.715068	0.032474317	5.28E-04
KR534564.1	Guinea	2014.794521	0.032526738	5.16E-04
KR534566.1	Guinea	2014.8	0.032579322	5.64E-04
KR534524.1	Guinea	2014.693151	0.032579079	6.50E-04
KR534526.1	Guinea	2014.70411	0.032418857	4.81E-04
KR534517.1	Guinea	2014.632877	0.032417856	5.38E-04
KR105318.1	SierraLeone	2014.70137	0.032525795	5.91E-04
KR653287.1	SierraLeone	2014.671233	0.032579444	6.68E-04
KR105308.1	SierraLeone	2014.676712	0.032580404	6.65E-04
KR105312.1	SierraLeone	2014.690411	0.032847541	9.21E-04
KR105291.1	SierraLeone	2014.619178	0.032686118	8.17E-04
KP759618.1	SierraLeone	2014.745205	0.032690449	7.20E-04
KR653229.1	SierraLeone	2014.726027	0.032474134	5.19E-04
KP759703.1	SierraLeone	2014.852055	0.032527244	4.70E-04
KP759748.1	SierraLeone	2014.789041	0.032581117	5.75E-04
KR653239.1	SierraLeone	2014.638356	0.032313079	4.29E-04
KP759598.1	SierraLeone	2014.830137	0.032475956	4.37E-04
KR105289.1	SierraLeone	2014.619178	0.032475039	6.06E-04
KR653231.1	SierraLeone	2014.865753	0.032581178	5.13E-04
KP759705.1	SierraLeone	2014.860274	0.032738149	6.75E-04
KU143788.1	SierraLeone2014	2014.75	0.032950077	9.76E-04
KP759689.1	SierraLeone	2014.841096	0.032630507	5.82E-04
KP759691.1	SierraLeone	2014.745205	0.032630904	6.60E-04
KP759739.1	SierraLeone	2014.780822	0.032578131	5.79E-04
KM233070.1	SierraLeone	2014.449315	0.032203323	4.72E-04
KM233069.1	SierraLeone	2014.443836	0.032204323	4.77E-04
KM233042.1	SierraLeone	2014.419178	0.032204323	4.97E-04

KM233109.1	SierraLeone	2014.460274	0.032203305	4.63E-04
KP759662.1	SierraLeone	2014.827397	0.032257099	2.20E-04
KT357828.1	SierraLeone	2015.035616	0.032580117	3.75E-04
KT357848.1	SierraLeone	2015.090411	0.032849581	6.00E-04
KT357831.1	SierraLeone	2015.046575	0.032849581	6.36E-04
KT357830.1	SierraLeone	2015.043836	0.032849645	6.38E-04
KT357833.1	SierraLeone	2015.052055	0.032849664	6.31E-04
KT357839.1	SierraLeone	2015.054795	0.032689414	4.69E-04
KT357849.1	SierraLeone	2015.093151	0.032690414	4.39E-04
KT357853.1	SierraLeone	2015.134247	0.032797026	5.12E-04
KU296687.1	SierraLeone	2015.076712	0.032796392	5.58E-04
KU296698.1	SierraLeone	2015.076712	0.032743485	5.05E-04
KT357827.1	SierraLeone	2015.035616	0.032850418	6.45E-04
KT357842.1	SierraLeone	2015.065753	0.032905895	6.76E-04
KT357851.1	SierraLeone	2015.09863	0.032906895	6.51E-04
KT357837.1	SierraLeone	2015.052055	0.032959753	7.41E-04
KT357835.1	SierraLeone	2015.052055	0.032904895	6.87E-04
KT357843.1	SierraLeone	2015.068493	0.032903967	6.72E-04
KT357841.1	SierraLeone	2015.065753	0.032851155	6.22E-04
KT357832.1	SierraLeone	2015.049315	0.0329049	6.89E-04
KR653237.1	SierraLeone	2014.89589	0.032526127	4.34E-04
KR653271.1	SierraLeone	2014.863014	0.032473503	4.08E-04
KR653293.1	SierraLeone	2014.772603	0.032366712	3.74E-04
KR653284.1	SierraLeone	2014.734247	0.032367581	4.06E-04
KR105344.1	SierraLeone	2014.731507	0.032367581	4.08E-04
KR105341.1	SierraLeone	2014.731507	0.032313093	3.53E-04
KP759669.1	SierraLeone	2014.824658	0.032364878	3.30E-04
KP759610.1	SierraLeone	2014.849315	0.032420167	3.65E-04
KU296564.1	SierraLeone	2015.041096	0.032473563	2.64E-04
KR653245.1	SierraLeone	2014.832877	0.032313229	2.72E-04
KU296835.1	SierraLeone	2014.978082	0.033118685	9.60E-04
KU296699.1	SierraLeone	2015.243836	0.03344333	0.001070118

KU296840.1	SierraLeone	2015.167123	0.033230093	9.19E-04
KU296829.1	SierraLeone	2015.167123	0.033231093	9.20E-04
KU296418.1	SierraLeone	2015.178082	0.033284934	9.65E-04
KU296559.1	SierraLeone	2015.265753	0.03328494	8.94E-04
KU296527.1	SierraLeone	2015.20274	0.033228089	8.88E-04
KU296748.1	SierraLeone	2015.010959	0.033175375	9.90E-04
KU296721.1	SierraLeone	2015.106849	0.03312253	8.60E-04
KU296497.1	SierraLeone	2015.010959	0.03312253	9.37E-04
KU296500.1	SierraLeone	2015.010959	0.03312253	9.37E-04
KY401654.1	SierraLeone	2015.441096	0.033280122	7.48E-04
KY401655.1	SierraLeone	2015.468493	0.033280122	7.26E-04
KR653294.1	SierraLeone	2014.652055	0.032314346	4.19E-04
KR653297.1	SierraLeone	2014.70411	0.032365649	4.28E-04
KP759718.1	SierraLeone	2014.742466	0.0322637	2.95E-04
KP759661.1	SierraLeone	2014.830137	0.032587582	5.48E-04
KP759699.1	SierraLeone	2014.846575	0.032802969	7.50E-04
KP759696.1	SierraLeone	2014.846575	0.032802959	7.50E-04
KP759663.1	SierraLeone	2014.742466	0.032749085	7.81E-04
KP759758.1	SierraLeone	2014.808219	0.032533706	5.12E-04
KP759719.1	SierraLeone	2014.758904	0.032316483	3.35E-04
KP759711.1	SierraLeone	2014.756164	0.032316486	3.37E-04
KP759730.1	SierraLeone	2014.772603	0.032315483	3.23E-04
KP759682.1	SierraLeone	2014.830137	0.032315483	2.76E-04
KU296341.1	SierraLeone	2015.054795	0.032639891	4.19E-04
KU296465.1	SierraLeone	2014.926027	0.032532149	4.16E-04
KU296658.1	SierraLeone	2015.167123	0.032586028	2.75E-04
KU296349.1	SierraLeone	2015.167123	0.032639835	3.29E-04
KU296794.1	SierraLeone	2015.013699	0.032477253	2.90E-04
KU296674.1	SierraLeone	2015.087671	0.032476967	2.30E-04
KU296823.1	SierraLeone	2015.087671	0.032478976	2.32E-04
KU296499.1	SierraLeone	2015.090411	0.03242616	1.77E-04
KU296659.1	SierraLeone	2015.082192	0.03242616	1.83E-04

KU296304.1	SierraLeone	2015.082192	0.03242616	1.83E-04
KU296447.1	SierraLeone	2015.09589	0.032908711	6.55E-04
KU296350.1	SierraLeone	2015.032877	0.032802355	5.99E-04
KU296746.1	SierraLeone	2015.079452	0.032695272	4.55E-04
KU296588.1	SierraLeone	2015.079452	0.032695272	4.55E-04
KU296826.1	SierraLeone	2015.010959	0.032531882	3.47E-04
MF599518.1	SierraLeone	2015.39726	0.032475007	-2.21E-05
KP759708.1	SierraLeone	2014.860274	0.032691247	6.28E-04
KP759710.1	SierraLeone	2014.756164	0.03242322	4.44E-04
KU296331.1	SierraLeone	2015.041096	0.03242422	2.15E-04
KU296786.1	SierraLeone	2015.049315	0.03242522	2.09E-04
KU296655.1	SierraLeone	2015.052055	0.03242522	2.07E-04
KU296785.1	SierraLeone	2015.082192	0.032586719	3.44E-04
KU296568.1	SierraLeone	2015.087671	0.032586719	3.40E-04
KU296716.1	SierraLeone	2015.041096	0.032478031	2.68E-04
KU296420.1	SierraLeone	2015.054795	0.03242422	2.04E-04
KP759605.1	SierraLeone	2014.841096	0.032636934	5.89E-04
KU296387.1	SierraLeone	2015.030137	0.032691308	4.91E-04
KU296530.1	SierraLeone	2015.030137	0.032691308	4.91E-04
KP759695.1	SierraLeone	2014.849315	0.032635578	5.81E-04
KR653282.1	SierraLeone	2014.824658	0.032687158	6.52E-04
KP342330.1	Guinea	2014.84	0.032150903	1.04E-04
KM233113.1	SierraLeone	2014.460274	0.032151904	4.11E-04
KR653267.1	SierraLeone	2014.641096	0.032474421	5.88E-04
KR105239.1	SierraLeone	2014.542466	0.032207433	4.00E-04
KR105247.1	SierraLeone	2014.542466	0.0327982	9.91E-04
KR105233.1	SierraLeone	2014.531507	0.032368508	5.70E-04
KP184503.1	UnitedKingdom	2014.646575	0.032259706	3.69E-04
KP120616.1	UnitedKingdom	2014.646575	0.0323123	4.21E-04
KR105243.1	SierraLeone	2014.534247	0.032260754	4.60E-04
KR105242.1	SierraLeone	2014.531507	0.032261794	4.64E-04
KR105284.1	SierraLeone	2014.616438	0.032210306	3.44E-04

KR653251.1	SierraLeone	2014.638356	0.032211306	3.27E-04
KR105278.1	SierraLeone	2014.613699	0.032212306	3.48E-04
KR653269.1	SierraLeone	2014.712329	0.032426705	4.83E-04
KR105276.1	SierraLeone	2014.608219	0.032214306	3.54E-04
KR105306.1	SierraLeone	2014.654795	0.0323206	4.23E-04
KR105283.1	SierraLeone	2014.616438	0.032207306	3.41E-04
KM233089.1	SierraLeone	2014.452055	0.032101507	3.67E-04
KM233041.1	SierraLeone	2014.419178	0.032102507	3.95E-04
KM233036.1	SierraLeone	2014.416438	0.032105507	4.00E-04
KM233079.1	SierraLeone	2014.452055	0.032105507	3.71E-04
KM233101.1	SierraLeone	2014.454795	0.032157352	4.21E-04
KM233091.1	SierraLeone	2014.452055	0.032263908	5.30E-04
KM233045.1	SierraLeone	2014.421918	0.032100507	3.91E-04
KP759698.1	SierraLeone	2014.849315	0.032314726	2.60E-04
KM233093.1	SierraLeone	2014.452055	0.032154355	4.20E-04
KM233064.1	SierraLeone	2014.449315	0.032104597	3.73E-04
KR105223.1	SierraLeone	2014.523288	0.032152207	3.61E-04
KM233076.1	SierraLeone	2014.449315	0.032103597	3.72E-04
KM233046.1	SierraLeone	2014.427397	0.032102507	3.88E-04
KR105216.1	SierraLeone	2014.512329	0.032312911	5.30E-04
KR653242.1	SierraLeone	2014.849315	0.03241939	3.65E-04
KP759764.1	SierraLeone	2014.821918	0.032367203	3.35E-04
KU296668.1	SierraLeone	2015.430137	0.032932161	4.09E-04
KU296353.1	SierraLeone	2015.449315	0.033089067	5.50E-04
KU296442.1	SierraLeone	2015.435616	0.033090067	5.62E-04
KU296580.1	SierraLeone	2015.512329	0.033214746	6.25E-04
KU296775.1	SierraLeone	2015.654795	0.03337618	6.71E-04
KU296462.1	SierraLeone	2015.673973	0.03337618	6.56E-04
KU296690.1	SierraLeone	2015.506849	0.033268582	6.83E-04
KU296306.1	SierraLeone	2015.506849	0.033215757	6.30E-04
KU296666.1	SierraLeone	2015.471233	0.033229795	6.73E-04
KU296414.1	SierraLeone	2015.432877	0.033143861	6.18E-04

KU296543.1	SierraLeone	2015.454795	0.033072066	5.29E-04
KU296518.1	SierraLeone	2015.30137	0.032652415	2.33E-04
KU296743.1	SierraLeone	2015.273973	0.032584387	1.87E-04
KU296450.1	SierraLeone	2015.306849	0.032638199	2.14E-04
KU296753.1	SierraLeone	2015.421918	0.032638195	1.21E-04
KU296428.1	SierraLeone	2015.460274	0.032691944	1.44E-04
KU296732.1	SierraLeone	2015.375342	0.032641144	1.62E-04
KU296625.1	SierraLeone	2015.427397	0.03269501	1.74E-04
KU296843.1	SierraLeone	2015.487671	0.032749773	1.80E-04
KU296793.1	SierraLeone	2015.435616	0.032767058	2.39E-04
KU296804.1	SierraLeone	2015.435616	0.032715247	1.87E-04
KU296819.1	SierraLeone	2015.4	0.032857666	3.58E-04
KU296617.1	SierraLeone	2015.405479	0.032787459	2.84E-04
KU296831.1	SierraLeone	2015.323288	0.032769056	3.32E-04
KU296486.1	SierraLeone	2015.421918	0.032640144	1.23E-04
KU296399.1	SierraLeone	2015.432877	0.03269293	1.67E-04
KU296712.1	SierraLeone	2015.427397	0.032642144	1.21E-04
KU296440.1	SierraLeone	2015.476712	0.032748868	1.88E-04
KU296592.1	SierraLeone	2015.421918	0.032641144	1.24E-04
KU296522.1	SierraLeone	2015.526027	0.032853303	2.52E-04
KU296649.1	SierraLeone	2015.430137	0.032747721	2.24E-04
KU296340.1	SierraLeone	2015.454795	0.032801563	2.58E-04
KU296618.1	SierraLeone	2015.468493	0.032801563	2.47E-04
KU296325.1	SierraLeone	2015.490411	0.03274576	1.73E-04
KU296385.1	SierraLeone	2015.419178	0.0326909	1.76E-04
KU296322.1	SierraLeone	2015.416438	0.032744755	2.32E-04
KU296740.1	SierraLeone	2015.4	0.0326919	1.93E-04
KU296801.1	SierraLeone	2015.008219	0.032315573	1.33E-04
KU296479.1	SierraLeone	2015.024658	0.032315573	1.19E-04
KP759721.1	SierraLeone	2014.761644	0.032316559	3.33E-04
KP759685.1	SierraLeone	2014.832877	0.032478006	4.37E-04
KP759722.1	SierraLeone	2014.761644	0.032262772	2.79E-04

KR105340.1	SierraLeone	2014.731507	0.032260772	3.01E-04
KY401649.1	SierraLeone	2015.624658	0.033011651	3.31E-04
KY401648.1	SierraLeone	2015.547945	0.033011651	3.93E-04
KM233050.1	SierraLeone	2014.435616	0.032152923	4.32E-04
KM233051.1	SierraLeone	2014.441096	0.032153923	4.29E-04
KM233052.1	SierraLeone	2014.446575	0.032153923	4.24E-04
KM034562.1	SierraLeone	2014.40274	0.031931312	2.37E-04
KM034562.2	SierraLeone	2014.34	0.031931312	2.88E-04
KR817080.1	Guinea	2014.723288	0.032143961	1.91E-04
KR817083.1	Guinea	2014.742466	0.032359609	3.91E-04
KR817120.1	Guinea	2014.589041	0.032038236	1.94E-04

Table S3. Dataset of 50 coding complete EBOV sequences used for inter-outbreak rate estimations

EBOV variant	Genbank Accession	Country	Time of Outbreak	EBOV isolate	Estimated Collection Date
Yambuku	AF086833.2	DRC	1976	Mayinga	8/15/76
Yambuku	KM655246.1	DRC	1976	Ecran	8/15/76
Yambuku	KC242801.1	DRC	1976	deRoover	8/15/76
“Tandala”	KC242791.1	DRC	1977	Bonduni	6/15/77
Unnamed	KC242792.1	GAB	1994-96	Gab280	12/15/94
Kitwit	JQ352763.1	DRC	1995	9510621	5/4/95
Kitwit	KC242796.1	DRC	1995	9510621	5/15/95
Kikwit	AY354458.1	DRC	1995	Zaire	5/15/95
Unnamed	KC242798.1	GAB	1994-96	1Ikot	4/15/96
Unnamed	KC242795.1	GAB	1994-96	1Mbie	5/15/96
Unnamed	KC242797.1	GAB	1994-96	10ba	6/15/96
Unnamed	KC242793.1	GAB	1994-96	1Eko	10/15/96
Unnamed	KC242794.1	GAB	1994-96	2Nza	11/15/96
“Mékambo”	KC242800.1	GAB	2001-02	Ilembe	6/15/02
Unnamed	KF113528.1	ROC	2003	Kellé 1	1/15/03
Unnamed	KF113529.1	ROC	2003	Kellé 2	1/15/03
“Bamoukamba”	HQ613403.1	DRC	2007-08	M-M	8/31/07
“Bamoukamba”	KC242789.1	DRC	2007-08	4 Luebo	9/15/07
“Bamoukamba”	KC242785.1	DRC	2007-08	0 Luebo	9/15/07
“Bamoukamba”	KC242790.1	DRC	2007-08	5 Luebo	9/15/07
“Bamoukamba”	KC242788.1	DRC	2007-08	43 Luebo	9/15/07
Unnamed	HQ613402.1	DRC	2007-08	34-KS	12/31/08
Makona	KJ660346.2	GIN	2013-16	C15	3/17/14
Makona	KJ660348.2	GIN	2013-16	C05	3/19/14
Makona	KJ660347.2	GIN	2013-16	C07	3/20/14
Makona	KM034551.1	SLE	2013-16	EM096	5/26/14
Makona	KM034553.1	SLE	2013-16	G3670	5/27/14
Makona	KM034561.1	SLE	2013-16	G3683	5/28/14
Makona	KM034562.2	SLE	2013-16	G3686	5/28/14
Makona	KM233096.1	SLE	2013-16	G3822	6/15/14

Makona	KM233102.1	SLE	2013-16	G3829	6/16/14
Lomela	KM519951.1	DRC	2014	Lokolia	8/15/14
Lomela	KR819004.1	DRC	2014	LokaliaB11	8/16/14
Lomela	KP271020.1	DRC	2014	Lokolia19	8/20/14
Lomela	KP271018.1	DRC	2014	Lokolia16	8/20/14
“Tumba”	MH733477	DRC	2018	BIK009	5/10/18
“Tumba”	MH733478	DRC	2018	BIK011	5/11/18
“Tumba”	MH733479	DRC	2018	BIK016	5/15/18
“Tumba”	MH733484	DRC	2018	BIK019	5/15/18
“Tumba”	MH733482	DRC	2018	BIK025	5/17/18
“Tumba”	MH733483	DRC	2018	BIK026	5/17/18
“Tumba”	MH733485	DRC	2018	BIK031	5/18/18
“Tumba”	MH733480	DRC	2018	BIK046	5/19/18
“Tumba”	MH733486	DRC	2018	BIK039	5/19/18
“Tumba”	MH733487	DRC	2018	BIK037	5/19/18
“Tumba”	MH733481	DRC	2018	BIK045	5/20/18
“Tumba”	MH733488	DRC	2018	BIK053	5/21/18
“Tumba”	MH733489	DRC	2018	BIK055	5/22/18
“Tumba”	MH733490	DRC	2018	BIK091	5/28/18
“Tumba”	MH733491	DRC	2018	BIK137	6/4/18

Table S4. Assays deployed during the Équateur Province 2018 EVD outbreak.

Assay Name	EBOV Gene Target	Primer/Probe Type	Primer/Probe Sequence	Primer/Probe Mismatch	Num Mism
GeneXpert_NP	*NP*	Reverse	CTGTGGCGACTCCGAGTGCAA	==========A=======	
		Probe (F)	TGAGCATGGTCTTTTCCCTCAAC		
		Forward	GCTCCTTTCGCCCGACTTTTGAA		
GeneXpert_GP	*GP*	Reverse	GGAAGCCCCGAATCCCGT		
		Probe (F)	CCTGACGGGAGTGAGTGTCTACC		
		Forward	GGGCTGAAAACTGCTACAATCTTGAAATC		
NP_ENZ_mod	NP	Reverse	AGGACCAAGTCATCTGGTGC		
		Probe (F)	CARAGTTACTCGGAAAACGGCAT		
		Forward	ATGATGGARGCTACGGCG		0

EBOV_L	*L*	Forward	CAGCCAGCAATTTCTTCCAT		
		Probe 1	ATCATTGGCRTACTGGAGGAGCAG		
		Probe 2	TCATTGGCGTACTGGAGGAGCAGG		
		Reverse	TTTCGGTTGCTGTTTCTGTG		

Table S5. RT-PCR primers and probes aligned to EBOV/"Tum" sequences, and number and position of mismatches. The same nur
all 16 sequences analyzed, except where marked with an asterisk. The number in brackets indicates the number of sequences with a r
of sequences tested for that primer/probe. Where the total number of sequences is 15, the draft BIK012 sequence had unknown base

Assay Name	EBOV Gene Target	Primer/Probe Type	Primer/Probe Sequence	Primer/Probe Mismatch	N M
VP24_KGH	*VP24*	Reverse	CGTCCCGTAGCTTTRGCCAT		
		Forward	GTCGTTCCAACAATCGAGCG		
ZAI-NP	*NP*	Reverse	GCATATTGTTGGAGTTGCTTCTCAGC	==G==========	
		Forward	GGACCGCCAAGGTAAAAAATGA		
Kulesh-MGB	*NP*	Reverse	GGATGACTCTTTGCCGAACAATC		
		Probe (F)	AGGTCTGTCCGTTCAA		
		Forward	TCTGACATGGATTACCACAAGATC		
NP_ENZ	*NP*	Reverse	AGGACCAAGTCATCTGGTGC		
		Forward	ATGATGGAAGCTACGGCG		
EboZNP	*NP*	Reverse	AGGAGAGAAACTGACCGGCAT		
		Probe (F)	CATGCCGGAAGAGGAGACAACTGAAGC		
		Forward	TGGAAAAAACATTAAGAGAACACTTGC		
Ebola-MGB-EBOV	*NP*	Reverse	CAAGTCCAAGATGGTCAAGTTCG		
		Forward	ACTCAGAGAGGCTGCCACTG		
L_Zhai	*L*	Reverse	GCTTCACAAAGTGTTTGAACATT		
		Forward	TATTTTCCATTCAAAAACACTGGG	====C==========	
		Reverse	ATGTGGTGGGTTATAATAATCACTGACATG	=========A==========A=====	
		Probe (R)	CCAAAATCATCACTIGTGTGGTGCCA		

L_Panning	*L*	Forward	AAGCATTTCCTAGCAATATGATGGT		
L_PanFilo - L3/4	*L*	Reverse	ATAAWARTCACTDACATGCATRTARCA		
		Forward	GCTAAAGCATTTCCTAGCAATATGATGG		
	L	Reverse	TGWGGHGGRYTATAAWARTCACTDACAT		
L_PanFilo - L1/2		Forward	ATCGGAACTTTTCTTTCTCATT		
L_Palacios	*L*	Reverse	GGTGGTAAAATTCCCATAGTAGTTCTTT		
		Forward	AACACCGGGTCTTAATTCTTATATCAA	======A==========|	
L_modified - Filo-AB	*L*	Reverse	ATGTGGTGGGTTATAATAATCACTGACATGCAT	=========A==========A========|	
		Forward	ATCGGAA-TTTTCTTTCTCATTGAAAGA	=======C==========|	1
L_GAB-1	*L*	Reverse	GCATATAACACTGTGGGATTG	====G==========|	1
		Forward	GAATGTAGGTAGAACCTTCGG		
L_Filo-AB	*L*	Reverse	ATGTGGTGGGTTATAATAATCACTGACATG	=========A==========A=====|	
		Forward	ATCGGAA-TTTTCTTTCTCATT	=======C==========|	1
ZebovGP	*GP*	Reverse	AAAGGTGCGTAGCTCAGTTGTG	==========G======|	
		Forward	GGCCAACGAGACGACTCAA		
Kulesh-TM	*GP*	Reverse	CAGTCCGGTCCCAGAATGTG	==========A======|	
		Probe (F)	GCAGCGATGGGGCGGCACATG		
		Forward	TTTTCAATCCTCAACCGTAAGGC		
EBOGP	*GP*	Reverse	CTTTGTGMACATASCGGCAC		
		Probe (F)	CTACCAGCAGCGCCAGACGG		
		Forward	TGGGCTGAAAACTGCTACAATC		

EBO3/4	*GP*	Reverse	TGGAARGCWAAGTCWCCGG	
		Forward	GTTTGTCGKGACAAACTGTC	=====C==========
EBO1/2	*GP*	Reverse	ACGACACCTTCAGCRAAAGT	
		Forward	TGGGTAATYATCCTYTTCCA	
EBO-GP	*GP*	Reverse	TTTTTTTAGTTTCCCAGAAGGCCCACT	
		Forward	AATGGGCTGAAAATTGCTACAATC	==========C==========
EBOV tNGS	*L*	Reverse	TCCAGTTTGTTCTGATTATCCCAATT	
		Forward	AGAAGCGGTTCAAGGGCATACACACA	
	VP24	Reverse	CACTGTAAGCCAGCTTCCAAGTTGAC	

		Forward	TTGAGCTAACTCATATATGCTGACTC	
	VP24	Reverse	TCCTCACTGTAAGCCAGCTTCCAAGT	
		Forward	CATATTGAGCTAACTCATATATGCTG	
	VP24	Reverse	GAGTTTGATGTGACTCACAAAGGAAT	
		Forward	GAATCACCGCTGTGGGCATTGAGAGT	
	VP24	Reverse	AACGAACATCACTTTGAGCGCCCTCA	
		Forward	TACACATCCCATACATTGTATTAGGG	========T==========G===
	VP35	Reverse	AAGATGGTAAAACACTTGGACTCAAA	
		Forward	ATGCTGCTCCACCTGTCATCCACATC	==========A======
	VP35	Reverse	TTCAAGATGGTAAAACACTTGGACTC	
		Forward	AAGATGCTGCTCCACCTGTCATCCAC	==========A===
	VP35	Reverse	TTCAGCTTCAAGATGGTAAAACACTT	
		Forward	TCTTCCAAGATGCTGCTCCACCTGTC	

Table S6. Primers used for point mutagenesis of EBOV GP. Each primer set was used to create a codon mutation in a plasmid encoding a codon optimized EBOV/Kik GP. The codon targeted for mutation is underlined in the forward primer.

Mutation	Primer (5'–3')
E47D	aaccagcttatccacatcagacacttggagggt
	TGCCGTGATAAGCTGTCAAGCACAAATCAG
D338G	ggccatgatcttatggccctccgtcgtggtgtt
	AGTGAGAACTCAAGCGCCATGGTGCAAGTGC
A417T	gggtggtgtatctgaagtcgtactatcgttgtc
	GCTACGACCGCAGCAGGACCG
T424M	tcctgctgcggtcatagcgggtggtgt
	CCGCCAAAGGCTGAGAATACGAATACCAGTAAAGG
P430L	cgtattctcagctttagcggtcctgctgcggt
	AATACCAGTAAAGGAACCGATTTGCTCGATCCCGC
A474T	gagcttcccggatgatgtgctttcctccccggt
	GGGCTGATTACAAATACCATAGCAGGTGTGGCCGGA
A499T	gattgcttctcgacgtgtcctccgtcccccggt
	GTGAATGCCCAGCCGAAGTGCAATCCAAATCTG
R266G	gccggttgtatttgacccttttccagaggtgta
	AAACTGATTTGGAAGGTGAACCCGGAAATTG

Table S7. Position of intra-outbreak nucleotide differences and amino acid changes in EBOV/"Tum" sequences. We evaluated the number of single nucleotide polymorphisms (SNP) within the 16 consensus genomes generated from the 2018 Équateur Province outbreak. Genomic sequences from the 2018 Équateur Province EVD outbreak were aligned in Geneious 11.1.4 using MAFFT v7.388,[33] and intra-outbreak nucleotide polymorphisms were determined. In total, twenty-three SNPs and one indel were found in the intra-outbreak genome data. Of the 16 SNPs occurring within those genes, 9 were synonymous changes and 7 were non-synonymous changes.

Genome Location	Nucleotide Position	Consensus Nucleotide	Variant Nucleotide	No. Sequences with Variant	Amino Acid Change
NP	2536	A	G	1	
non-coding	2811	T	C	2	
VP35	3488	A	T	3	
GP	6834	A	R	1	R->G*
GP	6987	A	C	1	T->P
GP	7709	T	C	1	
non-coding	8465	A	G	1	
VP30	9342	G	A	1	
non-coding	9900	G	A	1	
non-coding	10337	G	A	3	
VP24	10831	A	C	1	K->Q
non-coding	11462	C	T	1	
L	11610	C	T	3	
L	12687	T	C	1	
L	12783	T	G	1	
L	13095	T	C	1	
L	13599	C	T	7	
L	15058	G	A	1	G->S
L	16040	C	T	2	T->I
L	17312	A	G	1	K->R
L	17639	T	C	1	L->P
non-coding	18319	T	A	1	
non-coding	18614	-	T	1	
non-coding	18812	A	G	1	

* Basecall at nucleotide position 6,834 is split A/G, with 2x coverage after deduplication

Table S8. Position of amino acid changes inferred from a comparison between EBOV/"Tum" sequences and EBOV/Kik sequences. Amino acid changes in all 16 sequences are presented here. The majority of amino acid changes were tested *in vitro* to assess changes in monoclonal antibody binding. Mutants were created with the mutations for the earliest sampled sequences, as indicated.

EBOV/"Tum" Sequence	aa Position	aa Change AY354458	aa Change JQ352763	aa Change KU182899	aa Change KY425653	aa Change U28077	Mutant Tested
All	47	E->D	NP	NP	E->D	NP	Yes
BIK012	266	R->G	R->G	R->G	R->G	R->G	Yes
BIK091	317	N->T	N->T	N->T	N->T	N->T	No
All	338	D->G	D->G	D->G	D->G	D->G	Yes
All	417	A->T	A->T	A->T	A->T	A->T	Yes
All	424	T->M	T->M	T->M	T->M	T->M	Yes
All	430	P->L	NP	NP	NP	NP	Yes
All	474	A->T	A->T	A->T	A->T	A->T	Yes
All	499	A->T	A->T	A->T	A->T	A->T	Yes
All	544	NP	NP	I->T	NP	NP	No

aa – amino acid, NP - not present

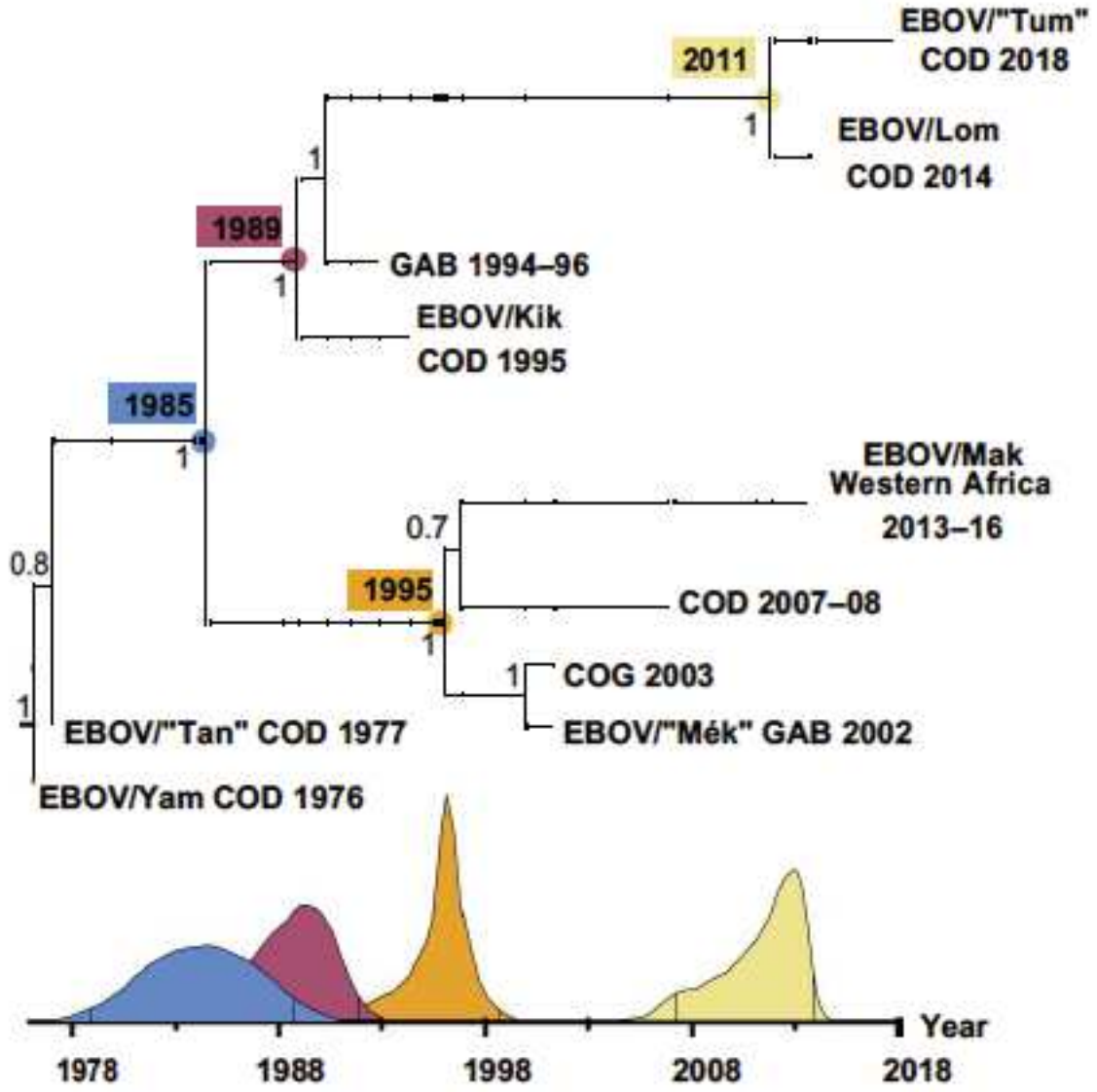


Figure S1 . A summarized maximum-clade credibility tree using 50 EBOV representatives (Appendix Table S3). For simplicity, the tree tips were pruned to only show the variant-defining branches. The mean year and 95% highest posterior density distributions of the time to the most recent common ancestor (tMRCA) are illustrated and scaled to the tree.

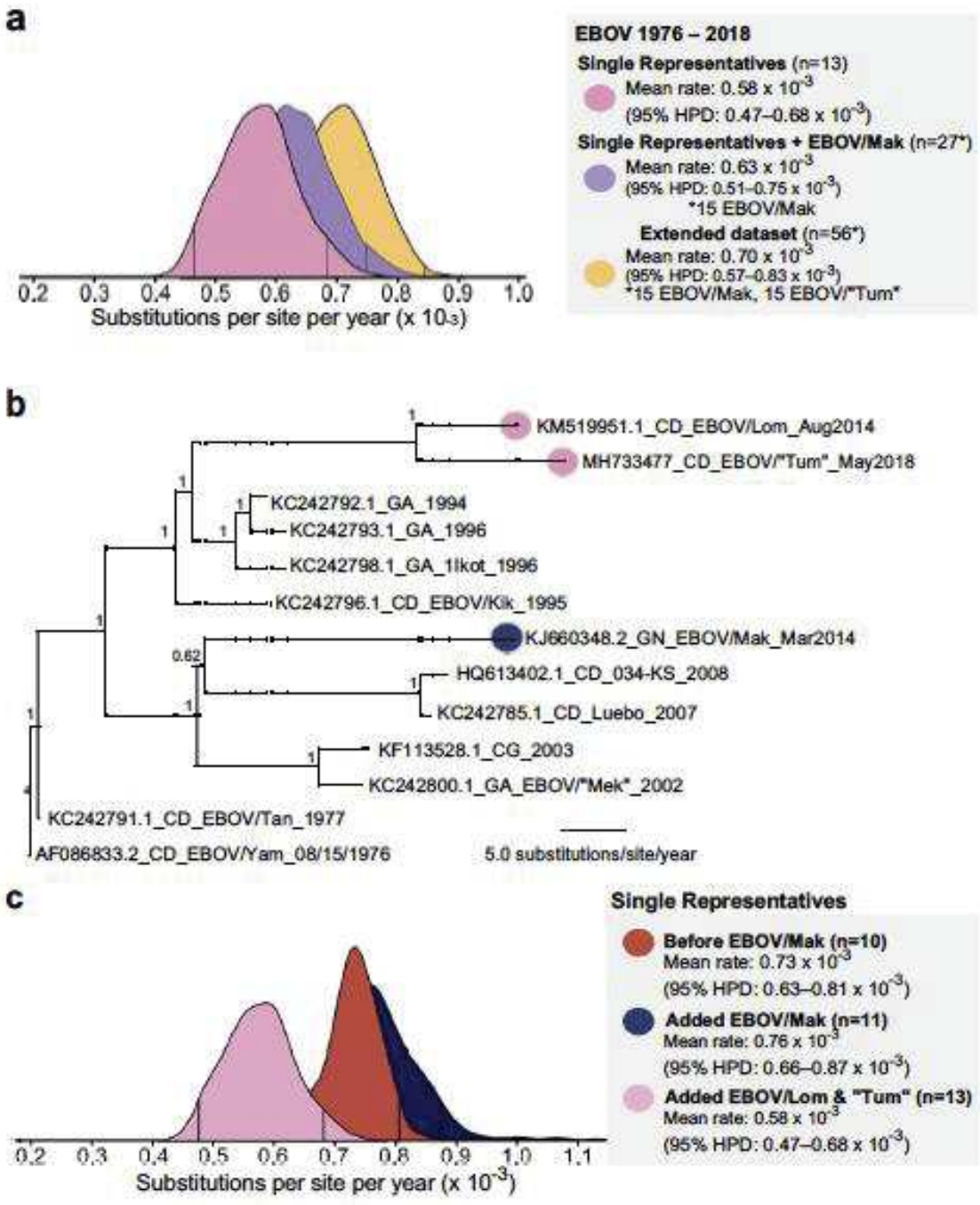


Figure S2. The evolutionary dynamics of single representatives datasets when estimating substitution rate. (**a**) An evolutionary rate comparison between singlerepresentatives (pink) and the impact of adding intra-outbreak sequences to small (purple) and larger (orange) datasets. (**b**) A maximum-clade credibility tree of single representatives outlining what samples were added to three inter-outbreak datasets. Posterior probabilities at nodes are shown. Tree is scaled by substitutions per site per year. (**c**) Inter-outbreak rates were compared with three single representative datasets: variants prior to EBOV/Mak (red), including EBOV/Mak (purple), and including EBOV/Lom and EBOV/"Tum" (pink).

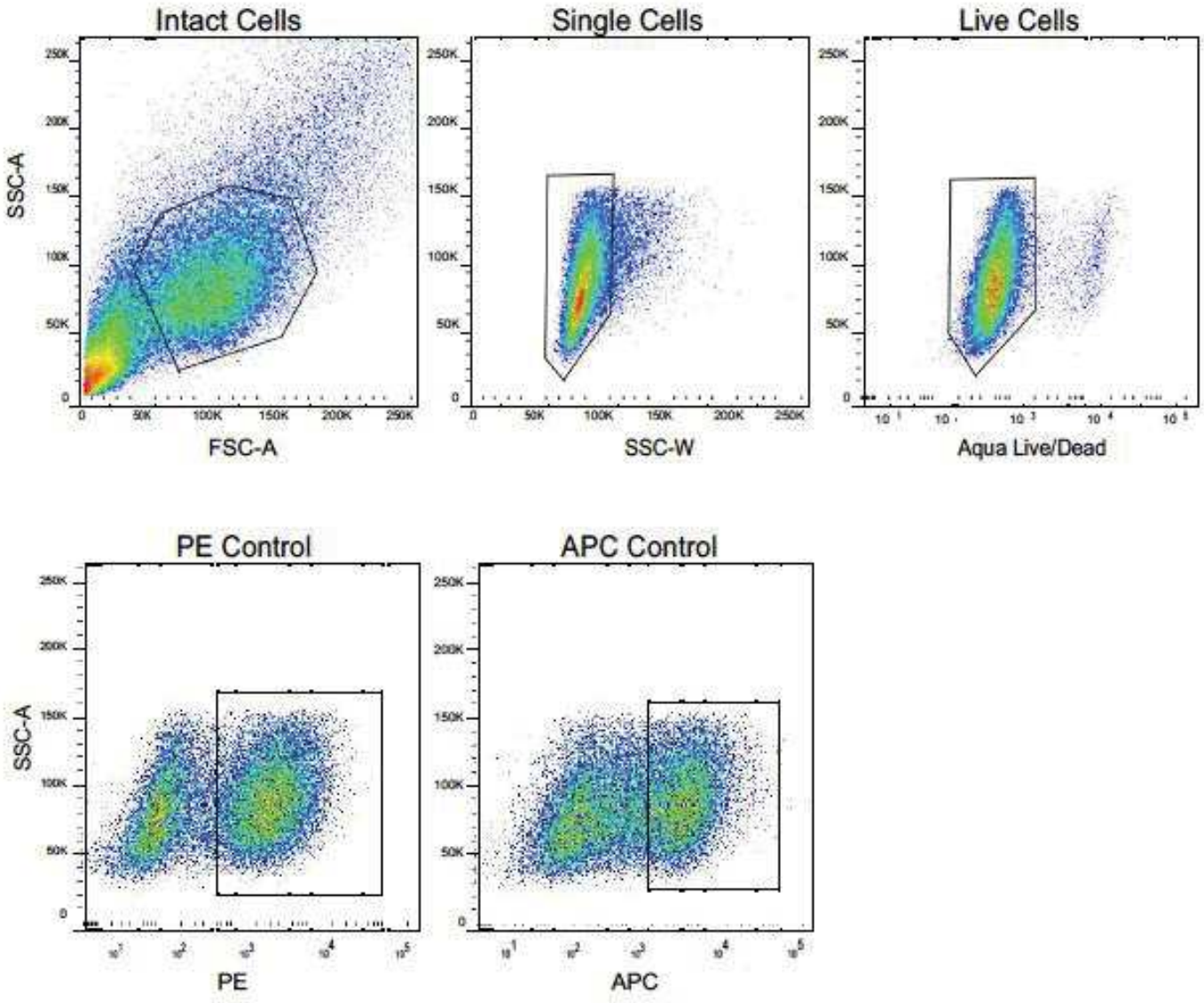


Figure S3. Gating strategy for the flow cytometry experiments. Cells were gated using forward scatter area (FSC-A) and side scatter area (SSC-A) to define the cell population. Single cells were gated using SSC-A by SSC width (SSC-W) and dead cells were excluded from analysis with LIVE/DEAD Fixable Aqua Stain. Phycoerythrin (PE) and allophycocyanin (APC) gates were defined to establish clear boundaries between the negative and positive cell populations.

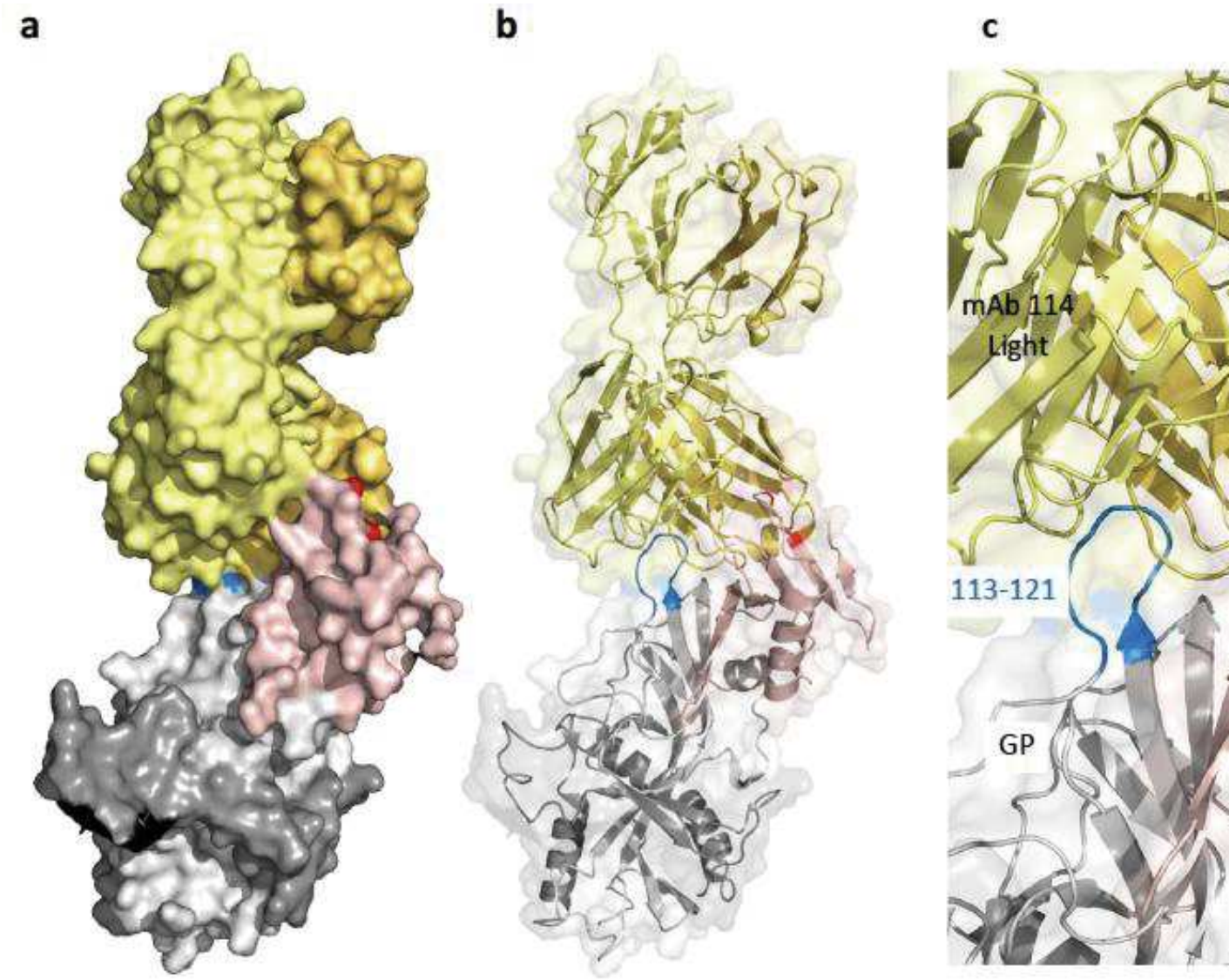


Figure S4. Comparison of mAb114 in complex with EBOV $GP_{1,2}$ (grey) (PDB:5FHC). GP1 (light grey) of EB
heavy chain (dark yellow) and light chain (light yellow) of mAb114. (a) Surface structure of antibody-prote
epitope (blue) and known residues (red) that are part of the GP1 glycan cap (pink). (b) Internal cartoon structu
that the predicted epitope (blue) falls in the binding pocket of the mAb114 antibody, while the known residu
antibody binding pocket. (c) A close up of this position is illustrated to show surface and internal structure of t

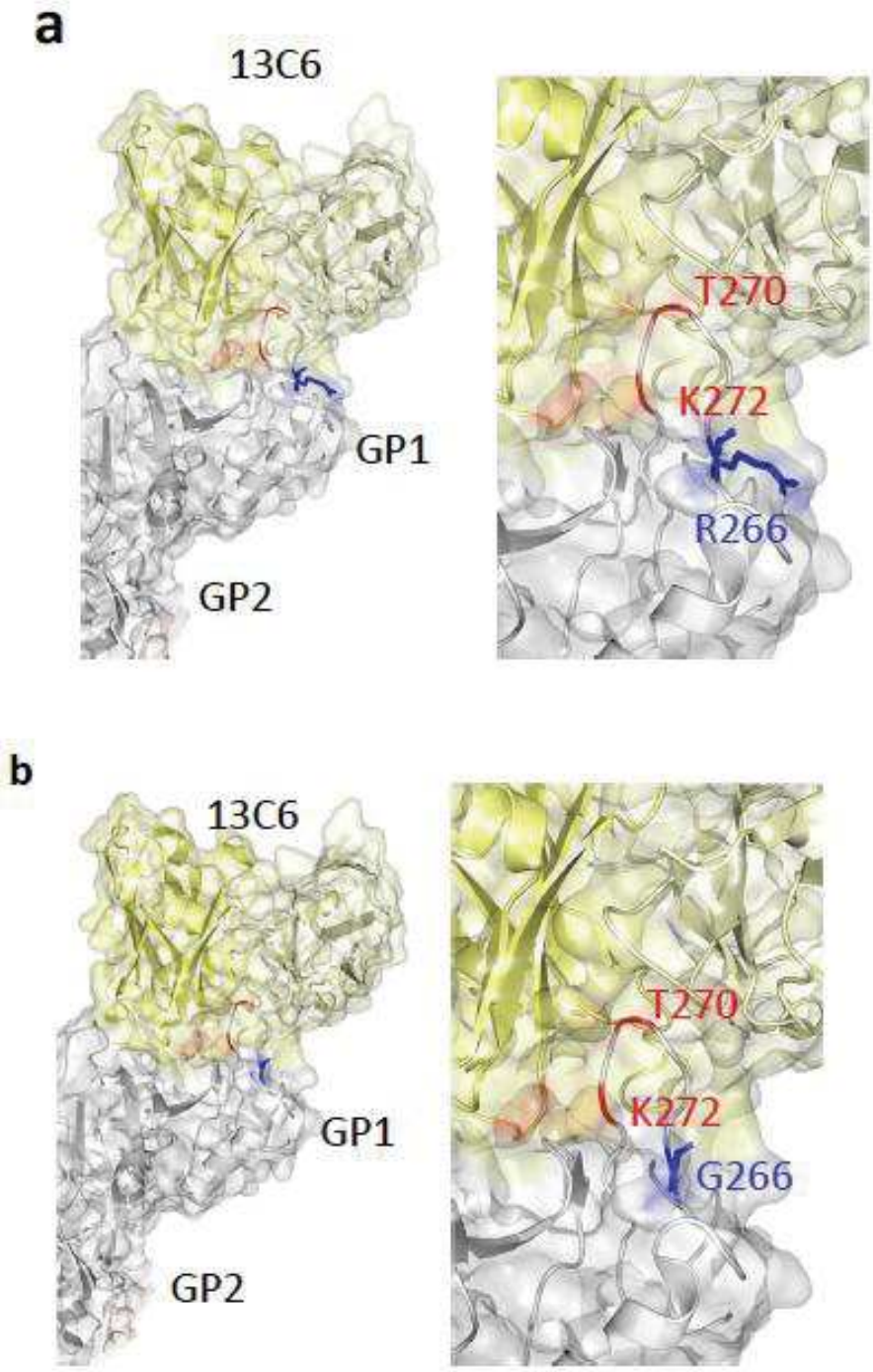


Figure S5. Visualization of EBOV $GP_{1,2}$ in complex with ZMapp component antibody 13C6 (PDB: 5QJ3). GP_1 (grey) of EBOV is shown docked to the heavy chain (dark yellow) and light chain (light yellow) of 13C6. **(a)** Wild-type arginine residue (R) at amino acid position 266 (blue) and amino acids crucial to 13C6 binding, T270 and K272 (red), are all within the gylcan cap (202aa-312aa) of GP_1. **(b)** R266 was mutated to glycine (G) to reflect a SNP detected in EBOV/"Tum" (blue) while residues important for 13C6 binding are in red (T270, K272).

Chapitre 3. Medical countermeasures during the 2018 Ebola virus disease outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces of the Democratic Republic of the Congo: a rapid genomic assessment

Lancet Infect Dis. 2019 Jun;19(6):648-657. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30118-5. Epub 2019 Apr 15.

Editorial comment: Happi A, Ugwu C, Happi C. Preparing for the next Ebola outbreak: in-country genomic capacity in Africa. Lancet Infect Dis. 2019 Jun;19(6): 569-570

Résumé en Français

Contexte

Le 28 juillet 2018, 26 cas suspects de fièvre hémorragique virale ont été signalés parmi lesquels 20 sont décédés, dans la zone de santé de Mabalako dans la province du Nord-Kivu, en RDC, une région frontalière avec l'Ouganda et le Rwanda. Des échantillons provenant de ces cas suspects ont été testés à l'Institut National de la Recherche Biomédicale (INRB) de Kinshasa (RDC), qui a identifié le virus Ebola comme étant l'agent étiologique de cette épidémie. Le 1er août 2018, le ministère de la santé de la RDC a annoncé officiellement la survenue de la dixième épidémie de la maladie à virus Ebola (incluant l'épidémie causée par le Bundibugyo virus à Isiro, en 2012), soit huit jours après la déclaration de la fin de l'épidémie dans la province de l'Équateur. Nous avons installé un laboratoire de séquençage à l'INRB pour évaluer les tests de diagnostic et les contre-mesures médicales, et aussi pour éclairer la surveillance épidémiologique dans le cadre de la réponse à cette épidémie.

Méthodes

Prélèvement des échantillons et Séquençage

Des échantillons provenant de patients suspects de la maladie à virus Ebola depuis juillet 2018 dans les provinces du Nord-Kivu et de l'Ituri ont été traités dans les laboratoires mobiles déployés sur terrain et au laboratoire de l'INRB. Le séquençage du génome complet du virus Ebola a été effectué à l'aide du séquenceur iSeq100 ou MiSeq Desktop (Illumina Technologies, San Diego, Californie, États-Unis), en utilisant le kit KAPA RNA HyperPrep (KAPA Biosystems, Wilmington, Massachusetts, États-Unis) pour la préparation des librairies, suivi d'un enrichissement en TruSeq Exome. Toutes les autres étapes de préparation des librairies, de traitement de données brutes et d'assemblage de ces données sont décrites en annexe. Les premières séquences du virus Ebola de cette épidémie ont été déposées dans la GenBank (numéros d'accès : MK007329-MK007344, MK088510, MK088515 et MK163644-MK163675).

Evaluation des tests de Diagnostic

Au début de l'épidémie en Juillet 2018, l'INRB disposait de plusieurs tests de diagnostic qui ont été utilisés lors de l'épidémie survenue en mai 2018 dans la province de l'Équateur. Parmi ces tests, il y avait des tests de RT-qPCR, notamment : le test Xpert Ebola (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) ciblant simultanément la nucléoprotéine (NP) et la glycoprotéine (GP), un test ciblant la nucléoprotéine (NP) et un autre ciblant le gène polymérase (L). Les séquences d'amorces et de sondes de ces tests moléculaire ont été analysées en les comparant aux séquences du virus Ebola disponibles depuis le début de cette épidémie. Le nombre et la position des disparités pour chaque couple d'amorces et sondes sont précisés et ces données ont été utilisées pour évaluer in silico les tests de diagnostic et les contre-mesures médicales déployés sur terrain.

Confirmation de la liaison des anticorps

Le gène GP du virus Ebola, identifié au cours de cette épidémie dans les provinces du North Kivu et Ituri, a été cloné en utilisant un plasmide exprimant la glycoprotéine ($GP_{1,2}$) de EBOV/Kik, en incorporant les différences observées sur la glycoprotéine ($GP_{1,2}$) durant cette épidémie

(Val003Ala, Glu047Asp, Arg314Gly, Leu368Pro, Pro378Leu, Pro429Thr, Ala432Thr, Thr435Ala, Gly440Ser, Glu457Lys, Lys478Arg, Ala499Thr, and Gly557Arg) (GenBank accession number AAQ55048.1). Ensuite, ce gène a été comparé à la séquence de référence de EBOV Kikwit (EBOV/Kik). Les fragments de gêne GP obtenus ont été assemblés en utilisant NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England Biolabs), puis les séquences ont été confirmées par la méthode de Sanger.

Analyse de l'évolution moléculaire

Nous avons construit une base des données avec un ensemble de séquences en sélectionnant une seule séquence complète de chaque précédente épidémie. Les alignements et l'analyse bayésienne ont été réalisés à l'aide du logiciel BEAST (versions 1.8.4 and 1.10.0) pour générer les arbres phylogéniques par la méthode du maximum de vraisemblance et pour évaluer l'évolution moléculaire.

Résultats

L'analyse des séquences complètes obtenues des premiers échantillons a indiqué que l'épidémie de juillet 2018 au Nord-Kivu était différente de l'épidémie de mai 2018 dans la province de l'Équateur et de tous les variants du virus Ebola décrits précédemment, justifiant l'identification d'un nouveau variant appelé EBOV/«Ituri» (EBOV / «Itu»).

Un réseau d'haplotypes a été généré à partir de 48 génomes de ce variant pour fournir des informations sur les chaînes de transmission. Nous avons identifié deux clusters, le premier comprenait les échantillons de Masimbembe (zone de santé de Mandima) et un échantillon de la zone de santé de Beni, montrant une circulation probable du virus dans la région environ du 27 juillet 2018 au 15 août 2018. Et, le deuxième cluster était constitué des échantillons de Beni et Butembo, indiquant une propagation de la maladie de la ville de Beni vers la ville de Butembo.

Une évaluation in silico des tests de diagnostic et des contre-mesures médicales déployés sur terrain a été réalisée pour détecter les discordances avec les séquences du nouveau variant du virus Ebola de cette épidémie. Pour les trois tests de RT-qPCR déployés lors de l'épidémie

précédente de Mai 2018 dans la province de l'Équateur, aucune disparité n'a été trouvée dans l'analyse du gène L, trois discordances (une dans l'amorce sens, une dans la sonde et une dans l'amorce anti-sens) ont été identifiées dans le test du gène NP, et un seul mésappariement a été trouvé dans l'amorce sens du test GeneXpert Ebola en position 16 à partir de l'extrémité du gène de la nucléoprotéine 3'. Une analyse plus poussée a montré que cette disparité n'affectait pas la détection du virus EBOV / «Itu» par le GeneXpert.

A l'aide de la cytométrie en flux, nous avons comparé la liaison des composants individuels de ZMapp à la glycoprotéine ($GP_{1,2}$) du virus EBOV / «Itu» et à celle de la $GP_{1,2}$ de l'EBOV / Kik de 1995. Les anticorps monoclonaux ZMapp individuels (13C6, 2G4 et 4G7) se sont liés à la séquence EBOV / «Itu» $GP_{1,2}$ avec une efficacité similaire à celle du EBOV / Kik $GP_{1,2}$, indiquant que les anticorps monoclonaux ont reconnu le variant EBOV /''Itu". Cependant, la mutation Gly557Arg a partiellement affecté la liaison de mAb4G7 à la $GP_{1,2}$ d'EBOV / «Itu». Tandis que, l'évaluation in silico du mAb114, l'autre anticorps monoclonal déployé comme traitement sur terrain, n'a montré aucune mutation dans le virus pouvant affecter la liaison de cet anticorps à la GP d'EBOV/«Itu».

Discussion

Nous rapportons les résultats des analyses de séquençage réalisées en RDC et qui ont abouti à l'obtention des deux premiers génomes complets du virus Ebola, puis à la production rapide de plusieurs autres génomes complets à partir des échantillons des patients de l'épidémie de 2018 au Nord-Kivu et Ituri, en RDC. Ces données ont permis d'identifier l'agent étiologique et de confirmer que cette épidémie était épidémiologiquement distincte de la précédente survenue au cours de la même année dans la province de l'Équateur. Les informations obtenues de ces séquences ont été utilisées pour évaluer les tests de détection moléculaire et les traitements à base d'anticorps monoclonaux disponibles et déployés sur terrain. Le séquençage génomique précoce et continu a permis d'orienter les interventions en matière de santé publique, le déploiement de contre-mesures médicales et, de manière rétrospective, de fournir de nouvelles informations sur les chaînes de transmission et l'évolution du virus EBOV.

Medical countermeasures during the 2018 Ebola virus disease outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces of the Democratic Republic of the Congo: a rapid genomic assessment

Lancet Infect Dis. 2019 Jun;19(6):648-657. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30118-5. Epub 2019 Apr 15.

Placide Mbala-Kingebeni[1,2,3]*, Amuri Aziza[1]*, Nicholas Di Paola[4]*, Michael R. Wiley[4,5]*, Sheila Makiala-Mandanda[1,3], Katie Caviness[4], Catherine B. Pratt[4,5], Jason T. Ladner[6], Jeffrey R. Kugelman[7], Karla Prieto[4,5], Joseph A. Chitty[4], Peter A. Larson[4], Brett Beitzel[4], Ahidjo Ayouba[2], Nicole Vidal[2], Stormy Karhemere[1], Mamadou Diop[8], Moussa M. Diagne[8], Martin Faye[8], Ousmane Faye[8], Aaron Aruna[9], Justus Nsio[9], Felix Mulangu[9], Daniel Mukadi[3], Patrick Mukadi[1], John Kombe[9], Anastasie Mulumba[10], Christian-Julian Villabona-Arenas[11], Elisabeth Pukuta[1], Jeanette Gonzalez[4], Maggie L. Bartlett[4,12], Shanmuga Sozhamannan[13,14], Stephen M. Gross[15], Gary P. Schroth[15], Roger Tim[15], Junhua June Zhao[15], Jens H. Kuhn[16], Boubacar Diallo[17], Michel Yao[17], Ibrahima S. Fall[17], Bathe Ndjoloko[9], Mathias Mossoko[9], Audrey Lacroix[2], Eric Delaporte[2], Mariano Sanchez-Lockhart[4,12], Amadou A. Sall[8], Jean-Jacques Muyembe-Tamfum[1,3], Martine Peeters[2$], Gustavo Palacios[4$#], Steve Ahuka-Mundeke[1,3$]

[1]Institut National de Recherche Biomédicale (INRB), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. [2] TransVIHMI, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Montpellier, Montpellier, France. [3] Service de Microbiologie, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. [4] Center for Genome Sciences, United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID), Fort Detrick, Frederick, Maryland, USA. [5] College of Public Health, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA. [6] The Pathogen and Microbiome Institute, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona, USA. [7] Command and General Staff College, Ft Leavenworth, Kansas, USA. [8] Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Senegal. [9] Direction Générale de Lutte contre la Maladie (DGLM), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. [10] Monsieur le Représentant de l'Organisation Mondiale de la Santé, Boîte postale 1899 Kinshasa Gombe, Democratic Republic of the Congo. [11]Centre for the Mathematical Modeling of Infectious Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. [12]Department of Pathology & Microbiology. University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA. [13] Defense Biological Product Assurance Office, Joint Program Manager Guardian, Frederick, Maryland, USA. [14] The Tauri Group, LLC, Alexandria, Virginia, USA; [15] Illumina, Inc., San Diego, California, USA. [16] Integrated Research Facility at Fort Detrick, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Fort Detrick, Frederick, Maryland, USA. [17] World Health Organization, Geneva, Switzerland.

* These authors contributed equally.

$ These senior authors contributed equally.

Summary

Background

The real-time generation of information about pathogen genomes has become a vital goal for transmission analysis and characterisation in rapid outbreak responses. In response to the recently established genomic capacity in the Democratic Republic of the Congo, we explored the real-time generation of genomic information at the start of the 2018 Ebola virus disease (EVD) outbreak in North Kivu Province.

Methods

We used targeted-enrichment sequencing to produce two coding-complete Ebola virus genomes 5 days after declaration of the EVD outbreak in North Kivu. Subsequent sequencing efforts yielded an additional 46 genomes. Genomic information was used to assess early transmission, medical countermeasures, and evolution of Ebola virus.

Findings

The genomic information demonstrated that the EVD outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces was distinct from the 2018 EVD outbreak in Equateur Province of the Democratic Republic of the Congo. Primer and probe mismatches to Ebola virus were identified in silico for all deployed diagnostic PCR assays, with the exception of the Cepheid GeneXpert GP assay.

Interpretation

The first two coding-complete genomes provided actionable information in real-time for the deployment of the rVSVΔG-ZEBOV-GP Ebola virus envelope glycoprotein vaccine, available therapeutics, and sequence-based diagnostic assays. Based on the mutations identified in the Ebola virus surface glycoprotein (GP_1, $_2$) observed in all 48 genomes, deployed monoclonal antibody therapeutics (mAb114 and ZMapp) should be efficacious against the circulating Ebola

virus variant. Rapid Ebola virus genomic characterisation should be included in routine EVD outbreak response procedures to ascertain efficacy of medical countermeasures.

Funding: Defense Biological Product Assurance Office.

INTRODUCTION

On July 28, 2018, the Provincial Health Division of North Kivu, in the northeast region of the Democratic Republic of the Congo, notified national authorities of a cluster of 26 suspected cases of acute viral haemorrhagic fever associated with 20 deaths. All 26 cases were reported from the Mabalako health zone in North Kivu Province (WHO Regional Office of Africa. Ebola Virus Disease, Sitrep 2018) which borders Uganda and Rwanda. Blood, plasma, saliva, and semen samples were diagnostically tested at the Institut National de Recherche Biomédicale (INRB) in Kinshasa (Democratic Republic of the Congo), which identified the aetiological agent as Ebola virus (EBOV; order Mononegavirales, family Filoviridae, genus Ebolavirus, species Zaire ebolavirus). On Aug 1, 2018, the Ministry of Health announced the country's tenth Ebola virus disease (EVD) outbreak (including Bundibugyo virus), 8 days after another EVD outbreak was declared over in Equateur Province (appendix) (Mbala-Kingebeni et al., 2019). The benefits of whole-genome sequencing when applied to outbreak responses have been demonstrated frequently (Baize et al., 2014; Arias et al., 2016; Kugelman et al., 2015) but the ability to apply these sequencing techniques to field settings is relatively new. Historically, diagnostic samples from EVD outbreaks were sent to established genomic facilities, typically overseas, for sequencing. The 2013–16 EVD outbreak in Western Africa—defined according to UN Statistics Division geographical locations—was the first EVD outbreak in which sequencing was a major component of the outbreak response. The first diagnostic samples were sent to Germany for confirmation and sequencing in March 2014 (Baize et al., 2014) with genomes shared on GenBank within 10 days of the start of the outbreak. The establishment of genomic capabilities in-country began with the use of desktop sequencers in Liberia and Sierra Leone (Arias et al., 2016; Kugelman et al., 2015) followed by the deployment of

portable hand-held devices (Quick et al., 2016). By the end of the outbreak, several groups had deployed genomic capabilities to Western Africa, sequencing approximately 1500 samples, which represented 5% of individuals known to be infected by EBOV from the outbreak (Holmes et al., 2016). Once generated, data were used immediately to assess diagnostic assays and medical countermeasures, and inform the public health response. The pre-emptive establishment of in-country genomic capacities, led by local scientists, could reduce the time from sample acquisition to sequence assembly and, therefore, accelerate the generation of actionable data. This capability could also be applied to more complex sequencing activities, such as resistance monitoring of prelicensed therapeutics and vaccines. In this analysis, we used a recently established sequencing capability at INRB (Mbala-Kingebeni et al., 2019) to provide genomic information in real-time for the 2018 EVD outbreak in North Kivu Province of the Democratic Republic of the Congo to assess early transmission, medical countermeasures, and EBOV evolution.

METHODS

Sample collection and sequencing

Blood, plasma, saliva, and semen samples from patients with suspected EVD from the July 2018 outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces were processed at mobile laboratories and INRB (appendix). The study was approved by the Ministry of Health of the Democratic Republic of the Congo, and oral consent was obtained from all patients before sample collection. Amplicon sequencing was done for virus identification using the MinION platform (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) as previously described (appendix) (Mbala-Kingebeni et al., 2019). Complete viral genome sequencing was done using the iSeq100 or MiSeq Desktop sequencer (Illumina Technologies, San Diego, CA, USA) using the KAPA RNA HyperPrep library preparation kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) followed by TruSeq Exome Enrichment, as previously described (Mbala-Kingebeni et al., 2019). A subset of samples was prepared using the Nextera Flex for Enrichment method, which is under development by Illumina Technologies and shared as a research product in accordance with early access agreements (appendix). The method is based on library preparation by a beadlinked transposome, which produces libraries compatible with an additional single enrichment step. This protocol decreased the time from sample acquisition to

assembled EBOV genome from 44 continuous hours (5.5 days with 8 working hours per day) to 28 continuous hours (3.5 days; appendix). For EBOV population reconstruction, we used unique molecular identifiers to calculate the true depth of coverage and MAGERI software to identify ultra-rare variants in sequencing data (appendix) (Shugay et al., 2017). All other library preparation steps, raw read processing, and assembly are described in the appendix. Consensus EBOV genome sequences were deposited in GenBank (accession numbers MK007329-MK007344, MK088510, MK088515, and MK163644-MK163675; appendix).

Genomic and diagnostic analysis

At the start of the July 2018 outbreak, INRB had several diagnostic assays readily available for deployment that had been used during the May 2018 EVD outbreak in Equateur Province: the GeneXpert Ebola Assay (nucleoprotein [NP] and glycoprotein gene [GP] targets; Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) (Pinsky et al., 2015) a modified version of an EBOV NP assay (Weidman et al., 2004) and an assay that targets the EBOV RNA-dependent RNA polymerase (L) gene (de Wit et al., 2016). Primer3 (available in Geneious 11.1.4) was used for in silico analyses of 25 readily available and additional published diagnostic assays (Koressaar et al., 2007). Primer and probe sequences for each molecular assay were mapped to the available EBOV genomes from the EVD outbreak in July 2018. Nucleotide mismatches were manually confirmed by a pairwise alignment. The number and position of mismatches defined for each primer and probe set are shown in figure 18 and the appendix. Since the GeneXpert Ebola Assay is multiplexed, we were able to compare the performance of the assay during the EVD outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces with a previous field evaluation study done during the 2013–16 EVD outbreak in Western Africa (Semper et al., 2016). We calculated and compared the mean difference in Ct values for the NP and GP targets from each outbreak. A median joining haplotype network was estimated (appendix). All data were immediately disseminated to partners involved in the outbreak response and used to test deployed diagnostics and medical countermeasures in silico.

	EBOV gene target	Primer or probe type	Primer or probe sequence	Primer or probe mismatch	Study
GeneXpert_NP	NP	Reverse	CTGTGGCGACTCCGAGTGCAA		Pinsky et al (2015)[10]
		Probe*	TGAGCATGGTCTTTTCCCTCAAC		
		Forward*	GCTCCTTTCGCCCGACTTTTGAA	========T==========	
GeneXpert_GP	GP	Reverse	GGAAGCCCCGAATCCCGT		Pinsky et al (2015)[10]
		Probe	CCTGACGGGAGTGAGTGTCTACC		
		Forward	GGGCTGAAAACTGCTACAATCTTGAAATC		
NP_ENZ_mod	NP	Reverse	AGGACCAAGTCATCTGGTGC	========A==========	Weidmann et al (2004)[11]†
		Probe	CARAGTTACTCGGAAAACGGCAT	========T==========	
		Forward	ATGATGGARGCTACGGCG	==========T=======	
EBOV_L	L	Forward	CAGCCAGCAATTTCTTCCAT		deWit et al (2016)[12]
		Probe 1	ATCATTGGCRTACTGGAGGAGCAG		
		Probe 2	TCATTGGCGTACTGGAGGAGCAGG		
		Reverse‡	TTTCGGTTGCTGTTTCTGTG	=C==================	

Figure 25. Evaluation of deployed diagnostic EBOV assays. EBOV-Ebola virus. *Mismatches occurred in all 48 sequences tested, except where marked, whereby only 42 sequences were tested because the near-complete MAN035 sequences had missing data in the binding region. †An ambiguous base (R) was used to modify the original probe sequences identified in this study. ‡ Mismatches occurred in all 48 sequences tested, except where marked, whereby only MAN028 exhibited the mismatch.

Antibody binding confirmation

The EBOV GP gene from the EVD outbreak in North Kivu Province was cloned by introducing glycoprotein ($GP_{1,2}$) differences identified during the outbreak compared with the reference EBOV Kikwit (EBOV/Kik) isolate (Val003Ala, Glu047Asp, Arg314Gly, Leu368Pro, Pro378Leu, Pro429Thr, Ala432Thr, Thr435Ala, Gly440Ser, Glu457Lys, Lys478Arg, Ala499Thr, and Gly557Arg) into an expression plasmid encoding EBOV/Kik $GP_{1,2}$ (GenBank accession number AAQ55048.1) using site directed mutagenesis with Phusion high-fidelity DNA polymerase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). The resulting GP gene fragments were assembled using the NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England Biolabs), and sequences were confirmed using Sanger

sequencing. The primers used, and transfection and analysis of data are described in the appendix.

Molecular evolution and rate analysis

Additional EBOV sequences were downloaded from GenBank; long stretches of ambiguous bases or sequences derived from experimental infections or constructs were removed. Our initial species-rank dataset included 59 sequences (appendix). We constructed a representative dataset (n=15) by selecting a single sequence (the earliest or most complete) from each EVD outbreak. All alignments, maximum-likelihood trees, root-to-tip regression, and single nucleotide polymorphism analyses were generated as previously described (Mbala-Kingebeni et al., 2019). Clade-level analyses using a fixed local clock were estimated (appendix). For species-rank alignments, Bayesian analysis using BEAST (versions 1.8.4 and 1.10.0; appendix) (Drummond et al., 2007) was used to generate maximum-clade credibility trees. Substitution models, partition schemes, clock, tree priors, and model testing were done as previously described (Mbala-Kingebeni et al., 2019). Monophyly was enforced for all sequences sampled after 1977 to constrain tree topology consistent with previous EBOV studies. We expanded EBOV rooting by repeating the Bayesian procedure done previously, including all available EBOV GP sequences without topology constraints (appendix) (Dudas et al., 2014). Each analysis consisted of up to 1.0 Å~ 10^9 Markov chain Monte Carlo steps (2.5 Å~ 10^8 were discarded as burn-in). Parameters and trees were sampled every 100 000 generations.

Role of the funding source

The funder of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

RESULTS

On July 31, 2018, six patient samples from the Mabalako health zone in North Kivu Province were shipped to INRB for testing, of which four samples were positive for EBOV (Pinsky et al., 2015).

Partial EBOV polymerase cofactor (VP35) gene amplicons were generated for two samples (18FHV090 and 18FHV092) and sequenced using the MinION (Oxford Nanopore Technologies) (17). A phylogenetic tree including other EBOV sequences indicated that EBOV was the causative disease agent in the six patients (figure 19A). Samples 18FHV089 and 18FHV090 (no additional sample remained for 18FHV092) were prepared for sequencing using the Illumina iSeq100 (appendix). The first two coding-complete genomes were obtained on Aug 6, 2018 (Internation Society for Infectious Diseases, ProMED-mail. Ebola update (57): DRC (Nord Kivu), 2018). No differences in VP35 consensus sequences were found using the MinION or Illumina portable sequencing platforms for sample 18FHV090. A phylogenetic tree using coding complete EBOV sequences indicated that the July 2018 outbreak in North Kivu Province was distinct from the May 2018 outbreak in Equateur Province (caused by EBOV/“Tum”) and all previously described EBOV variants, justifying the establishment of a new EBOV variant (figure 19B). Considering current conventions (Kuhn et 2017) and proximity of the EVD outbreak in July 2018 to the Ituri River, we propose to name the variant EBOV/“Ituri” (EBOV/“Itu”).

Samples were processed using the TruSeq RNA Exome and the new Nextera Flex for Enrichment targeted sequencing strategies with custom filovirus probes. The Nextera Flex for Enrichment method shortened the time from sample acquisition to generation of consensus sequences by 16 continuous hours (44 to 28 h, 5.5 to 3.5 days with 8 working hours per day; appendix). On Aug 24, 2018, INRB received 38 samples obtained from 26 patients in the Mandima (Ituri Province) and Mabalako (North Kivu Province) health zones (figure 19C). By Oct 12, 2018, 44 coding complete and four partial viral genomes from 48 patient samples were sequenced with a mean genome coverage of 97.93% (18 572 of 18 965 nucleotides), ranging from 74.22% (14 075 of 18 965 nucleotides) to 99.96% (18 957 of 18 965 nucleotides; appendix). Initial characterisation of the intra-outbreak data identified 45 single nucleotide polymorphisms, including 20 non-synonymous changes (appendix).

The reported index case for the EVD outbreak in North Kivu Province was an individual who resided in Masimbembe (Mangina health zone) (Tilouine et al., 2018). No samples were collected, and the case is only listed as probable. However, the first two coding-complete genomes (18FHV089 and 18FHV090) originated from a group of individuals who had been admitted to

hospital in Mangina. Reports indicate one of the individuals was discharged from hospital and died a few days later at home. A number of family members who cared for the individual developed clinical signs, seven of whom died (WHO Regional Office of Africa. Ebola Virus Disease, Sitrep 2018; International Society of Infectious Diseases, ProMED-mail, Ebola update (60): DRC (Nord Kivu), 2018; Cohen et al., 2018). On Aug 13, 2018, an individual from Mandima in the Mandima health zone of Ituri Province, who was previously admitted to hospital with heart problems, died and was later determined to be EVD positive. By Aug 15, 2018, six additional individuals were confirmed to have EVD in Mandima, demonstrating the spread of EBOV/"Itu" from North Kivu to Ituri Province. Using the 48 genomes, a haplotype network was generated to provide information about the transmission chains (figure 20). Our analysis indicated that samples from Masimbembe (Mandima health zone), and one from the Beni health zone formed the core of a 13-case cluster that circulated in the area from July 27, 2018, until approximately Aug 15, 2018 (figure 20; appendix), which was consistent with previously published reports (WHO Regional Office of Africa. Ebola Virus Disease, Sitrep 2018; Tilouine et al., 2018). The main cluster in the haplotype included one of the earliest samples analysed at INRB (18FHV090), supporting the epidemiological data. However, several probable EVD cases are considered likely to precede the earliest confirmed case, suggesting the outbreak might have started as early as May (WHO Regional Office of Africa. Ebola Virus Disease, Sitrep 2018). The genomic data further supports these hypotheses. In August 2018, an individual residing in Oicha (North Kivu Province) was readmitted to hospital after their partner was confirmed EVD positive after visiting Beni (North Kivu Province) (Nebehay et al., 2018). Retrospective analysis of the individual's medical history revealed clinical signs compatible with EVD that began on July 17, 2018, but the individual had tested negative for EBOV. However, during their readmittance to hospital in mid-August, the individual had an EBOV-positive semen sample (BEN230; figure 20), which provided evidence that EBOV persistence in survivors of EVD is not exclusive to a single variant (ie, EBOV/Mak) (Mate et al., 2015).

Our analysis inferred an EBOV transmission chain from Beni to a cluster of early cases in Butembo (North Kivu Province). These genomes, in addition to several others from Beni, established a second transmission cluster in the haplotype network. The respective EVD cases were detected

after Aug 20, 2018. Several of the cases in Beni were detected in the Ndindi health area, which was a focal point of outbreak response teams during late August. On Sept 4, 2018, an EBOV-positive sample was obtained from an individual who had died in Butembo. The individual was known to have been in close proximity with an EBOV positive individual from the Ndindi health area and fled to Butembo after becoming symptomatic. This was the first EVD case confirmed in Butembo. The attending nurse became the first local case and third fatality on Sept 5, 2018, in Luoto (Butembo) (International Society for Infectious Diseases, ProMED-mail, Ebola update (84): DRC (Nord Kivu), case update, risk health worker. 2018).

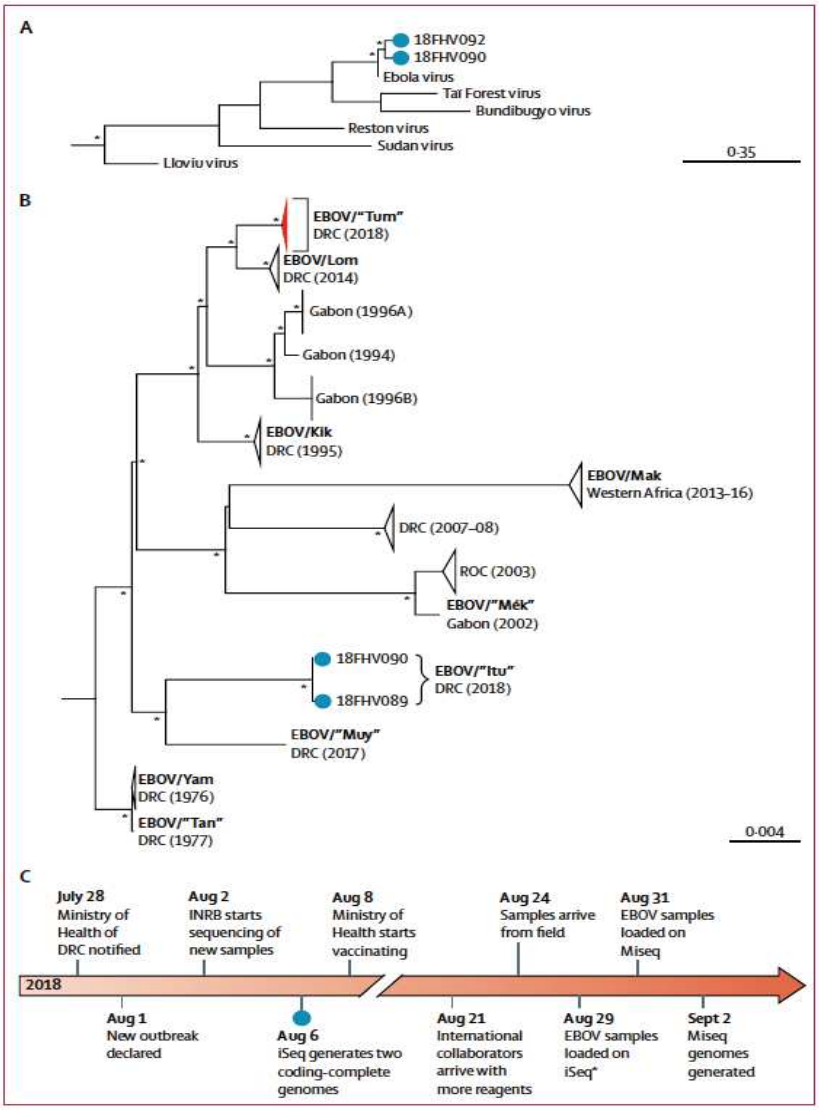


Figure 26. A summary of sequencing and notable events of the 2018 EVD outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces. (A) Maximum-likelihood tree using a 212-nucleotide sequence of the

EBOV VP35 gene showing the most likely Ebolavirus species in two early outbreak samples (blue circles). Asterisks indicate bootstrap support values greater than 70%. Scale is shown as substitutions per site. (B) Maximum-likelihood tree using coding-complete EBOV. Asterisks indicate bootstrap support values greater than 70%. Scale is shown as substitutions per site. (C) Timeline of the real-time response of in-country and international collaborators. The blue circle indicates the timepoint at which the two early outbreak samples were sequenced. EVD-Ebola virus disease. DRC-Democratic Republic of Congo. ROC-Republic of Congo. INRB-Institut National de Recherche Biomédicale. *Consensus sequences were assembled the following day.

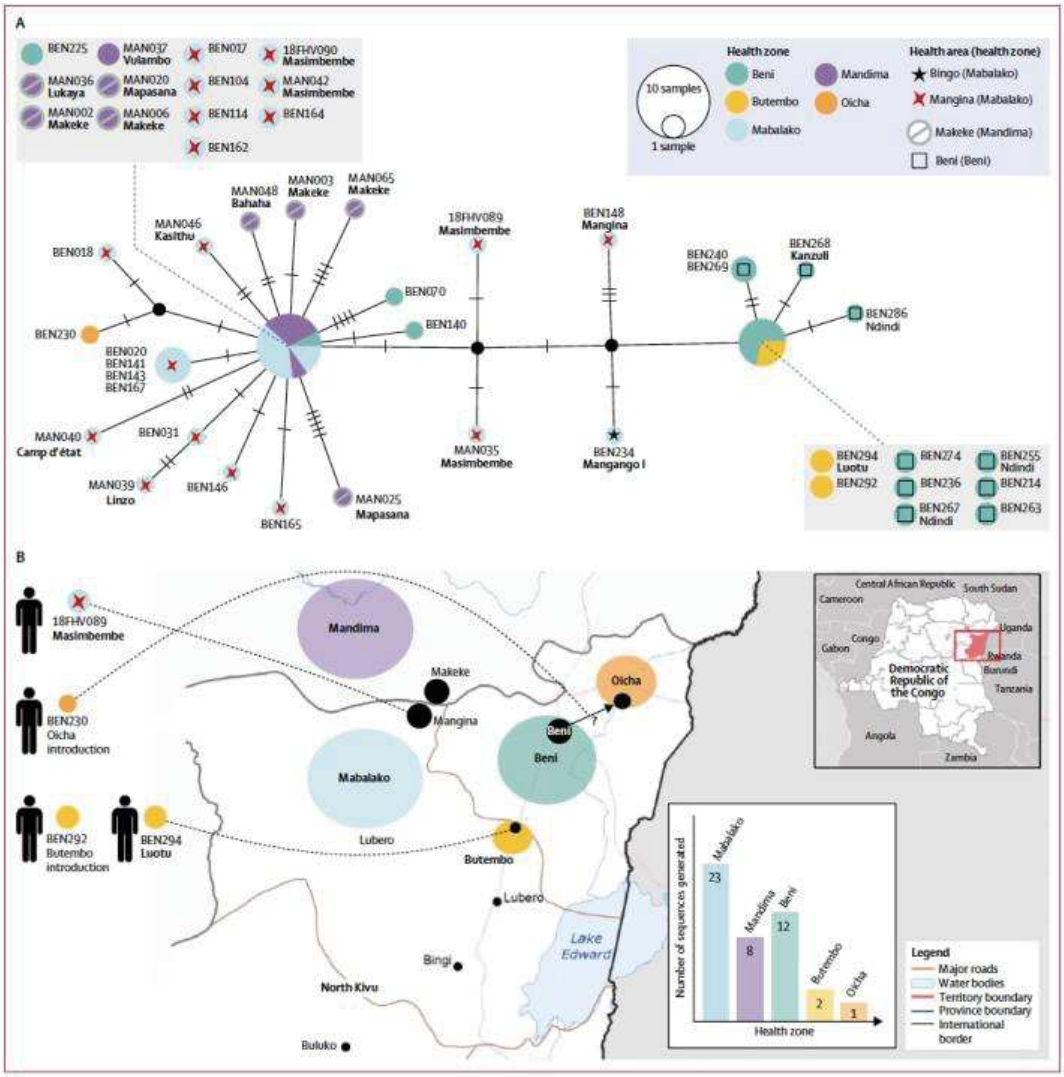


Figure 27. Early transmission analysis of the 2018 EVD outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces. (A) Median-joining haplotype network using 46 EBOV/''Itu''sequences. Genomes are

identified by health zone and health areas within health zones. Available patient villages are shown in bold. (B) Regional map of the Democratic Republic of Congo provinces showing EVD cases of interest in health zones. EVD-Ebola virus disease.

The generation of the first two coding-complete sequences enabled real-time in silico evaluation of available medical countermeasures at the beginning of the outbreak response. The three PCR-based detection assays deployed during the 2018 EVD outbreak in Equateur Province were evaluated for mismatches (Mbala-Kingebeni et al., 2019). These included assays targeting the EBOV L gene (de Wit et al., 2016) the NP gene (Weidman et al., 2004) and the multiplex GeneXpert Ebola assay (Pinsky et al., 2015) which amplifies both NP and GP genes (figure 18). No mismatches were found in the L gene assay, three mismatches (one in the forward primer, one in the probe, and one in the reverse primer) were found in the nucleoprotein assay, and a single mismatch was found in the forward primer of the GeneXpert Ebola assay at position 16 from the 3' nucleoprotein gene end.

We compared the mean difference in Ct values between the NP and GP assay for positive EBOV/"Itu" and EBOV/Mak samples. The mean difference in Ct values between EBOV/"Itu" positive samples was –3.9 cycles (range –7.0 to 4.7), which is comparable to results from a field evaluation of positive EBOV/Mak samples (mean difference –4.1 cycles) (Semper et al., 2016). These results indicated that the single mismatch in the forward nucleoprotein primer of the GeneXpert assay did not affect the detection of EBOV/"Itu". We also evaluated an additional 21 published EBOV detection assays in silico (appendix).

The ZMapp monoclonal antibody cocktail is an experimental therapeutic that was first used to treat patients during the 2013–16 EVD outbreak in Western Africa (Davidson et al., 2015). We compared binding of the individual components of ZMapp to the EBOV/"Itu" $GP_{1,2}$ with that of the 1995 EBOV/Kik $GP_{1,2}$ using flow cytometry.mAb6D8 was used as a positive control since its well defined epitope was not altered in the EBOV/"Itu" $GP_{1,2}$ sequence (appendix). The individual ZMapp monoclonal antibodies (13C6, 2G4, and 4G7) bound to the EBOV/"Itu" $GP_{1,2}$ consensus sequence with similar efficiency to that of the EBOV/Kik $GP_{1,2}$, indicating that the monoclonal

antibodies recognised the EBOV/“Itu” variant. Between Aug 28–31, 2018, downstream sequencing efforts revealed several changes in individual consensus sequences (appendix); none were located in amino acid residues previously found to disrupt the action of ZMapp monoclonal antibodies (Davidson et al., 2015; Audet et al., 2015). However, the Gly557Arg mutation partly affected binding of mAb4G7 to EBOV/“Itu” $GP_{1,2}$(appendix).

mAb114 is a monoclonal antibody therapeutic that was approved for compassionate use in the North Kivu and Ituri Province EVD outbreak. mAb114 protects rhesus monkeys (Macaca mulatta) from disease and death after an otherwise lethal dose of EBOV (Corti et al. 2016; Misasi et al., 2016). EBOV/“Itu” sequences were evaluated in silico for mutations that could alter mAb114 binding, focusing on residues located in the crystal structure interface between EBOV $GP_{1,2}$ and mAb114 (residues 113–121): no non-synonymous changes were found (Misasi et al., 2016).

We sequenced serum samples from five patients before and after mAb114 treatment to evaluate selection pressure on the EBOV population and changes in intra-host EBOV sequence diversity. Two of the patient samples had few EBOV-specific reads, which indicates a low viral load resulting in limited sequence coverage, and thus these two samples were excluded from further analysis. No amino acid changes were detected in the genomes of the three remaining samples. Furthermore, no single nucleotide polymorphisms or minority mutants were identified at residues 113–121 after treatment with mAb114. We evaluated intra-host variation during treatment to identify any treatment-induced changes in the viral population. No changes in diversity were identified after mAb114 treatment, but considering the small sample size, these results should be interpreted with caution (appendix). All five patients made a full recovery.

As the number of EBOV variants identified and characterised increases, broader patterns of EBOV evolution and spatiotemporal relationships can be extrapolated from the available genomic data. Using a single, representative, coding-complete sequence from each EVD outbreak, we observed geographical clustering by phylogenetic lineage (figure 21). The four EVD outbreaks that occurred north of the Congo River in Yambuku, Tandala, Likati, and Beni (2018, EBOV/“Itu”) cluster together. Similarly, to the south of the Congo River, the three northwest outbreaks cluster together (Kikwit, Boende, and Bikoro), as did the two unnamed variants identified further to the

southeast. Moreover, these two clades had evolved independently during at least the past 30–40 years (figure 21; appendix).

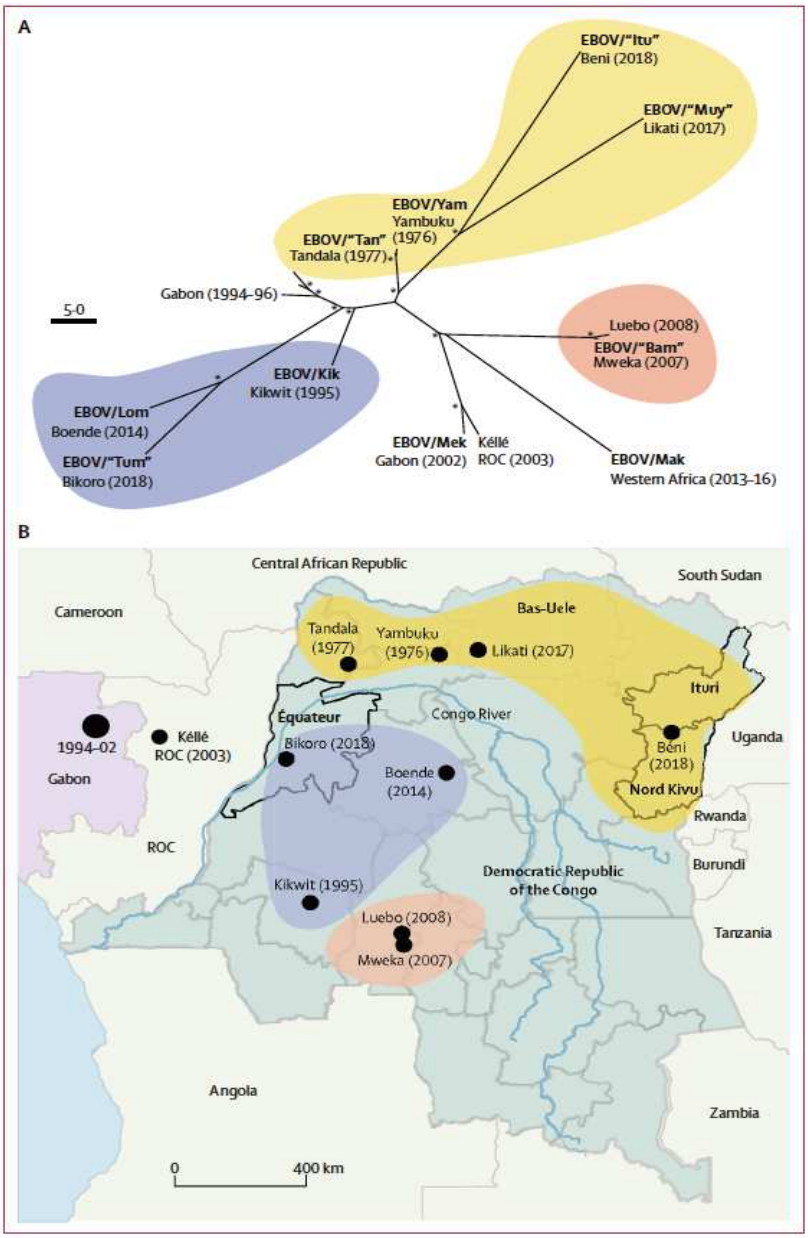


Figure 28. Unrooted maximum-clade credibility tree (A) and scaled map (B) labelled with the cities of EVD outbreaks. Yellow, orange, and blue shading shows Ebola virus variants with geographical proximity. Scale is shown as substitutions per site per year. Asterisks at tree nodes indicate a posterior probability greater then 0.9. ROC-Republic of Congo.

EBOV/“Itu” sequences provided further evidence for lineage-specific rate variability. We did a root-to-tip analysis as an initial assessment of the inter-outbreak substitution rate (figure 22A). Single representative sequences from each outbreak were used to avoid sampling bias, giving each variant equal weight within the analysis. We estimated the substitution rate using data from all EVD outbreaks from Aug 22, 1976, to April 1, 2014, which included EBOV/Mak (slope 0.76 Å~ 10–., correlation coefficient 0.96; figure 22A). Since April 2014, four additional EVD outbreaks have been described, which were caused by EBOV/Lom (August 2014), EBOV/“Muy” (May 2017), EBOV/“Tum” (May 2018), and EBOV/“Itu” (ongoing as of February 2019). EBOV/Lom and EBOV/“Tum” were previously found to evolve at a slower rate than the other EBOV variants (Mbala-Kingebeni et al., 2019; Lam et al., 2015). The inclusion of EBOV/“Muy” and EBOV/“Itu” variants further reduced the estimated rate and linearity of the slope (slope 0.37 Å~ 10–.,correlation coefficient 0.63; figure 22A).

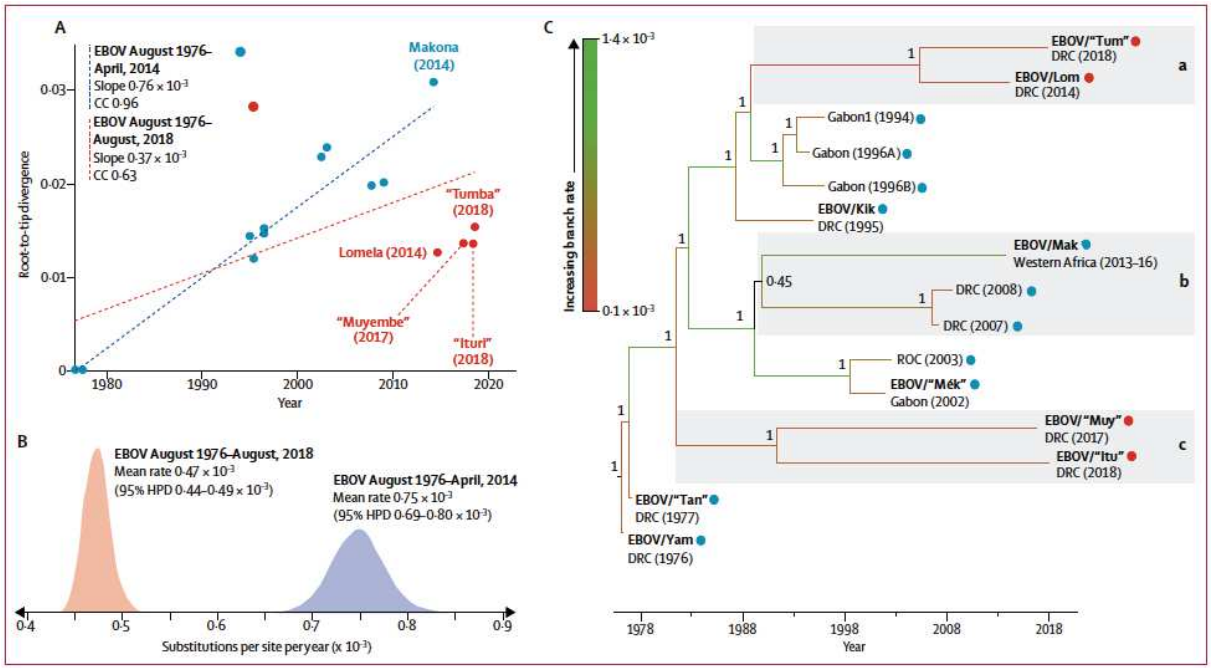


Figure 29. Root-to-tip and Bayesian analysis of inter-outbreak evolutionary rates with addition of EBOV/’’Itu’’ and EBOV/’’Muy’’ variants. Stacked root-to-tip analysis (A) and Bayesian strict clock rate estimate analysis (B) starting with EBOVsequences from August 1976, to April 2018, including EBOV/Mak (n=11; blue) and all four additional representatives as of August 2018, including EBOV/’’Itu’’ (n=15, light red). (C) A Bayesian maximum-clade credibility tree of representative

EBOV sequences (n=15) using an uncorrelated lognormal relaxed clock. Branches are coloured according to relative branch rate. Red circles at node tips correspond to points in the panel A. Posterior probabilities are shown at tree nodes. The tree is scaled by substitutions per site per year. EBOV-Ebola virus. CC-correlation coefficient. HPD-highest posterior density. DRC-Democratic Republic of Congo.

We used a Bayesian approach to assess EBOV inter-outbreak evolutionary rate estimates for previous outbreaks (until April 2014) and current outbreaks (until August 2018) using both strict (figure 22B) and relaxed clocks (figure 22C; appendix). Consistent with our root-to-tip analysis, the addition of EBOV/“Itu” and three other variants significantly decreased the overall inter-outbreak evolutionary rate (August 1976–April 2014, 0.75 Å~ 10–. Substitutions per site per year [95% highest posterior density 0.69–0.80 Å~ 10–.]; August 1976–August 2018, 0.47 Å~ 10–. substitutions per site per year [0.44–0.49 Å~ 10–.; figure 5B]). No significant differences were identified between strict and relaxed clock mean estimates.

The relaxed clock allowed each branch to have a different evolutionary rate, enabling the detection of significant rate variations between EBOV lineages (figure 22C). Notably, the branch rate leading to the EBOV/Mak variant (0.86 Å~ 10–. substitutions per site per year [95% highest posterior density 0.66–1.1 Å~ 10–.]) was higher than the tree’s mean evolutionary rate. Faster rates were also observed in more basal branches leading to the Republic of the Congo and Gabon 2002–03 EVD outbreaks and the earlier Gabon 1994–96 EVD outbreaks, although slower rates were observed along more terminal branches. In contrast, slower-than average evolutionary rates were observed for branches leading to EBOV/“Itu” (0.39 Å~ 10 substitutions per site per year [95% highest posterior density 0.23–0.73 Å~ 10–.]), EBOV/“Muy” (0.33 Å~ 10–. substitutions per site per year [0.18–0.62 Å~ 10–.]), EBOV/“Tum” (0.24 Å~ 10–. substitutions per site per year [0.09–0.41 Å~ 10–.]), and EBOV/Lom (0.27 Å~ 10. substitutions per site per year [0.07–0.55 Å~ 10–.]; figure 22C). EBOV evolutionary rate trends were also confirmed using so-called clade-level fixed local clocks (appendix).

DISCUSSION

Rapid characterisation of coding-complete EBOV genomes was used for the first time during the 2013–16 EVD outbreak in Western Africa to assess medical countermeasures against EBOV and assist epidemiological efforts in real-time (Arias et al., 2016; Kugelman et al., 2015; Quick et al., 2016; Gire et al., 2014). This global effort set a standard for the generation of pathogen genomic data to improve public health responses. We report the findings of an in-country effort that resulted in the real-time sequencing of the first two coding-complete EBOV genomes and the subsequent rapid generation of multiple coding complete EBOV genomes from patients of the 2018 EVD outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces of the Democratic Republic of the Congo. Together, the data identified the aetiological agent and confirmed the outbreak was epidemiologically distinct from the 2018 EVD outbreak in Equateur Province. The information was used to evaluate target erosion effects on available and deployed molecular detection assays and immunotherapeutic antibodies. Early and continuous genomic sequencing helped direct public health responses, deployment of medical countermeasures, and retrospectively provided novel insights into EBOV transmission chains and evolution.

Within 1 week of the EVD outbreak declaration, we assessed the available detection assays. Based on the results, the INRB selected the dual-target GeneXpert Ebola for deployment. The cartridge-based platform provides improved safety compared with other quantitative real-time-PCR assays when working in the mobile laboratory setting, simplicity, and speed of diagnosis. Although a single mismatch was identified in the forward primer in the NP assay, comparisons with previous field assessments of EBOV/Mak were similar. Additionally, the redundancy of the diagnostic assay was a consideration with the deployment of the vesicular stomatitis virus based EBOV vaccine, which expresses the $GP_{1,2}$ protein and could lead to false positives.

We investigated whether available monoclonal antibody immunotherapies (mAb114 and ZMapp) could be used effectively against EBOV/“Itu”. Early in silico analysis of the 12 synapomorphic amino acid changes in the EBOV/“Itu” $GP_{1,2}$ (compared with EBOV/Kik $GP_{1,2}$) and analysis of ZMapp using flow cytometry did not indicate changes in monoclonal antibody binding to $GP_{1,2}$. The $GP_{1,2}$ mutation (Gly557Arg), detected in a single patient, resulted in partly reduced binding

of mAb4G7 (ZMapp component). However, further evaluation is needed to determine if this reduced binding would affect ZMapp efficacy. Our analyses are ongoing as novel EBOV/“Itu” sequences are generated during the outbreak. In that context, generation of highly accurate EBOV genome drafts is desirable (facilitated by earlier establishment and training of local scientists to use the Illumina iSeq and MiSeq) to ensure accuracy of detected single nucleotide polymorphisms. The expedited protocols presented in this study could be used to indicate whether a treated patient with EVD is infected with an EBOV harbouring an escape mutation that disrupts key binding sites in deployed therapeutic monoclonal antibodies—a concept of precision medicine that might now become a reality for outbreak response.

Although we did not have access to mAb114 for in-vitro studies, several patients with EVD were treated and sampled before and after treatment. No single nucleotide polymorphisms (ie, changes to the consensus sequence) or increases in EBOV diversity (minority variant populations >2%) were identified within EBOV $GP_{1,2}$ residues (113–121) at the structural interface with mAb114. The small sample size and low frequency of patient sampling limit the value of these results. Additional sampling from more treated patients during this or future EVD outbreaks will allow evaluation of $GP_{1,2}$ minority variant populations at the intra-host level and provide information about the efficacy of treatment options in the early stages of an outbreak.

With continuous generation of coding complete EBOV/“Itu” sequences, we can further explore EBOV evolution in a broader, evolutionary context. EBOV/“Itu” belongs to a separate phylogenetic clade in addition to the 2017 EBOV/“Muy” sequence from Bas-Uele Province. This clade diverged from the other extant EBOV lineages approximately 30–40 years ago and seems to be endemic to northeastern areas of the Democratic Republic of the Congo. Geographical clustering of closely related EBOV variants is apparent and might help predict which variants are likely to cause outbreaks in specific areas. In this study, elucidating EBOV spread within the Democratic Republic of the Congo was not possible based on current sample diversity.

The apparent differences between EBOV inter-outbreak and intra-outbreak rates have been described (Mbala-Kingebeni et al., 2019; Holmes et al., 2016; Gire et al., 2014; Park et al., 2015). The inclusion of EBOV/“Itu” and EBOV/“Muy” resulted in a slower mean inter-outbreak substitution rate than previously calculated, which could be explained by branch level variability

in evolutionary rate. Our findings indicate that evolutionary rates can vary along lineage branches leading to groups of individual variants regardless of their independent genetic diversity. Analysis of EBOV/“Itu” and other variants provides further support that multiple lineages have reduced substitution rates, and greater rate variability exists among EBOV variants than previously hypothesized (Mbala-Kingebeni et al., 2019; Lam et al., 2015).

A large part of the rapid response was credited to an in-country capacity (Mbala-Kingebeni et al., 2019). Our ongoing international partnership trained local personnel and invested in materials, reagents, and infrastructure to prepare INRB to independently respond, identify, and characterise viral outbreaks. During the ongoing EVD outbreak in North Kivu Province, the concept of initiating real-time genomics at the start of an outbreak was tested in full and led to the generation of actionable information about suitable diagnostics and medical countermeasures.

Contributors

PM-K, AAz, MRW, CBP, KP, OF, ED, MS-L, AAS, J-JM-T, MP, SAM, and GP conceived and designed the study. PM-K, AAz, MRW, SMM, KC, CP, KP, PAL, BB, AAr, NV, SK, MMD, MF, AAg, JN, FM, EP, JP, SS, SG, GPS, RT, AL, JJZ, ISF, BN, MM, and GP collected data. PM-K, ND, MRW, KC, CP, JTL, JRK, JC, CJ-VA, MD, MLB, MS-L, and GP did data analysis. PM-K, ND, MRW, KC, CP, JTL, JHK, MS-L, GP, and SAM wrote the manuscript.

Declaration of interests

Illumina paid the costs for attendance of PM-K at the American Society of Tropical Medicine & Hygiene 2018 conference. MRW reports non-financial support from Illumina during the conduct of the study. All other authors declare no competing interests.

Acknowledgments

This work was supported by the Defense Biological Product Assurance Office through a task order award to the National Strategic Research Institute (FA4600-12-D-9000). We thank Laura Bollinger (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Frederick, MD, USA) for critically editing this manuscript. This work was funded in part through Battelle Memorial Institute’s prime contract with the US National Institute of Allergy and Infectious Diseases under contract number HHSN272200700016I. The content of this Article does not necessarily represent the official policy

or views of the US Department of the Army, the US Department of Defense, the US Department of Health and Human Services, the US Government, or the institutions or companies affiliated with the authors.

Appendix

Real-time Genomic Assessment of Medical Countermeasures during the 2018 Ebola Virus Disease Outbreak in Democratic Republic of the Congo's Nord-Kivu and Ituri Provinces

Placide Mbala-Kingebeni[1,2,3]*, Amuri Aziza[1]*, Nicholas Di Paola[4]*, Michael R. Wiley[4,5]*, Sheila Makiala-Mandanda[1,3], Katie Caviness[4], Catherine B. Pratt[4,5], Jason T. Ladner[6], Jeffrey R. Kugelman[7], Karla Prieto[4,5], Joseph A. Chitty[4], Peter A. Larson[4], Brett Beitzel[4], Ahidjo Ayouba[2], Nicole Vidal[2], Stormy Karhemere[1], Mamadou Diop[8], Moussa M. Diagne[8], Martin Faye[8], Ousmane Faye[8], Aaron Aruna[9], Justus Nsio[9], Felix Mulangu[9], Daniel Mukadi[3], Patrick Mukadi[1], John Kombe[9], Anastasie Mulumba[10], Christian-Julian Villabona-Arenas[11], Elisabeth Pukuta[1], Jeanette Gonzalez[4], Maggie L. Bartlett[4,12], Shanmuga Sozhamannan[13,14], Stephen M. Gross[15], Gary P. Schroth[15], Roger Tim[15], Junhua June Zhao[15], Jens H. Kuhn[16], Boubacar Diallo[17], Michel Yao[17], Ibrahima S. Fall[17], Bathe Ndjoloko[9], Mathias Mossoko[9], Audrey Lacroix[2], Eric Delaporte[2], Mariano Sanchez-Lockhart[4,12], Amadou A. Sall[8], Jean-Jacques Muyembe Tamfum[1,3], Martine Peeters[2$], Gustavo Palacios[4$#], Steve Ahuka-Mundeke[1,3$]

[1] Institut National de Recherche Biomédicale (INRB), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.

[2] TransVIHMI, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Montpellier, Montpellier, France.

[3] Service de Microbiologie, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.

[4] Center for Genome Sciences, United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID), Fort Detrick, Frederick, Maryland, USA.

[5] College of Public Health, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA.

[6] The Pathogen and Microbiome Institute, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona, USA.

[7] Command and General Staff College, Ft Leavenworth, Kansas, USA.

9 Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Senegal.

[9] Direction Générale de Lutte contre la Maladie (DGLM), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo.

[10] Monsieur le Représentant de l'Organisation Mondiale de la Santé, Boîte postale 1899 Kinshasa Gombe, Democratic Republic of the Congo.

[11]Centre for the Mathematical Modeling of Infectious Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK

[12] Department of Pathology & Microbiology. University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA.

[13] Defense Biological Product Assurance Office, Joint Program Manager Guardian, Frederick, Maryland, USA.
[14] The Tauri Group, LLC, Alexandria, Virginia, USA;

[15] Illumina, Inc., San Diego, California, USA.

[16] Integrated Research Facility at Fort Detrick, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Fort Detrick, Frederick, Maryland, USA.
[17] World Health Organization, Geneva, Switzerland

[*] These authors contributed equally.

[$] These senior authors contributed equally.

[#]Corresponding Author: Gustavo Palacios, PhD; Director, Center for Genome Sciences, United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID), 1425ter Street, Room 632, Fort Detrick, Frederick, Maryland 21702, USA; Phone: +1-301-619-8732. Email: gustavo.f.palacios.ctr@mail.mil.

Table of Contents

1. Methods

1.1Ethics Statement

1.2Further details on mobile diagnostic laboratories in the field

1.3Further details on MinION sequencing and bioinformatic methods

1.4Further details about the Nextera Flex for Enrichment methodology

1.5Further details on the identification of single nucleotide polymorphisms and unique molecular identifiers in mAb114-treated patients

1.6Illumina Truseq whole genome sequencing library preparation and bioinformatic analysis

1.7Further details on median-joining haplotype network reconstruction

1.8Further details on tranfection and analysis of antibody binding confirmation *in vitro*

1.9Further details on the phylogeographic analysis using BEAST v1.10.0

1.10 Further details on a Bayesian analysis using a fixed local clock

2. Results

2.1A revisit to Dudas and Rambaut's 2014 EBOV rooting analysis

2.2Further insights into EBOV evolution and spread in Africa

3. References

Tables

Table S1. Information on the 51 EBOV sequences generated during the 2018 EVD Nord- Kivu/Ituri Province outbreak

Table S2. *In silico* evaluation of 27 PCR primer assays from 21 published works showing all mismatches to EBOV/"Itu" sequences

Table S3. Primers used for mutagenesis with EBOV $GP_{1,2}$

Table S4. Ebola virus (EBOV) coding-complete genome sequences used in estimating the phylogenetic tree in Figure 1b

Table S5. Posterior probability and Bayes Factor values generated from the Bayesian stochastic search variable selection (BSSVS) analysis estimating EBOV ancestral migrations in Africa.

Table S6. Position of intra-outbreak nucleotide differences and amino acid changes in EBOV/"Itu" sequences

Table S7. Positions of nucleotide differences and amino acid changes from EBOV/Kik $GP_{1,2}$ (GenBank accession AY354458) to EBOV/"Itu" sequences.

Table S8. Pre- and post-treatment sequencing of mAb114 in four patients

Figures

Figure S1. Histogram of reported EVD cases from Équateur and Nord-Kivu Provinces

Figure S2. Overview of the "Nextera Flex & Fast Enrichment" method

Figure S3. A Bayesian analysis adapted from Figure 7 of Dudas and Rambaut 2014 updated with more recent EBOV $GP_{1,2}$ sequences

Figure S4. The individual ZMapp mAbs 13C6, 2G4, and 4G7 bind to the 2018 Nord- Kivu Province EBOV $GP_{1,2}$

Figure S5. Box and whisker plot of EBOV-positive patients pre- and post-mAb114 treatment

Figure S6. Bayesian-inferred phylogenetic tree using 103 coding-complete EBOV sequences scaled to years

Figure S7. A Bayesian-inferred rate distribution comparison excluding and including novel EBOV variants characterized after April of 2014.

Figure S8. Fixed local clock analysis using the single-representative EBOV dataset.

Figure S9. The spatial-temporal relationships of EBOV migrations in Middle and West Africa

1 Methods

1.1.Ethics Statement

The Ministry of Health (MoH) of the Democratic Republic of the Congo (DRC) approved this study. Oral consent was obtained at the homes of patients or in the Ebola [virus disease] Treatment Units prior to any sample collection by a team, including staff members of the MoH. The de-identified human diagnostic surveillance samples analyzed in this outbreak response project were also reviewed for the applicability of human subjects protection regulations under the project, "Sequencing of Samples in the Democratic Republic of the Congo (DRC)", United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID), Office of Human Use and Ethics Log Number FY18–21.

1.2.Further details about mobile diagnostic laboratories in the field

Mobile laboratories were set up in the field by Institut National de Recherche Biomédicale (INRB) with partners. Six of the samples were part of the first set of specimens collected in Mabalako Health Zone, Nord-Kivu Province, that resulted in the recognition of the Ebola virus disease (EVD) outbreak.[1] An additional 21 samples, collected in the mobile laboratory based in Mangina, were also included in the study. Twelve samples were obtained from the Beni Health Zone (Nord-Kivu Province), and an additional eight samples were obtained from Mandima Health Zone (Ituri Province). Additionally, two samples were obtained from Butembo and one from Oicha. RNA from these samples was extracted using the Qiagen QIAamp viral RNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and used for sequencing. Finally, a clinical isolate from the 2017 Bas-Uele EVD outbreak was also added to the study, with the goal of obtaining a high quality EBOV/"Muy" coding-complete genome sequence for phylogenetic analysis (Genbank accession: MK088515).

1.3.Further details on MinION sequencing and bioinformatic methods

To obtain sequences of the etiological agent of ongoing EVD cases in real-time and in-field, viral RNA was extracted from 140 µl of whole blood collected from four patients confirmed as Ebola virus (EBOV)-positive by Cepheid GeneXpert Ebola assay [2] using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and following manufacturer's instructions. After preparation of cDNA with GoScript Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), amplification of a small fragment of the *VP35* gene was attempted in a semi-nested polymerase chain reaction (PCR) with a modified protocol adapted from He and colleagues.[3] First-round *VP35* PCR-products from positive samples were barcoded and pooled, and sequencing libraries were generated from the barcoded products using the Genomic DNA Sequencing Kit EXP-NBD103/SQK-LSK208 (Oxford Nanopore Technologies [ONT], United Science Park, Oxford, United Kingdom) as previously reported[4]. Phylogenetic analysis of the amplicon data was performed also as previously described.[4] Briefly, base calling of Minion data was performed using the ONT Albacore version 2.1.10. Adapter removal and demultiplexing were achieved with Porechop 0.2.3 (https://github.com/rrwick/Porechop). Consensus sequences were produced by mapping reads using BWA 0.7.17 to an EBOV reference genome (EBOV/May, Genbank accession: NC_002549.1). Variants were called using Nanopolish 0.9.[5] The

generated 212 nucleotide consensus sequence was identical when using an EBOV/"Itu" reference sequence (Genbank accession: MK007330). This was confirmed by aligning both consensus sequences using MAFFT v7.[6] Phylogenetic analyses were done using maximum-likelihood methods with an approximate likelihood ratio test nonparametric branch support based on a Shimodaira-Hasegawa–like procedure using PhyML version 3.1 software.[7] The Hasegawa-Kishino-Yano 85 (HKY85) model plus a discrete gamma (Γ_4) model were used as the nucleotide substitution models.[8]

1.4.Further details about the Nextera Flex for Enrichment methodology

Note: The final protocol in the commercially-released product may differ from the one presented here. Sample RNA was reverse-transcribed by random primed cDNA synthesis using reagents from the Illumina Truseq RNA Access kit (Illumina, San Diego, CA, USA). RNA (8·5 µl) was incubated with 8·5 µl of Elution Primer Fragmentation Mix (EPH) at 65°C for 5 min. For 1st strand synthesis, 8 µl of a 9:1 mix of First Strand Synthesis Act D Mix (FSA) and SuperScript IV Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) were added, and incubated at 25°C for 10 min, 42°C for 60 min, 70°C for 15 min, and cooled to 4°C. For 2nd strand synthesis, 25 µl Second Strand Marking Master Mix (SMM) was added, and incubated at 16°C for 60 min, followed by a clean-up with AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), and eluted in 12 µl of Resuspension Buffer (RSB). Libraries were prepared by tagmentation of 10 µl of cDNA using 10 µl of Nextera Flex for Enrichment bead-linked transposomes (BLTs), 10 µl of Tagmentation buffer 1, and 20 µl of nuclease-free water. Samples were incubated at 55°C for 5 min and 10°C for 2 min. Then, 10 µl of Stop Tagmentation buffer 2 were added and incubated at room temperature for 5 min. Adapter-tagged cDNA attached to the beads were collected against a magnet, supernatant was removed, and 100 µl of Tagmentation Wash Buffer was added. Beads were shaken at 1800 rpm for 2 min, and the wash step was repeated for a total of three washes. Next, 30 µl of PCR master mix and 10 µl of Nextera DNA CD indexes were added to the beads, followed by incubation at 72°C for 3 min, 98°C for 3 min, 15 cycles of 98°C for 20 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 1 min, and then 72°C for 3 min. Libraries were held at 10°C. Libraries were cleaned-up with 90 µl of AMPure XP beads and eluted in 15 µl of RSB. Libraries were enriched for EBOV-specific sequences by hybridizing of biotinylated EBOV probes, capturing of probes on streptavidin magnetic beads, and eluting the enriched library from the probes. Libraries (9 µl) were mixed with 12·5 µl New Hybridization Buffer 1, 2·5 µl of Enrichment Hybridization Buffer 2 and 1 µl of custom EBOV biotinylated probe set. This mixture was incubated at 95°C for 5 min, 95°C for 1 min for the first cycle and decreasing 2°C /cycle for the following 17 cycles, and then 58°C for 90 min. For each hybridization reaction, 62·5 µl of Streptavidin Magnetic beads were mixed with the sample and incubated at 58°C for 15 min. Beads were collected against a magnet, supernatant was removed, and beads were washed with 50 µl of Enrichment Elution Buffer pre-warmed to 58°C, for a total of 4 washes. After the final wash, 5·75 µl of elution buffer and Illumina HP3 (2N NaOH) (19:1 ratio) were added, and beads were resuspended, and incubated for 2 min. Beads were collected against a magnet, and 5·25 µl of supernatant were transferred to new tubes. Elute Target Buffer 2 (ET2, 1 µl) was added to each sample. After enrichment, samples were amplified and then cleaned-up. Then, 1·25 µl of PCR Primer Cocktail Mix (PPC) and 5 µl of Enhanced PCR Mix (EPM) were added to each sample, and samples were incubated at 95°C for 5 min, then 98°C for 10 sec for 17 cycles, 60°C for 30 sec, 72°C for 1 min, followed by 72°C for 5 min. Libraries were held at 4°C. Enriched and amplified libraries were cleaned-up with 22·5 µl of Sample Purification Beads (SPB) and eluted in 32 µl of RSB. Libraries were size-assessed using a high-sensitivity DNA chip on an Agilent Bioanalyzer, and quantified using qPCR. Libraries were pooled at 200 pM with 10% PhiX, before diluting to 60 pM and loading on the Illumina iSeq100 with 2 x 151 paired-end sequencing.

1.5. Further details on the identification of single nucleotide polymorphisms and unique molecular identifiers in mAb114-treated patients

First, we analyzed if single nucleotide polymorphisms (SNPs) occurred in the EBOV consensus sequences after mAb114 treatment. VSALIGN is an in-house software pipeline (USAMRIID, Frederick, MD, USA) that was utilized for pre-processing sequence reads/read pairs to remove low quality data and sequencing artifacts.[9] In this study, VSALIGN removed adaptors, excluded paired ends with a quality score of less than Phred 30, and removed exact PCR duplicate sequences, chimeric reads, and non-viral sequences. All sequencing reads with a quality score of less than Phred 20 were also removed. With the raw data cleaned, reads from the pre-treatment samples (BEN163, BEN164, BEN165, BEN167) were assembled into EBOV consensus genomes. These EBOV consensus genomes were used as references for respective consensus sequences generated at later time points from the same patient. SNPs were manually inspected in Geneious v9.[10] A consensus change is defined here as a change relative to the EBOV reference sequence present in ≥50% of the population. Below that threshold, SNPs were considered subclonal substitutions and part of a minority variant subpopulation of EBOV. For EBOV population reconstruction, we used unique molecular identifiers (UMI) to calculate true depth coverage and MAGERI to identify ultra-rare variants in sequencing data.[11] UMI sequences were first extracted from raw sequencing reads, and UMIs with minimal quality (across the whole length of UMI sequence) of less than Phred 20 were removed. Next, UMIs were grouped and then assembled into coding-complete EBOV consensus sequences that were mapped to corresponding patient reference sequences (Table S8). Variant calling was performed, and MAGERI Q scores were analyzed for any mutations and ultra-low variants in EBOV populations before and after mAb114 treatment (minority variant population ≤2%). We normalized the data and estimated variant diversity by dividing the number of variants found across all EBOV sites by the average true sequencing coverage (Table S8). Additionally, a box and whisker plot was generated to compare if any normalized diversity could be detected between pre- and post-mAb114 treated EBOV population (Figure S5). We advise caution in the interpretation in these results, as there was a limited amount of sampling.

1.6. Illumina Truseq whole genome sequencing library preparation and bioinformatic analysis

RNA sequencing libraries were prepared using the KAPA RNA HyperPrep kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA), with xGen Dual Index UMI Adaptors (Integrated DNA Technologies, Skokie, IL, USA) following manufacturers' guidelines. A total of 20 ng of exogenous human cervical adenocarcinoma (HeLa) cell Total RNA Control (Ambion, Foster City, CA, USA) was spiked into each RNA sample, and then RNA was fragmented at 94°C for 0·5–2 min, depending on sample RNA quality. Following library preparation, the Illumina TruSeq RNA Exome enrichment reagents (using one-quarter quantities to enable singleplex enrichment) were used with a custom EBOV biotinylated probe set. For singleplex enrichment, the quantity of the reagents was reduced to one-quarter of manufacturer's recommendations. The EBOV probe set included 1,897 unique probes of 80-nt in length that were manufactured by Twist Biosciences (San Francisco, CA, USA). These probes enabled enrichment of the library for EBOV-specific sequences[12]. Pooled libraries were sequenced on the Illumina iSeq100 or Miseq sequencing platforms using 2 x 151 bp paired-end sequencing. Analysis of data was performed as previously described[12]. Reads were cleaned using Trimmomatic v0.38[13] and Cutadapt[14] to remove Illumina adaptors and low-quality bases, followed by Prinseq-lite v0.20.4[15] to remove duplicate reads. Reads were analyzed using an in-house pipeline for virus genomes taking single and paired-end reads and performing human genome and human transcriptome read removal

using Bowtie2.[16] To generate EBOV consensus genomes, cleaned reads were assembled *de novo* using SPAdes v3.9.0.[17] Gaps and ends of incomplete contigs were filled in with sequences from the closest available complete genome on Genbank (Ebola virus/H.sapiens-wt/COD/2017/Likati-Muyembe; GenBank #MH481611) and used as a reference to align the clean reads with Bowtie2.[16] As this sequence is associated to a submitted manuscript on Genbank, we obtained written permission prior to its use from a senior author (Dr. Jean-Jacques Muyembe-Tamfum, personal communication). Duplicates were removed with Picard (Broad Institute, Cambridge, MA, USA) and a new consensus sequence was generated using a combination of Samtools v0.1.18[18] and custom scripts (https://github.com/jtladner/Scripts/blob/master/reference-based_assembly/consensus_fasta.py). Only bases with a Phred quality score R20 or better were used for consensus calling. The EBOV consensus genome sequences from the 2017 Likati Province and 2018 Nord-Kivu Province EVD outbreaks were aligned with those from previous Congo River area EVD outbreaks and representative sequences from the Western African EVD outbreak using MAFFT v7.[6] Geneious v7 was used to manually identify intra-outbreak EBOV/"Itu" SNPs. PCR primers deployed and supplemental EBOV PCR assays were also analyzed: ten sets of PCR primers and one of the eight sequencing targets had at least one mismatch across the primers and probe after alignment to the EBOV/"Itu" genomes (Table S2).

1.7.Further details on median-joining haplotype network reconstruction

EBOV/"Itu" sequences with available metadata were analyzed in PopART v1.7.2 (http://popart.otago.ac.nz) using the median-joining haplotype network reconstruction method as previously described.[19]

1.8.Further details on transfection and analysis of antibody binding

Confirmation *in vitro*

Experimental setup including mammalian cell transfection, flow cytometry, and data analysis were performed as previously described.[3] Briefly, Human embryonic kidney derived 293T cells (CRL-3216, ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Corning, NY, USA) with 10% HyClone characterized fetal bovine serum (FBS; GE Healthcare Lifesciences, Pittsburg, PA, USA), 2mM HyClone l-glutamine (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100U/mL penicillin (ThermoFisher Scientific), and 100µg/mL streptomycin (ThermoFisher Scientific). All cells were maintained in a humidified 5% CO_2 atmosphere incubator at 37°C. 293T cells were transfected with plasmids encoding EBOV/Kik $GP_{1,2}$ or EBOV/"Itu" $GP_{1,2}$ using TransIT-LT1 transfection reagent (Mirus Bio, Madison, WI, USA) per manufacturer guidelines. After 24 hours of $GP_{1,2}$ expression, cells were collected and then co-stained with LIVE/DEAD fixable aqua (Invitrogen), a pycoerythrin (PE) conjugated control monoclonal antibody (mAb 6D8, mouse IgG2a), and each one of the allophycocyanin (APC) conjugated ZMapp mAbs (13C6, 2G4, or 4G7, human IgG). All mAbs were conjugated with Zenon antibody labeling kits (ThermoFisher Scientific) that are species- and isotype-specific. After staining, cells were washed and fixed with 1% methanol free formaldehyde (ThermoFisher Scientific), data were collected with the BD LSRFortessa cell analyzer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and analyzed using FlowJo (software version 10.4.2, TreeStar, Ashland, OR, USA). Intact cells were gated using forward scatter (FSC-A) by side scatter

(SSC-A), single cells were gated from the intact cell population using side scatter width by area (SSC-W x SSC-A), and live cells were defined as the population negative for the LIVE/DEAD fixable aqua stain. PE- and APC-positive populations were determined using untransfected 293T cells stained with mAbs as described above.

1.9.Further details on the phylogeographic analysis using BEAST v1.10.0

To infer the historical movement of EBOV across the African continent, we implemented an asymmetric continuous time Markov chain (CTMC) approach using country as a discrete trait.[20] Bayesian stochastic search variable selection (BSSVS) and SpreadD3 (https://rega.kuleuvwn.be/cev/ecv/software/SpreaD3_tutorial) were used to identify strongly supported migrations i.e. any with a Bayes factor ≥5 (Table S5, page 31). Baltic (https://github.com/evogytis/baltic) was used for parsing and visualizing results from BEAST trees (code available at https://github.com/jtladner/Manuscripts/tree/master/vanVuren_SLE-EBOV). For each sampled tree, we identified the number and directionality of all between-country movements (*i.e.*, all tree branches connecting nodes assigned to different countries). All other parameters were the same as described in the main text and in a previous work.[21]

1.10. Further details on a Bayesian analysis using a fixed local clock

A HKY85 + Γ_4 nucleotide substitution model was independently inferred (unlinked) across 3 partitions (codon positions 1 and 2, non-coding, and codon position 3). A non-parametric coalescent 'SkyGrid' model was used as a prior density across trees.[22] Using a fixed local clock to compare branch rates between select lineages to the rest of EBOV (see, for instance, Yang and Yoder, 2000),[23] an uninformative rate prior was used for selected lineages, while an informative prior (normal distribution, mean = $0{\cdot}6 \times 10^{-3}$, stdev = $0{\cdot}01 \times 10^{-3}$) was used for the rest of the tree. We compared three different groups of variants: (i) EBOV/"Itu" and EBOV/"Muy", (ii) EBOV/Mak and Luebo outbreaks, and (iii) EBOV/"Tum" and EBOV/Lom (Appendix Figure S8). All other parameters were unchanged. Tracer v.1.6 [24] was used to ensure run convergence (effective sample size >200).

2 Results

2.1. Revisit to Dudas and Rambaut's 2014 EBOV rooting analysis

With the sequencing and phylogenetic characterization of the EBOV/Mak variant, early EBOV rooting was problematic. A previous study posited that EBOV/Mak could be an endemic EBOV lineage in Western Africa,[25] hence evolving in parallel to the Middle African variants. However, later studies argued for a single common ancestor for recently emerged variants.[21,26,27] For example, Rambaut and Dudas (2014) cautiously argued that a temporal root is the "best-fit" to explain EBOV evolution using several different datasets, one of which including only $GP_{1,2}$ sequences with additional sequences from infected animals.[28]

We attempted to recreate this analysis using additional a few $GP_{1,2}$ sequences from each of the more recent outbreaks in Figure S3. The Bayesian-estimated maximum-clade credibility (MCC) tree supported a single, recent evolutionary lineage for EBOV over two separately evolving EBOV reservoirs. As expected when using a single gene for phylogenetic estimation, the tree's topology is different than that reported in Figure 1b and Figure S6; some branching positions also had very low support (posterior probability). Nevertheless, a single temporal common ancestry is still well supported.

2.2. Further insights into EBOV evolution and spread in Africa

Using a single, representative, coding-complete sequence from each EVD outbreak caused by EBOV, we reconstructed the geographic spread of EBOV over time. At the country-level, we found very strong evidence (Bayes factor = 60, median count = 2) for two movement events from DRC to Gabon (GAB, Appendix Figure S9). Additionally, there is strong support (Bayes factor = 12, median count = 1) for a single movement from GAB to the Republic of the Congo (ROC) and moderate support (Bayes factor = 6, median count = 1) for a single movement from DRC to Western Africa (Guinea). Albeit the historically limited sampling of outbreaks outside the DRC, current evidence suggests that EBOV has been exported on multiple occasions within the last few decades (Figure S9, page 44). Using the same statistical framework, we also performed a spatio-temporal analysis of the EBOV variants within DRC, no signals were confidently reconstructed (Bayes factor <5, median count <1).

3 References

1. WHO. Ebola virus disease. Democratic Republic of the Congo external situation report 01. 2018 http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273640/SITREP_EVD_DRC_2018 0807 eng.pdf?ua=1.
2. Pinsky BA, Sahoo MK, Sandlund J, *et al.* Analytical performance characteristics of the Cepheid GeneXpert Ebola assay for the detection of Ebola virus. *PLoS One* 2015; **10**: e0142216.
3. He B, Feng Y, Zhang H, *et al.* Filovirus RNA in Fruit Bats, China. *Emerg Infect Dis* 2015; **21**: 1675–7.
4. Mbala-Kingebeni P, Villabona-Arenas CJ, Vidal N, *et al.* Rapid Confirmation of the Zaire Ebola Virus in the Outbreak of the Equateur Province in the Democratic Republic of Congo: Implications for Public Health Interventions. *Clin Infect Dis* 2018.
5. Loman NJ, Quick J, Simpson JT. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nat Methods* 2015; **12**: 733.
6. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7 : Improvements in Performance and Usability Article Fast Track. *Mol Biol Evol* 2013; **30**: 772–80.
7. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003; **52**: 696–704.
8. Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 1985; **22**: 160–74.
9. Kugelman JR, Wiley MR, Nagle ER, *et al.* Error baseline rates of five sample preparation methods used to characterize RNA virus populations. *PLoS One* 2017; **12**: e0171333.
10. Kearse M, Moir R, Wilson A, *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; **28**: 1647–9.
11. Shugay M, Zaretsky AR, Shagin DA, *et al.* MAGERI: Computational pipeline for molecular-barcoded targeted resequencing. *PLoS Comput Biol* 2017; **13**: e1005480.
12. Grubaugh ND, Faria NR, Andersen KG, Pybus OG. Genomic Insights into Zika Virus Emergence and Spread. *Cell* 2018; **172**: 1160–2.
13. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; **30**: 2114–20.
14. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 2011; **17**: pp-10.
15. Schmieder R, Edwards R. Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets. *PLoS One* 2011; **6**: e17288.
16. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012; **9**: 357–9.
17. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012; **19**: 455–77.
18. Li H, Handsaker B, Wysoker A, *et al.* The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; **25**: 2078–9.
19. Ladner JT, Wiley MR, Mate S, *et al.* Evolution and Spread of Ebola Virus in Liberia, 2014-2015. *Cell Host Microbe* 2015; **18**: 659–69.
20. Bielejec F, Lemey P, Baele G, Rambaut A, Suchard MA. Inferring heterogeneous evolutionary processes through time: From sequence substitution to phylogeography. *Syst Biol* 2014; **63**: 493-504.

21. Mbala P, Pratt C, Wiley MR, *et al.* Genomic Characterization of the Ebolavirus Disease outbreak near Lake Tumba, Democratic Republic of the Congo, May-July 2018. *Lancet Infect Dis* 2018; **1**: 1-30.
22. Gill MS, Lemey P, Faria NR, Rambaut A, Shapiro B, Suchard MA. Improving Bayesian Population Dynamics Inference: A Coalescent-Based Model for Multiple Loci. *Mol Biol Evol* 2013; **30**: 713–24.
23. Yang Z, Yoder AD. Comparison of likelihood and Bayesian methods for estimating divergence times using multiple gene loci and calibration points, with application to a radiation of cute-looking mouse lemur species. *Syst Biol* 2003; **52**: 705–16.
24. Rambaut A, Drummond AJ, Suchard M. Tracer v1. 6 http://beast. bio. ed. ac. uk. *Tracer (visited on 2017-06-12)* 2014.
25. Baize S, Pannetier D, Oestereich L, *et al.* Emergence of Zaire Ebola Virus Disease in Guinea. *N Engl J Med* 2014; **371**: 1418–25.
26. Gire SK, Goba A, Andersen KG, *et al.* Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* 2014; **345**: 1369–72.
27. Dudas G, Rambaut A. Phylogenetic Analysis of Guinea 2014 EBOV Ebolavirus Outbreak. *PLoS Curr* 2014; **6**: 1–7.
28. Wittmann TJ, Biek R, Hassanin A, *et al.* Isolates of Zaire ebolavirus from wild apes reveal genetic lineage and recombinants. *Proc Natl Acad Sci* 2007; **104**: 17123–7.
29. WHO. Ebola virus disease. Democratic Republic of the Congo external situation report 5. 2018 http://www.who.int/ebola/situation-reports/drc-2018/en/.

Table S1. Information on the 51 EBOV sequences generated during the 2018 EVD Nord-Kivu/Ituri Province outbre

Patient No.	Village	Health Area	Health Zone	Province	Date of Sampling	Date of diagnostic test	Date of Illumina sequencing	GeneXpert NP gene	CT (NP)	GeneXpert GP gene	CT (GP)	S
18FHV012b	Likati			Bas-Uele	1-May-17							KA
18FHV0089	Masimbembe	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	27-Jul-18	1-Aug-18	5-Aug-18	Positive	21.6	Positive	25.0	KA
18FHV0090	Masimbembe	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	28-Jul-18	1-Aug-18	5-Aug-18	Positive	28.3	Positive	30.7	KA iSeq1
18FHV0092	Masimbembe	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu		1-Aug-18						
BEN017	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	3-Aug-18	3-Aug-18	12-Oct-18	Positive	21.1	Positive	25.4	KA
BEN018	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	3-Aug-18	3-Aug-18	12-Oct-18	Positive	20	Positive	24.2	KA
BEN020	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	3-Aug-18	3-Aug-18	12-Oct-18	Positive	17.1	Positive	21.2	KA
BEN031	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	4-Aug-18	4-Aug-18	12-Oct-18	Positive	14.2	Positive	19.3	KA
BEN070	Beni		Beni	Nord-Kivu	6-Aug-18	7-Aug-18	19-Sep-18	Positive	21.2	Positive	25	KA
BEN104	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	8-Aug-18	9-Aug-18	19-Sep-18	Positive	19.3	Positive	23.3	KA
BEN114	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	8-Aug-18	9-Aug-18	12-Oct-18	Positive	27.1	Positive	22.4	KA
BEN140	Beni	Beni	Beni	Nord-Kivu	10-Aug-18	11-Aug-18	19-Sep-18	Positive	22.7	Positive	26.9	KA
BEN141	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	11-Aug-18	11-Aug-18	12-Oct-18	Positive	19.7	Positive	25	KA
BEN143	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	11-Aug-18	11-Aug-18	12-Oct-18	Positive	25.3	Positive	31.4	KA
BEN146	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	11-Aug-18	11-Aug-18	19-Sep-18	Positive	26.1	Positive	30	KA
BEN148	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	11-Aug-18	11-Aug-18	12-Oct-18	Positive	21	Positive	26.5	KA
BEN162	Mangina		Mabalako	Nord-Kivu	11-Aug-18	12-Aug-18	19-Sep-18	Positive	19.9	Positive	26.6	KA
BEN163	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	11-Aug-18	12-Aug-18	19-Sep-18	Positive	21	Positive	27.7	KA
BEN164	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	11-Aug-18	12-Aug-18	19-Sep-18	Positive	26.1	Positive	31.6	KA
BEN165	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	11-Aug-18	12-Aug-18	19-Sep-18	Positive	25.5	Positive	32.5	KA

BEN167	Mangina	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	11-Aug-18	12-Aug-18	19-Sep-18	Positive	24.5	Positive	29.8	K
BEN214	Moratire		Beni	Nord-Kivu	19-Aug-18	20-Aug-18	9-Oct-18	Positive	22.1	Positive	25.9	K
BEN225	Beni		Beni	Nord-Kivu	23-Aug-18	23-Aug-18	12-Oct-18	Positive	21.5	Positive	24.6	K
BEN230	Oicha		Oicha	Nord-Kivu	24-Aug-18	24-Aug-18	12-Oct-18	Positive	35.4	Positive	35.4	K
BEN234	Mangango I	Mangango I	Mabalako	Nord-Kivu	25-Aug-18	25-Aug-18	12-Oct-18	Positive	27.3	Positive	29.9	K
BEN236	Beni		Beni	Nord-Kivu	25-Aug-18	25-Aug-18	9-Oct-18	Positive	17.5	Positive	20.1	K
BEN240	Beni		Beni	Nord-Kivu	25-Aug-18	25-Aug-18	9-Oct-18	Positive	20.8	Positive	23.3	K
BEN255	Beni	Ndindi	Beni	Nord-Kivu	29-Aug-18	29-Aug-18	9-Oct-18	Positive	18.7	Positive	24.2	K
BEN263	Beni		Beni	Nord-Kivu	30-Aug-18	30-Aug-18	9-Oct-18	Positive	21.8	Positive	26.1	K
BEN267	Beni	Ndindi	Beni	Nord-Kivu	31-Aug-18	31-Aug-18	12-Oct-18	Positive	19.5	Positive	23.2	K
BEN268	Beni	Kanzuli	Beni	Nord-Kivu	31-Aug-18	31-Aug-18	12-Oct-18	Positive	20.1	Positive	24.7	K
BEN269	Beni	Ndindi	Beni	Nord-Kivu	31-Aug-18	31-Aug-18	9-Oct-18	Positive	16.7	Positive	21.7	K
BEN274	Beni		Beni	Nord-Kivu	1-Sep-18	1-Sep-18	12-Oct-18	Positive	19.1	Positive	22.9	K
BEN286	Beni	Ndindi	Beni	Nord-Kivu	3-Sep-18	3-Sep-18	9-Oct-18	Positive	22	Positive	25.1	K
BEN292	Butembo		Butembo	Nord-Kivu	4-Sep-18	4-Sep-18	9-Oct-18	Positive	18.6	Positive	22.5	K
BEN294	Butembo		Butembo	Nord-Kivu	5-Sep-18	5-Sep-18	9-Oct-18	Positive	21.7	Positive	23.7	K
MAN002	Makeke	Makeke	Mandima	Ituri	12-Aug-18	12-Aug-18	29-Aug-18	Positive	26.2	Positive	31.2	E
MAN003	Makeke	Makeke	Mandima	Ituri	12-Aug-18	13-Aug-18	29-Aug-18	Positive	20.7	Positive	25.1	E
MAN006	Makeke	Makeke	Mandima	Ituri	12-Aug-18	13-Aug-18	29-Aug-18	Positive	26.6	Positive	29.2	E
MAN020	Mapasanda	Makeke	Mandima	Ituri	13-Aug-18	13-Aug-18	29-Aug-18	Positive	22.0	Positive	26.6	E
MAN025	Mapasanda	Makeke	Mandima	Ituri	13-Aug-18	13-Aug-18	29-Aug-18	Positive	23.2	Positive	28.5	E
MAN028				Nord-Kivu	13-Aug-18	13-Aug-18	29-Aug-18	Positive	22.3	Positive	26.0	E
MAN035	Masimbembe	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	14-Aug-18	15-Aug-18	31-Aug-18	Positive	29.2	Positive	26.8	K

MAN036	Lukaya	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	14-Aug-18	15-Aug-18	31-Aug-18	Positive	23.1	Positive	28.1	K
MAN037	Vulambo	Makeke	Mandima	Ituri	14-Aug-18	15-Aug-18	31-Aug-18	Positive	27.3	Positive	30.1	K
MAN039	Linzo	Linzo	Mabalako	Nord-Kivu	14-Aug-18	15-Aug-18	31-Aug-18	Positive	24.9	Positive	29.4	K
MAN040	Camp d'etat	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	14-Aug-18	15-Aug-18	31-Aug-18	Positive	22.1	Positive	26.5	K
MAN042	Masimbembe	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	14-Aug-18	15-Aug-18	31-Aug-18	Positive	20.1	Positive	25.0	K
MAN046	Kasitu	Mangina	Mabalako	Nord-Kivu	15-Aug-18	15-Aug-18	31-Aug-18	Positive	22.7	Positive	25.5	K
MAN048	Bahama	Makeke	Mandima	Ituri	15-Aug-18	15-Aug-18	31-Aug-18	Positive	27.2	Positive	29.5	K
MAN065	Makeke	Makeke	Mandima	Ituri	16-Aug-18	16-Aug-18	31-Aug-18	Positive	19.5	Positive	23.1	K

Table S2. *In silico* evaluation of 27 PCR primer assays from 21 published works showing all mismatches to EBOV/

Assay Name	EBOV Gene Target	Primer/Probe Type	Primer/Probe Sequence	Primer/Probe Mis
VP24_KGH	*VP24*	Reverse #	CGTCCCGTAGCTTTRGCCAT	
		Forward $	GTCGTTCCAACAATCGAGCG	
ZAI-NP	*NP*	Reverse	GCATATTGTTGGAGTTGCTTCTCAGC	==========T===
		Forward *1 #	GGACCGCCAAGGTAAAAAATGA	===T==========
Kulesh-MGB	*NP*	Reverse	GGATGACTCTTTGCCGAACAATC	
		Probe (F) #	AGGTCTGTCCGTTCAA	========T======
		Forward #	TCTGACATGGATTACCACAAGATC	
NP_ENZ	*NP*	Reverse	AGGACCAAGTCATCTGGTGC	========A=========
		Forward	ATGATGGAAGCTACGGCG	========T======
EboZNP	*NP*	Reverse	AGGAGAGAAACTGACCGGCAT	
		Probe (F)	CATGCCGGAAGAGGAGACAACTGAAGC	
		Forward	TGGAAAAAACATTAAGAGAACACTTGC	
Ebola-MGB-EBOV	*NP*	Reverse	CAAGTCCAAGATGGTCAAGTTCG	
		Forward	ACTCAGAGAGGCTGCCACTG	
L_Zhai	*L*	Reverse	GCTTCACAAAGTGTTTGAACATT	
		Forward #	TATTTTCCATTCAAAAACACTGGG	
L_Panning	*L*	Reverse	ATGTGGTGGGTTATAATAATCACTGACATG	========A=========
		Probe (R) #	CCAAAATCATCACTIGTGTGGTGCCA	
		Forward #	AAGCATTTCCTAGCAATATGATGGT	
L_PanFilo-L3/4	*L*	Reverse	ATAAWARTCACTDACATGCATRTARCA	
		Forward #	GCTAAAGCATTTCCTAGCAATATGATGG	

L_PanFilo-L1/2	*L*	Reverse	TGWGGHGGRYTATAAWARTCACTDACAT	
		Forward	ATCGGAACTTTTCTTTCTCATT	
L_Palacios	*L*	Reverse #	GGTGGTAAAATTCCCATAGTAGTTCTTT	
		Forward	AACACCGGGTCTTAATTCTTATATCAA	======A==========
L_modified-Filo-AB	*L*	Reverse	ATGTGGTGGGTTATAATAATCACTGACATGCAT	========A=========
		Forward	ATCGGAA-TTTTCTTTCTCATTGAAAGA	======C==========
L_GAB-1	*L*	Reverse	GCATATAACACTGTGGGATTG	
		Forward	GAATGTAGGTAGAACCTTCGG	
L_Filo-AB	*L*	Reverse	ATGTGGTGGGTTATAATAATCACTGACATG	========A=========
		Forward	ATCGGAA-TTTTCTTTCTCATT	======C==========
ZebovGP	*GP*	Reverse	AAAGGTGCGTAGCTCAGTTGTG	==A========G======
		Forward	GGCCAACGAGACGACTCAA	
Kulesh-TM	*GP*	Reverse	CAGTCCGGTCCCAGAATGTG	==========A======
		Probe (F)	GCAGCGATGGGGCGGCACATG	
		Forward *2	TTTTCAATCCTCAACCGTAAGGC	======C==========
EBOGP	*GP*	Reverse	CTTTGTGMACATASCGGCAC	
		Probe (F)	CTACCAGCAGCGCCAGACGG	
		Forward	TGGGCTGAAAACTGCTACAATC	
EBO3/4	*GP*	Reverse	TGGAARGCWAAGTCWCCGG	
		Forward	GTTTGTCGKGACAAACTGTC	
EBO1/2	*GP*	Reverse	ACGACACCTTCAGCRAAAGT	
		Forward	TGGGTAATYATCCTYTTCCA	
EBO-GP	*GP*	Reverse #	TTTTTTTAGTTTCCCAGAAGGCCCACT	
		Forward	AATGGGCTGAAAATTGCTACAATC	==========C========
EBOV tNGS	*L*	Reverse #	TCCAGTTTGTTCTGATTATCCCAATT	

VP24	Forward	AGAAGCGGTTCAAGGGCATACACACA	
	Reverse $	CACTGTAAGCCAGCTTCCAAGTTGAC	
VP24	Forward	TTGAGCTAACTCATATATGCTGACTC	
	Reverse $	TCCTCACTGTAAGCCAGCTTCCAAGT	
VP24	Forward	CATATTGAGCTAACTCATATATGCTG	
	Reverse #	GAGTTTGATGTGACTCACAAAGGAAT	
VP24	Forward	GAATCACCGCTGTGGGCATTGAGAGT	
	Reverse #	AACGAACATCACTTTGAGCGCCCTCA	
VP24	Forward	TACACATCCCATACATTGTATTAGGG	=======T==========
VP35	Reverse	AAGATGGTAAAACACTTGGACTCAAA	
	Forward	ATGCTGCTCCACCTGTCATCCACATC	
VP35	Reverse	TTCAAGATGGTAAAACACTTGGACTC	
	Forward	AAGATGCTGCTCCACCTGTCATCCAC	
VP35	Reverse	TTCAGCTTCAAGATGGTAAAACACTT	
	Forward	TCTTCCAAGATGCTGCTCCACCTGTC	

Indicated number of mismatches occured in all 43 sequences tested, except where marked:

*1 only BEN070 exhibited the mismatch

*2 only BEN286 exhibited the mismatch

#only 43 sequences were tested as a single near coding-complete sequence had missing data in the binding region $ only 42 sequence

coding-complete sequences had missing data in the binding region

Table S3. Primers used for mutagenesis with EBOV $GP_{1,2}$. For the first assembly, the indicated primer sets were used to create fragments of EBOV $GP_{1,2}$ containing amino acid mutations identified in the 2018 Nord-Kivu Province EBOV $GP_{1,2}$. The second assembly followed the same method, using the sequence confirmed plasmid from the first assembly as the template. The resulting sequence confirmed EBOV $GP_{1,2}$ plasmid was subsequently used as the template for point mutagenesis of G557R. Codons targeted for mutation are underlined.

Fragment for assembly	Primer (5′–3′)
Assembly01_Fragment01	GGTGGCGGCCGCAAGCTTGGACGGTGACTGCAGAAAAGAC
	TGATAAGGATCCTCGCAATCCCTAGGAGGATTAGGCAAGG
Assembly01_Fragment02	GCTTGCGGCCGCCACCATGGGTGCGACCGGTATCTTGCAG
	CTTGTGCTGATGGTGGCCGGCGTCGTGAGATGGCTCACGG
Assembly01_Fragment03	GCCATCTCACGACGCCGGCCACCATCAGCAC
	ACTGGTATTCGCATTCTCAGTCTTTGGCGTTCCTGCTGCG
Assembly01_Fragment04	GCAGGAACGCCAAAGACTGAGAATGCGAATACCAGTAAA
	GTGTATTGTTATTGCCTGCGGTTTTGGAGTGGTTCTGCGG
Assembly01_Fragment05	CCGCAGAACCACTCCAAAACCGCAGGCAATAAC
	TGGTATTTGTAATCAGCCCGAGCCTCCCGGATGATGCGCT
Assembly01_Fragment06	AGCGCATCATCCGGGAGGCTCGGGCTGATTACA
	CCTTGCCTAATCCTCCTAGGGATTGCGAGGATCCTTATCA
Assembly02_Fragment01	ACCGGGGGGACGGAGGACACGTCGAGAAGCAATC
	GGCAAACCAGCTTATCCACATCAGACACTTGGAGGGTAG
Assembly02_Fragment02	ACCCTCCAAGTGTCTGATGTGGATAAGCTGGTT
	GCTGATATTCTTTGCCCCGTTACTCACTGCCGT
Assembly02_Fragment03	ACGGCAGTGAGTAACGGGGCAAAGAATATCAGC
	TCCAGGCTTGGTTGTAAGAGGCTGAGGGCTTGT
Assembly02_Fragment04	ACAAGCCCTCAGCCTCTTACAACCAAGCCTGGA
	GGTGGTAGCGGGATCGAGCAAATCGGTACTTTTACTGGTATTC
Assembly02_Fragment05	GAATACCAGTAAAAGTACCGATTTGCTCGATCCCGCTACCACC
	GATTGCTTCTCGACGTGTCCTCCGTCCCCCGGT
PointMutagenesis_G557R	CGGGCTGATATGCCGGCTCCGACAGCT
	TCCTGGTTATGCATCAACCCTTCGGTGTATATCCCTTCG

Table S4. Ebola virus (EBOV) coding-complete genome sequences used in estimating the phylogenetic tree in Figure 1

EBOV variant	GenBank accession #	Country	EBOV isolate	Estimated collection date	Included in "single-rep" dataset
Yambuku	AF086833.2	COD	Mayinga	8/15/1976	Yes
Yambuku	KM655246.1	COD	Ecran	8/15/1976	No
Yambuku	KC242801.1	COD	deRoover	8/15/1976	No
"Tandala"	KC242791.1	COD	Bonduni	6/15/1977	Yes
Unnamed	KC242792.1	GAB	Gab280	12/15/1994	Yes
Kikwit	JQ352763.1	COD	9510621	5/4/1995	No
Kikwit	KC242796.1	COD	9510621	5/15/1995	Yes
Kikwit	AY354458.1	COD	Zaire	5/15/1995	No
Unnamed	KC242798.1	GAB	1Ikot	6/15/1996	Yes
Unnamed	KC242795.1	GAB	1Mbie	6/15/1996	No
Unnamed	KC242797.1	GAB	10ba	6/15/1996	No
Unnamed	KC242793.1	GAB	1Eko	6/15/1996	Yes
Unnamed	KC242794.1	GAB	2Nza	6/15/1996	No
"Mèkambo"	KC242800.1	GAB	Ilembe	6/15/2002	Yes
Unnamed	KF113528.1	COG	Kellé	1/15/2003	Yes
Unnamed	KF113529.1	COG	Kellé	1/15/2003	No
"Bamoukamba"	HQ613403.1	COD	M-M	8/31/2007	No
"Bamoukamba"	KC242789.1	COD	4 Luebo	9/15/2007	No
"Bamoukamba"	KC242785.1	COD	0 Luebo	9/15/2007	Yes
"Bamoukamba"	KC242790.1	COD	5 Luebo	9/15/2007	No
"Bamoukamba"	KC242788.1	COD	43 Luebo	9/15/2007	No
Unnamed	HQ613402.1	COD	34-KS	12/31/2008	Yes
Makona	KJ660346.2	GIN	C15	3/17/2014	No
Makona	KJ660348.2	GIN	C05	3/19/2014	Yes
Makona	KJ660347.2	GIN	C07	3/20/2014	No
Makona	KM034551.1	SLE	EM096	5/26/2014	No
Makona	KM034553.1	SLE	G3670	5/27/2014	No
Makona	KM034561.1	SLE	G3683	5/28/2014	No
Makona	KM034562.2	SLE	G3686	5/28/2014	No
Makona	KM233096.1	SLE	G3822	6/15/2014	No

Makona	KM233102.1	SLE	G3829	6/16/2014	No
Makona	KT725268.1	LIB	LIBR10254	10/2/2014	No
Makona	KT725353.1	LIB	LIBR10168	9/20/2014	No
Makona	KR817115.1	LIB	EM_074392	7/25/2014	No
Makona	KR817129.1	LIB	EM_075043	8/22/2014	No
Makona	KR817194.1	LIB	EM_079450	4/1/2014	No
Makona	KR817239.1	LIB	EM_080193	6/29/2014	No
Lomela	KM519951.1	COD	Lokolia	8/15/2014	Yes
Lomela	KR819004.1	COD	Lokolia B11	8/16/2014	No
Lomela	KP271020.1	COD	Lokolia 19	8/20/2014	No
Lomela	KP271018.1	COD	Lokolia 16	8/20/2014	No
"Tumba"	MH733477	COD	BIK009	5/10/2018	Yes
"Tumba"	MH733478	COD	BIK011	5/11/2018	No
"Tumba"	MH733479	COD	BIK016	5/15/2018	No
"Tumba"	MH733484	COD	BIK019	5/15/2018	No
"Tumba"	MH733482	COD	BIK025	5/17/2018	No
"Tumba"	MH733483	COD	BIK026	5/17/2018	No
"Tumba"	MH733485	COD	BIK031	5/18/2018	No
"Tumba"	MH733480	COD	BIK046	5/19/2018	No
"Tumba"	MH733486	COD	BIK039	5/19/2018	No
"Tumba"	MH733487	COD	BIK037	5/19/2018	No
"Tumba"	MH733481	COD	BIK045	5/20/2018	No
"Tumba"	MH733488	COD	BIK053	5/21/2018	No
"Tumba"	MH733489	COD	BIK055	5/22/2018	No
"Tumba"	MH733490	COD	BIK091	5/28/2018	No
"Tumba"	MH733491	COD	BIK137	6/4/2018	No
"Muyembe"	MK088515	COD	18FHV012b	5/1/2017	Yes
"Ituri"	MK007329	COD	18FHV089	7/27/2018	Yes
"Ituri"	MK007330	COD	18FHV090	7/28/2018	No

International Organization for Standardization (ISO) 3166-1 alpha-3 country codes: COD, Democratic Republic of the Congo; COG; Republic of the Congo; GAB, Gabon; GIN, Guinea; SLE, Sierra Leone; LIB, Liberia.

Table S5. Posterior probability and Bayes Factor values generated from the Bayesian stochastic search variable selection (BSSVS) analysis estimating EBOV ancestral migrations in Africa. Strongly supported migrations (Bayes factor ≥5) are shown in bold and italicized. A visual representation is presented in the Appendix Figure S9.

Hypothesized Ancestral Migrations	Posterior probability	Bayes factor
CD➔CG	0.38658376	1.41751688
CD➔GA	***0.96412771***	***60.45264469***
CD➔GN	***0.72545737***	***5.9434965***
CG➔GA	0.45880665	1.90685272
CG➔GN	0.45378453	1.86863976
GA➔GN	0.50316872	2.27795218
CG➔CD	0.5628363	2.89586233
GA➔CD	0.45569772	1.88311393
GN➔CD	0.58495755	3.17009104
GA➔CG	***0.84323807***	***12.09900098***
GN➔CG	0.4408705	1.77352998
GN➔GA	0.42688031	1.67533124

Abbreviations: CD; Democratic Republic of the Congo, CG; Republic of the Congo, GA; Gabon, GN; Guinea.

Table S6. Position of intra-outbreak nucleotide differences and amino acid changes in EBOV/"Itu" sequences

Genome location	Consensus nucleotide	Variant nucleotide	Nucleotide position	No. Sequences w/variant	Amino acid change
3'UTR	A	G	24	2	
3'UTR	A	G	248	1	
NP	G	A	1,248	1	R->Q
NP	C	T	1,279	1	
NP	T	G	2,002	1	S->R
NP	A	C	2,108	12	N->H
NP	A	G	2,158	2	
NP	A	C	2,264	1	N->H
VP35	T	G	3,362	13	I->M
VP35	G	A	3,407	1	
non-coding	G	A	4,220	1	
non-coding	A	G	4,284	1	
VP40	T	C	4,574	1	
VP40	T	C	4,577	1	
non-coding	T	G	5,992	1	
GP	T	C	6,704	1	
GP	A	G	6,840	1	N->D
GP	A	C	7,179	1	K->Q
GP	T	C	7,244	3	
GP	G	A	7,707	1	G->R
GP	A	G	7,788	1	I->V
GP	T	C	7,865	2	
non-coding	T	C	8,221	1	
non-coding	T	A	8,261	1	
VP30	G	A	8,588	1	A->T
VP30	C	T	8,813	1	
non-coding	G	A	9,539	1	
non-coding	C	T	9,607	1	
non-coding	A	G	9,989	1	
VP24	T	C	11,067	1	L->S
L	T	C	11,977	1	
L	G	A	12,655	11	
L	A	C	13,883	1	N->H
L	A	G	14,414	1	M->V
L	T	C	14,659	1	
L	A	G	14,783	1	T->A
L	T	A	15,148	1	D->E
L	C	-	15,562	1	
L	A	G	16,238	1	T->A

L	A	G	16,538	1	K->E
L	G	T	16,584	1	S->I
L	T	C	16,591	1	
L	A	G	17,727	1	D->G
L	T	C	17,868	1	I->T
5'tail	A	C	18,764	1	

,0, **Table S7.** Positions of nucleotide differences and amino acid changes from EBOV/Kik $GP_{1,2}$ (GenBank accession AY354458) to EBOV/"Itu" sequences.

Nucleotide position	Nucleotide change	Amino acid position	Amino acid change	Genome with change	Mutant tested against ZMapp mAbs
8	T -> C	003	V->A	All	Yes
21	G -> A				
141	G -> T	047	E->D	All	Yes
153	G -> A				
159	C -> T				
489	C -> T				
642	T -> C				
663	A -> G				
696	T -> C				
723	C -> T				
795	A -> G				
802	A -> G	268	N->D	BEN070	No
940	A -> G	314	R->G	All	Yes
993	G -> T				
1,103	T -> C	368	L->P	All	Yes
1,133	C -> T	378	P->L	All	Yes
1,143	A -> G	381	K->Q	MAN065	No
1,167	C -> T				
1,206	T -> C				
1,285	C -> A	429	P->T	All	Yes
1,294	G -> A	432	A->T	All	Yes
1,303	A -> G	435	T->A	All	Yes
1,318	G -> A	440	G->S	All	Yes
1,320	T -> C				
1,323	C -> T				
1,336	C -> T	446	P->S	BEN297	No
1,369	G -> A	457	E->K	All	Yes
1,433	A -> G	478	K->R	All	Yes
1,467	C -> T				
1,491	G -> A				
1,495	G -> A	499	A->T	All	Yes
1,641	G -> A				
1,669	G -> A	557	G->R	MAN046	Yes
1,743	C -> T				
1,750	A -> G	584	I->V	BEN286	No
1,827	T -> C				
1,950	A -> G				

Table S8. Pre- and post-treatment sequencing of mAb114 in four patients. The use of UMIs enabled the calculation of average sequencing true depth, which removed read duplicates and artificial sequencing errors. Average sequencing true depth and the number of minority population variants were normalized to estimate EBOV population variant diversity before (pre) and after (post) mAb114 treatment.

Sample ID	Average sequencing True depth	No. of variants[#]	Diversity (True depth/No. of variants)	Day*	Treatment status
BEN163	2.43	5	0.486	1	Pre
MANA2-13	3.93	7	0.561	3	Post
MANA2-16	35.13	30	1.171	6	Post
MANA2-20	0.81	1	0.805	9	Post[&]
BEN164	20.03	21	0.954	1	Pre
MANA1-13	398.74	86	4.637	3	Post
MANA1-16	7.41	20	0.371	6	Post
MANA1-17	227.77	61	3.734	7	Post
BEN165	0.00	0	–	1	Pre[&]
MANA3-12	0.09	0	–	2	Post[&]
MANA3-16	0.79	1	0.794	6	Post[&]
MANA3-20	222.82	48	4.642	10	Post
BEN167	20.86	35	0.596	1	Pre
MANA5-14	88.23	77	1.146	4	Post
MANA5-16	1.33	2	0.663	6	Post[&]
MANA5-20	0.03	3	0.010	10	Post[&]

The number of EBOV minority variant mutations that differed from the corresponding reference sequence in any of the 18,966 EBOV positions.

* Time-points refer to the first day of patient diagnosis with EBOV. For instance, Day 1 is the first pre-treatment sample that was collected on August 12. The first post-treatment time-point is sampled on Day 3 (August 14). As calendar days may differ between patients, a numerical day (value > 0) allowed for easier statistical comparisons.

& Samples had a depth of less than 3, and were not considered when estimating statistical differences between pre- and post-treatment groups

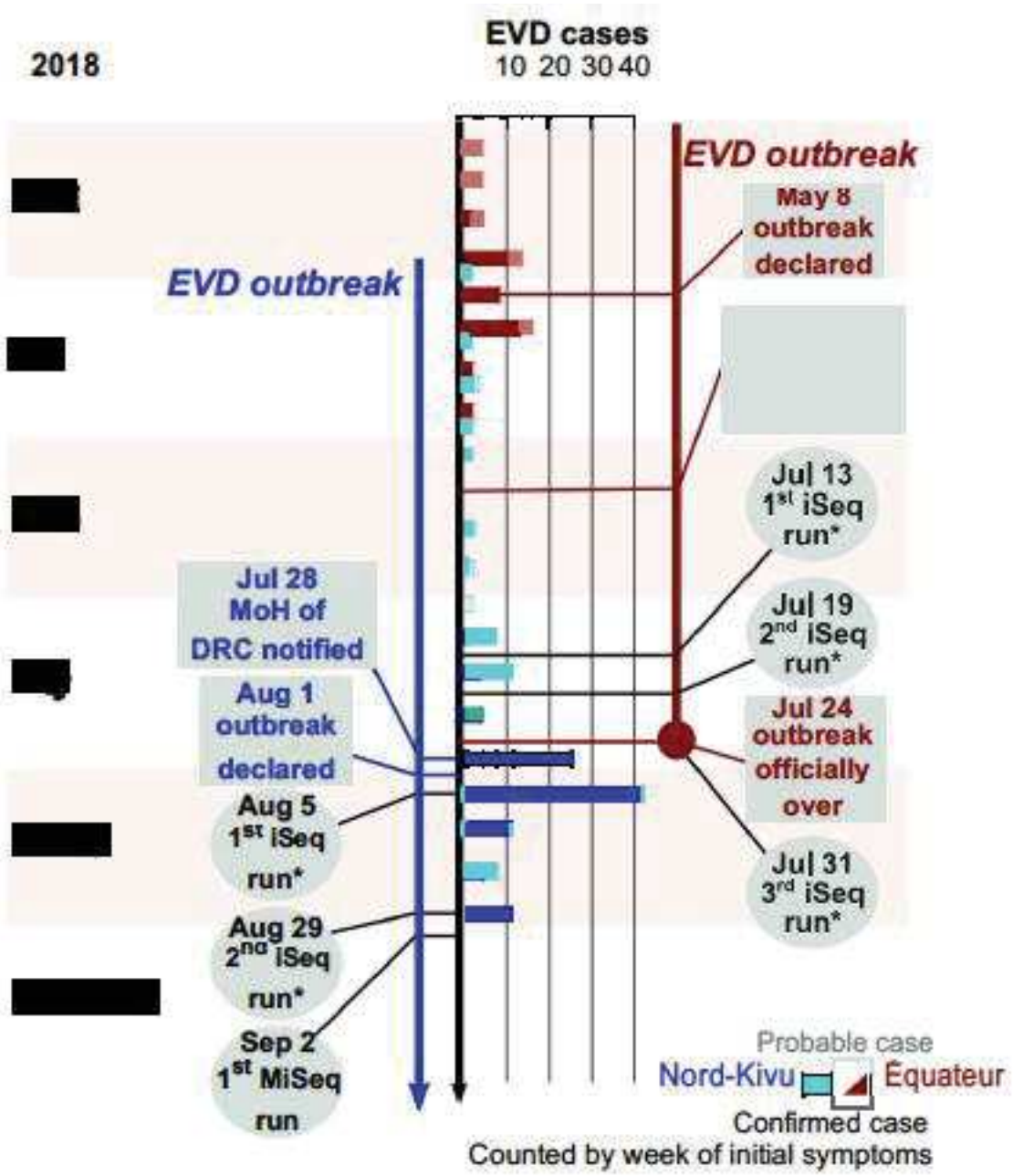


Figure S1. A histogram (n = 118) showing the temporal and epidemiological overlaps of EVD outbreaks: illness onset (darker color: confirmed cases) of the Équateur (red) and Nord-Kivu/Ituri (blue) Provinces are shown. The epidemiological data correspond to the 5th Situation Report (SITREP) released by the World Health Organization on September 6th.[26] The asterisk (*) denotes that consensus sequences were generated on the following day.

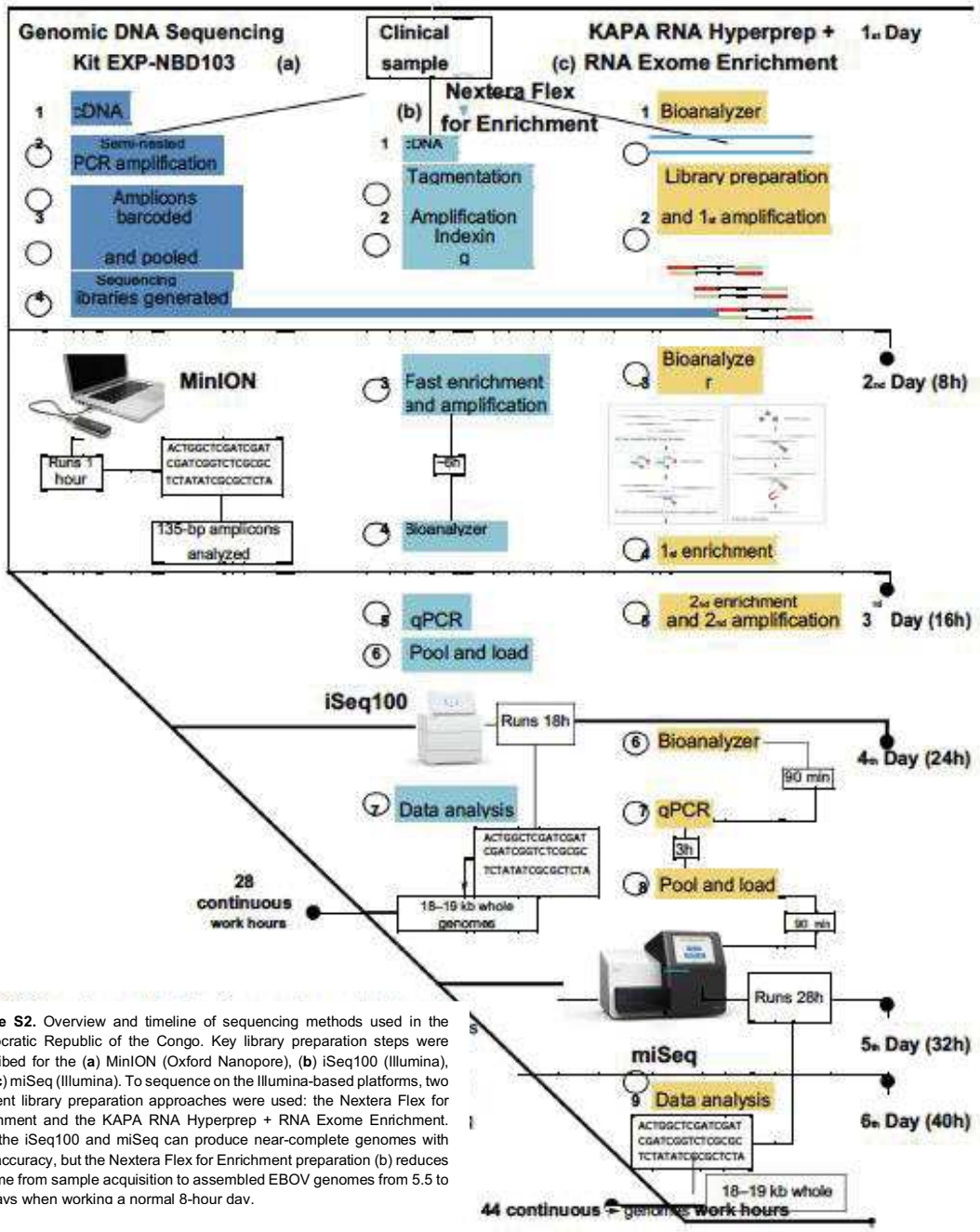


Figure S2. Overview and timeline of sequencing methods used in the Democratic Republic of the Congo. Key library preparation steps were described for the (**a**) MinION (Oxford Nanopore), (**b**) iSeq100 (Illumina), and (**c**) miSeq (Illumina). To sequence on the Illumina-based platforms, two different library preparation approaches were used: the Nextera Flex for Enrichment and the KAPA RNA Hyperprep + RNA Exome Enrichment. Both the iSeq100 and miSeq can produce near-complete genomes with high accuracy, but the Nextera Flex for Enrichment preparation (b) reduces the time from sample acquisition to assembled EBOV genomes from 5.5 to 3.5 days when working a normal 8-hour day.

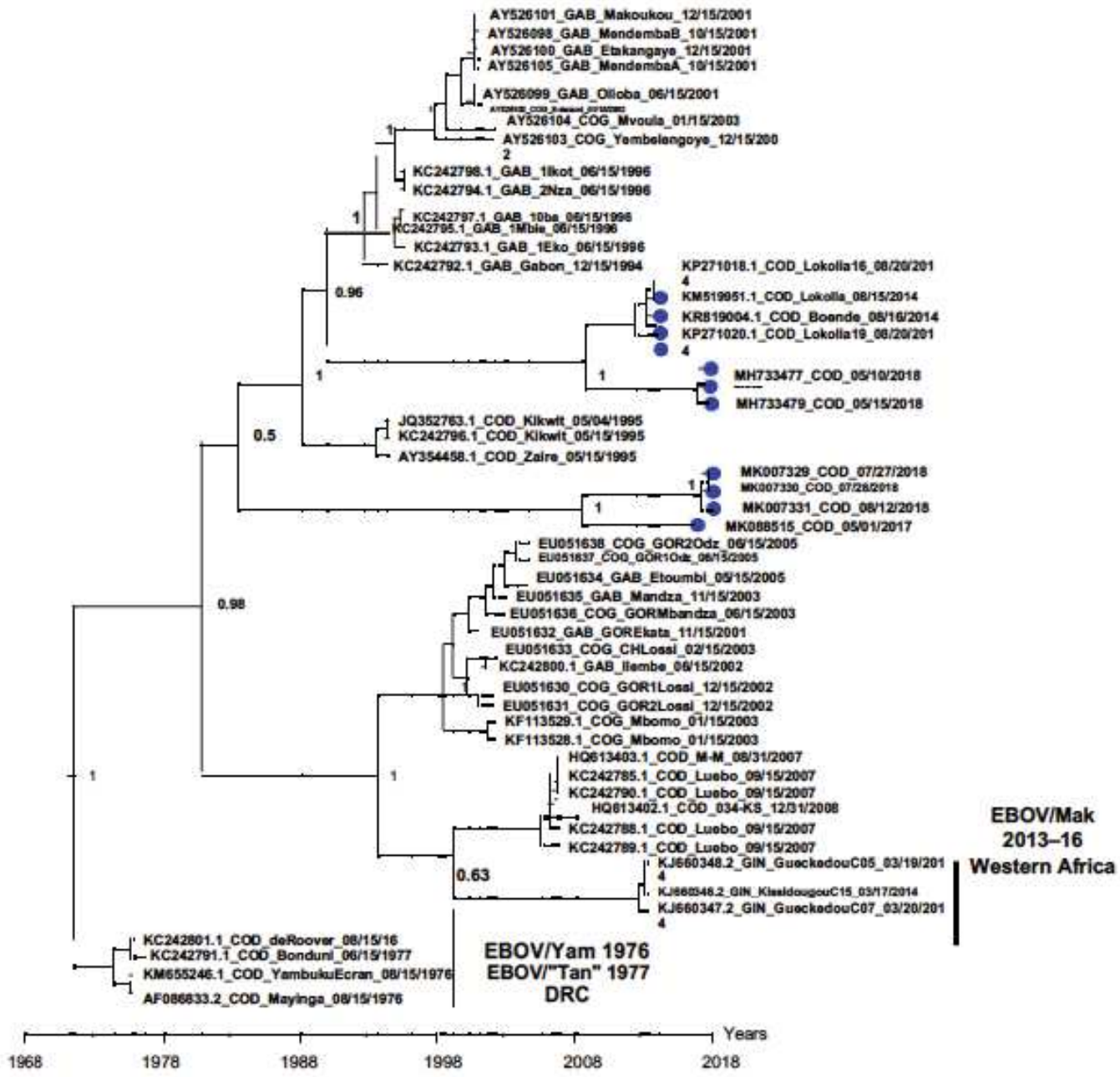


Figure S3. A Bayesian-inferred maximum-clade credibility (MCC) tree using only glycoprotein ($GP_{1,2}$) sequences adapted from Figure 7 of Dudas and Rambaut (2014)[26] that was updated with more recent EBOV $GP_{1,2}$ sequences (blue circles). Posterior probability for major nodes are shown; low posterior values were bolded for clarity. After adding sequences from more recent EVD outbreaks (those after April 2014), we used a GTR+Γ_4 substitution model, an uncorrelated relaxed molecular clock with an uninformative continuous time Markov chain (CTMC) rate prior and a constant tree prior. Using Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees (BEAST) 1.8.4, the run easily converged (Effective Sample Size > 200), tree height (~48 years) and rates remained consistent with previous results (mean rate: 0.6×10^{-3}, 95% highest posterior density: $0.4–0.8 \times 10^{-3}$).

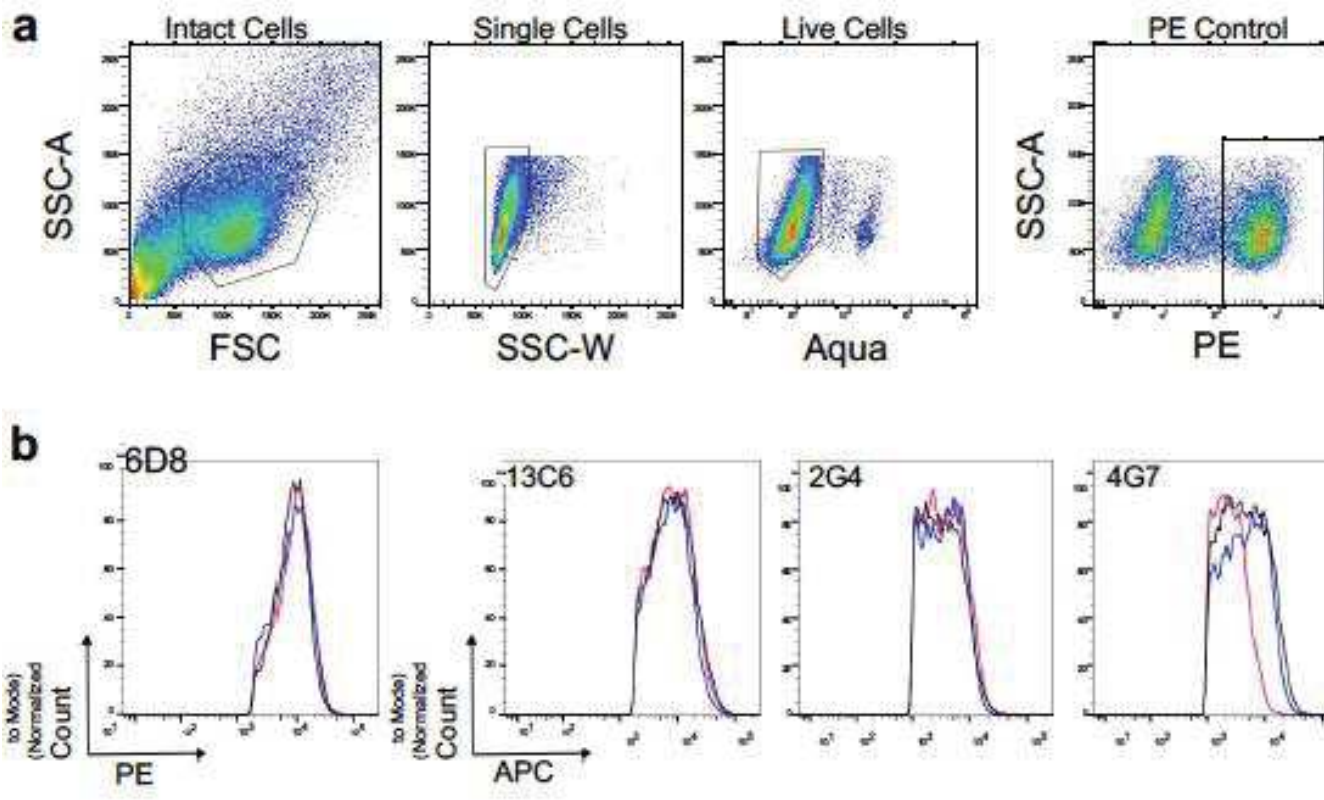


Figure S4. The individual ZMapp mAbs 13C6, 2G4, and 4G7 bind to the 2018 Nord-Kivu F
Gating strategy used for flow cytometry analysis. First, intact cells were gated using forward
(SSC-A), then from the intact cell population, single cells were defined using side scatter area
W), and live cells were defined as intact, single, cells negative for the LIVE/DEAD Fixable A
Phycoerythrin (PE) and allophycocyanin (APC) positive populations were defined by comparing
with cells transfected with EBOV/Kik $GP_{1,2}$. **(b)** Binding of individual therapeutic mAbs. The mA
PE and used as a positive binding control. The mAbs 13C6, 2G4, and 4G7 were individually
their binding to the 2018 EBOV/"Itu" $GP_{1,2}$ was compared to binding to EBOV/Kik $GP_{1,2}$. Binding
the 2018 EBOV/"Itu" $GP_{1,2}$ with a single additional point mutation, G557R (pink).

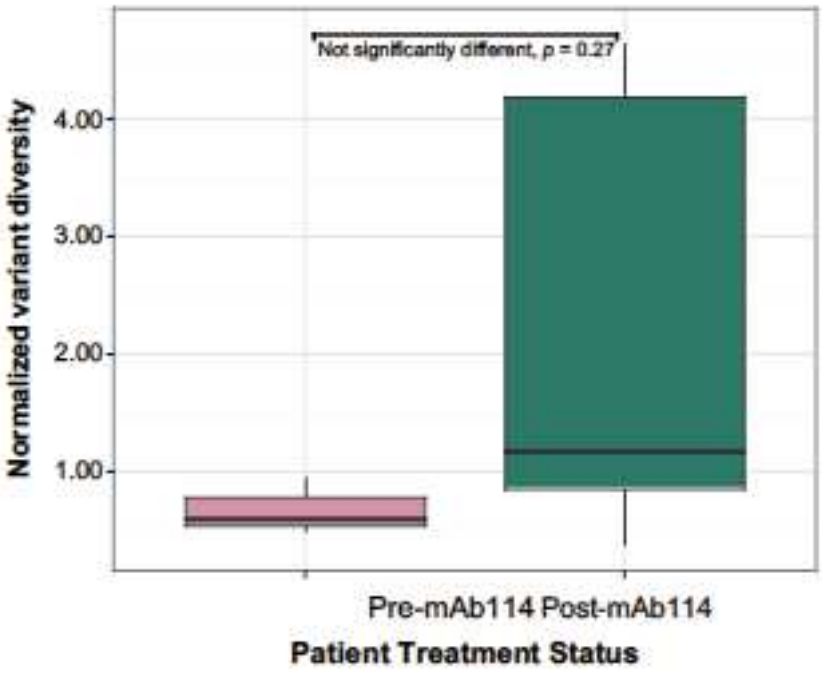


Figure S5. Box and whisker plot of EBOV-positive patients pre- and post-mAb114 treatment. Samples were included if the average sequencing true depth >3. No significant difference was found between pre- and post-mAb114 treatment normalized EBOV minority variant populations (Wilcoxon rank sum test, $p = 0.27$).

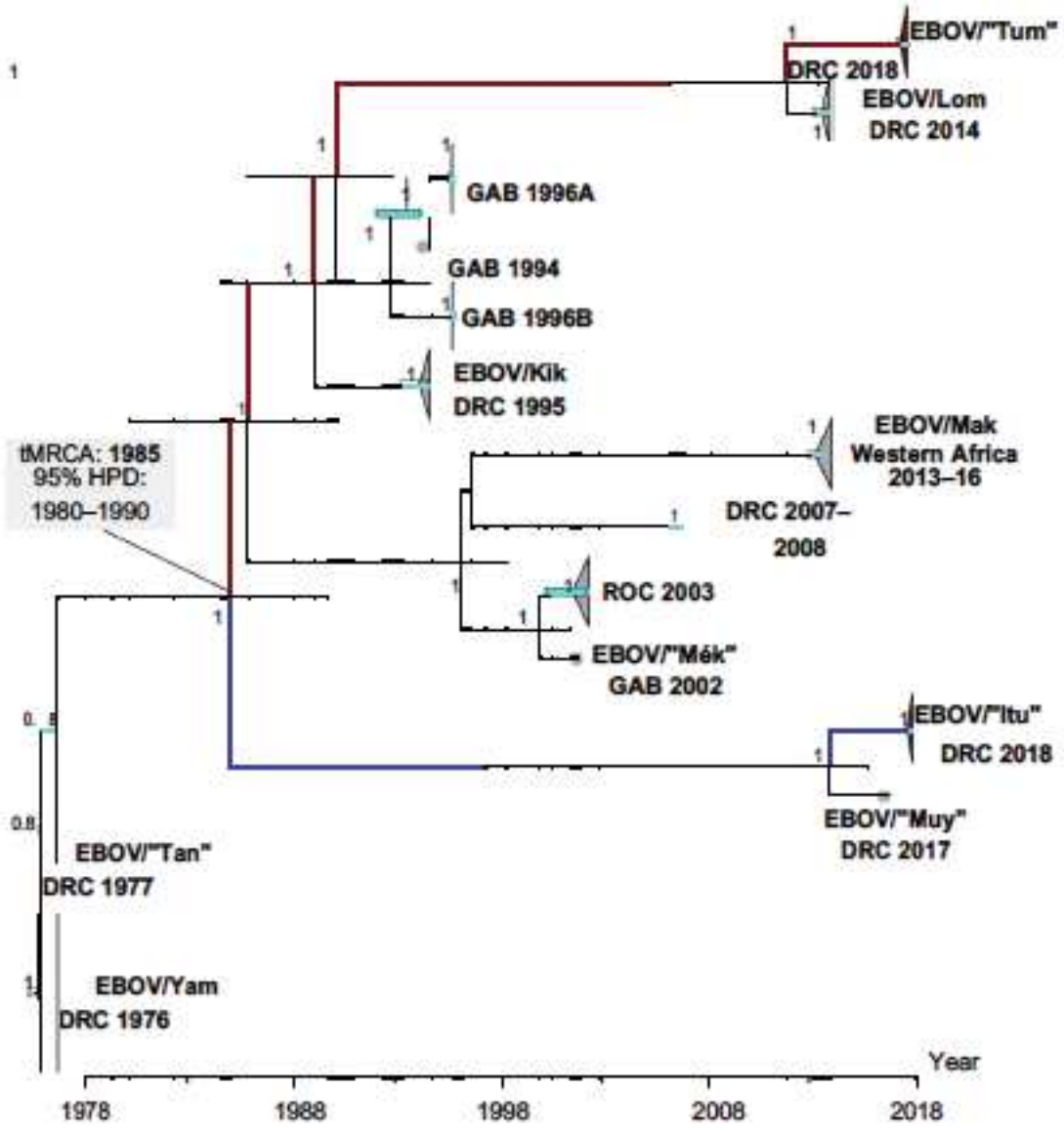


Figure S6. A Bayesian-inferred maximum-clade credibility (MCC) tree of 103 near-complete EBOV sequences using an uncorrelated lognormal relaxed molecular clock. Posterior probabilities greater than 0.7 are shown at nodes. Tree is scaled by substitutions per site per year. Node bars showing the 95% highest posterior density (HPD) of estimated nodes. The time to the most recent common ancestor (tMRCA) for EBOV/"Tum" and EBOV/"Itu" is shown.

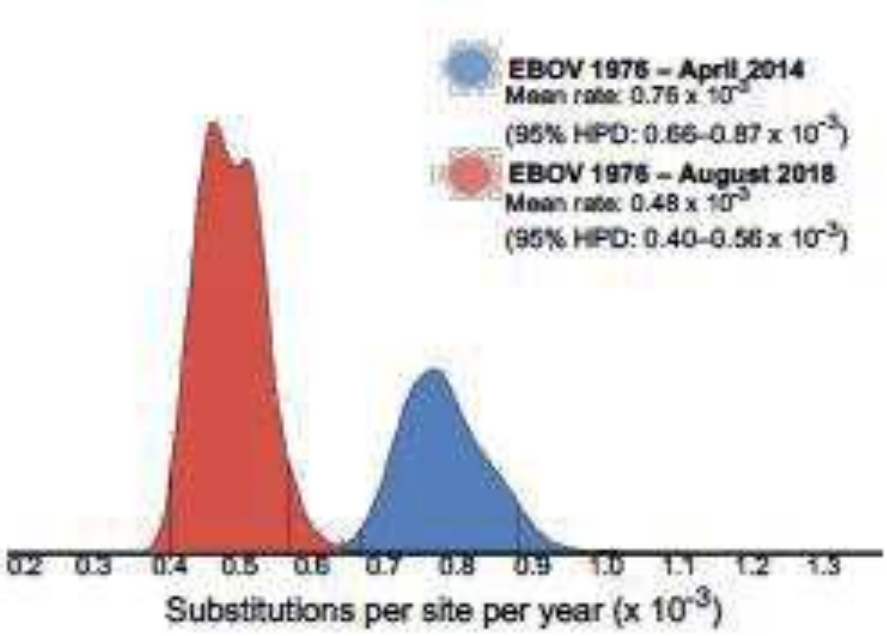


Figure S7. A Bayesian-inferred rate distribution comparison using an uncorrelated lognormal relaxed molecular clock of single representative EBOV variant sequences. Rates were compared between variants that were characterized prior to the 2014 EVD outbreak in the DRC (blue, n = 11) and then including all variants up until August 2018 (red, n = 15). The 95% highest posterior density intervals are shown.

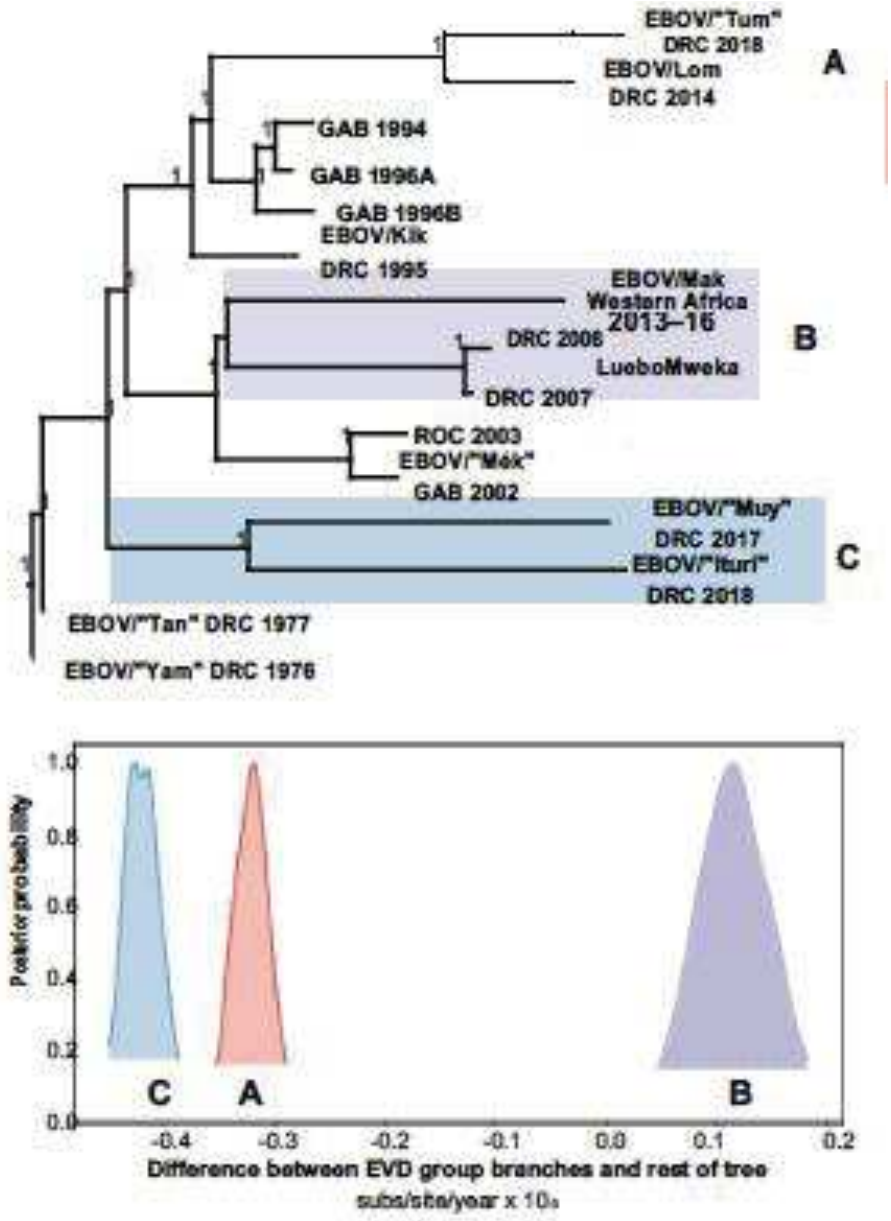


Figure S8. Fixed local clock analysis using single-representative EBOV sequences. Since individual branch variants could not be evaluated using a local clock in this dataset, we compared three different groups of variants: (A) EBOV/“Tum” and EBOV/Lom, (B) EBOV/Mak and Luebo outbreak variants, and (C) EBOV/“Itu” and EBOV/“Muy”. The difference between the selected group and the mean rate distribution of the rest of the tree branches was calculated in the lower panel. EBOV/“Mak” and Luebo/Mweka variants (B) are evolving faster than the tree’s mean rate distribution while EBOV/Lom, EBOV/“Tum” (A) and EBOV/“Itu”, EBOV/“Muy” (C) are slower.

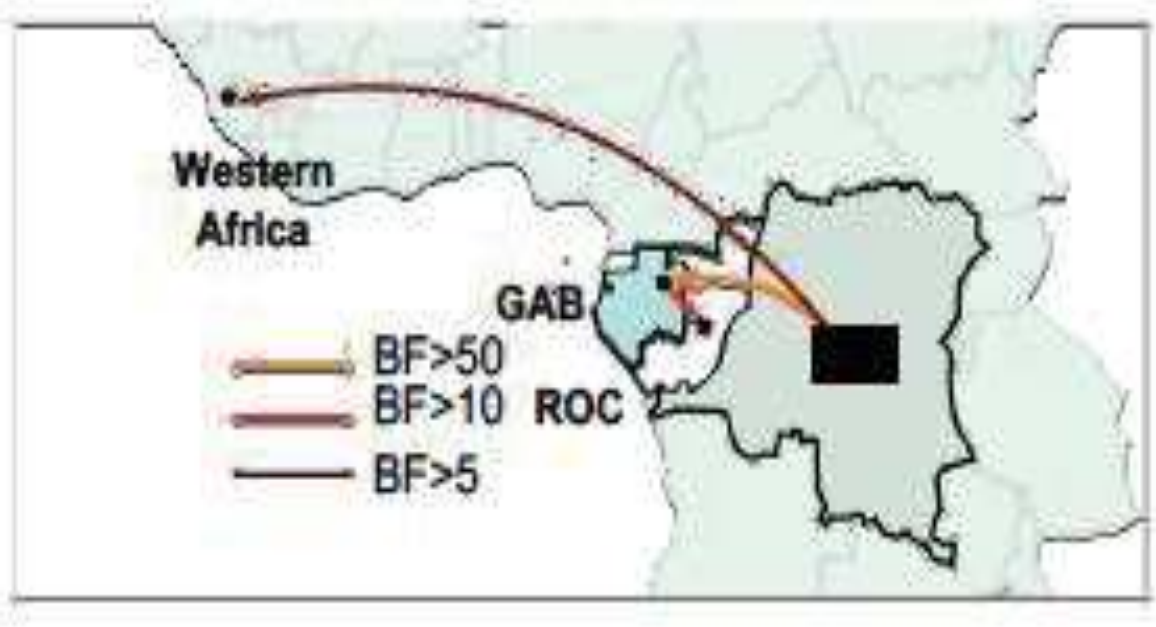


Figure S9. The spatial-temporal relationships of EBOV migrations in Middle and West Africa. Well supported (Bayes factor [BF] ≥5, median count ≥1) asymmetric rates of EBOV variant migration between countries. Arrow color and thickness indicate magnitude.

Discussion Générale et Conclusion

Discussion Générale et Conclusion

L'objectif global de ce travail est de caractériser le virus Ebola à l'interface homme – animal sauvage et la recherche du réservoir du virus Ebola dans la faune sauvage.

Durant les trois années de notre travail de thèse, la RDC a connu trois épidémies successives de la maladie à virus Ebola, à Likati dans la province de Bas-Uélé (entre Mai et Juillet 2017), à Bikoro dans la province de l'Equateur (entre Mai et Juillet 2018), et dans les provinces du Nord Kivu et Ituri (depuis Août 2018 en cours jusqu'à présent) (Nsio et al., 2019 ; Mbala-Kingebeni et al., 2019). Ces évènements ont influé sur le déroulement de notre travail, au moment où nous travaillions déjà sur la recherche du réservoir des virus Ebola en RDC en dehors des périodes épidémiques. Nous avons alors saisi cette opportunité pour explorer également la présence des virus Ebola dans la faune sauvage en période d'épidémie, mais nous avons aussi apporté notre expertise dans le diagnostic et la caractérisation des virus Ebola pendant les deux dernières épidémies.

Les principaux résultats de ces travaux de thèse sont les suivants :

1. Les anticorps des virus Ebola Zaïre et/ou Soudan sont présents chez au moins six espèces de chauves-souris frugivores (*Eidolon helvum*, *Hypsignathus monstrosus*, *Rousettus aegyptiacus*, *Lissonycteris angolensis*, *Epomophorus sp.*, et *Micropteropus pusillus*) et chez une seule espèce de chauves-souris insectivores *Mops sp*. Toutes les tentatives de détection de l'ARN des virus Ebola étaient vaines.
2. Aucun échantillon de primates non humains n'a réagi simultanément à la nucléoprotéine (NP) et à la glycoprotéine (GP) du virus Ebola Zaïre. Un seul échantillon, provenant d'un singe moustachu (*C. cephus*) du Cameroun, avait simultanément des anticorps dirigés contre les protéines NP et GP du SUDV.
3. La recherche de l'ARN et des anticorps des virus Ebola était négative dans les échantillons prélevés dans la faune sauvage au cours de notre investigation réalisée à Likati, zone affectée par l'épidémie de la maladie à virus Ebola en 2017, en RDC, quelques jours après la déclaration

de la fin de l'épidémie.

4. En moins d'une semaine, l'épidémie de la maladie à virus Ebola à Bikoro, dans la province de l'Equateur en RDC, a été confirmée. La souche du virus Ebola responsable de cette épidémie a été caractérisé, permettant ainsi un déploiement des mesures de contrôle de cette épidémie, entre autres : outils de diagnostic, vaccin et traitement.
5. Une caractérisation plus précise du virus a été réalisée grâce à l'obtention, de manière rétrospective, de 16 génomes complets de ce virus par séquençage de nouvelle génération, technique mise au point pour la première fois à l'INRB. Tous ces génomes forment un seul groupe signifiant qu'il s'agit certainement d'un seul passage du virus de l'animal (réservoir ou hôte intermédiaire) à l'homme, ayant généré cette épidémie. Un nouveau variant du virus Ebola est identifié et nommé « Tumba » EBOV/''Tum'', en référence au lac Tumba qui traverse les sites affectés par cette épidémie. Ce variant est plus proche du variant « Lomela » EBOV/''Lom'', responsable de l'épidémie à Boende en 2014, en RDC. Les mutations observées sur les génomes de ces virus n'affectent pas l'outil de diagnostic principal utilisé au cours de cette épidémie. En réalisant des études in silico, une mutation identifiée chez un seul patient a entrainé une diminution de l'attachement du 13C6, un des anticorps monoclonaux du ZMapp, à la GP du virus Ebola. Mais ceci ne risque pas d'affecter l'efficacité du traitement car les deux autres anticorps monoclonaux (2G4 et 4G7) du ZMapp s'attachent correctement au virus et cette mutation n'a été jusqu'alors observée que dans les échantillons d'un seul individu.
6. Une confirmation et une caractérisation rapide du virus Ebola responsable de la dixième épidémie de la maladie à virus Ebola en 2018, en RDC, affectant les provinces du Nord Kivu et Ituri. Un nouveau variant du virus Ebola est identifié, nommé « Ituri » EBOV/''Itu'', en référence à la rivière Ituri qui coule dans les provinces affectées. Ce virus est plus proche du variant EBOV/''Muy'', responsable de l'épidémie de Likati en 2017, en RDC. Environ 48 génomes complets ont été obtenus de ce variant à partir des échantillons des premiers cas confirmés. Des discordances ont été notées entre le génome de ce nouveau variant et certains

tests de diagnostic que nous avons évalués, déployés sur terrain au cours de l'épidémie précédente à Bikoro, province de l'Equateur. Cependant, ces mutations n'affectent pas le principal outil de diagnostic (GeneXpert) utilisé au cours de cette épidémie. Nous n'avons pas noté de discordance entre le génome du virus Ebola et les deux principaux anticorps monoclonaux (ZMapp et mAb114) déployés sur terrain comme traitement expérimental.

Cette discussion générale sera orientée essentiellement sur la recherche des réservoirs des virus Ebola dans la faune sauvage, le défis à réaliser ces études en période épidémique et l'impact de notre travail sur le contrôle de l'épidémie dans les populations humaines. Nous discuterons des études rétrospectives réalisées en période inter-épidémiques, des investigations écologiques réalisées en zones affectées après une flambée épidémique, de l'implication de notre travail dans le contrôle de l'épidémie actuelle et dans la prévention des futures épidémies. Nous évoquerons également les défis liés au contexte de l'épidémie actuelle dans les provinces du Nord Kivu et Ituri, en RDC.

1.1. Amélioration des connaissances et perspectives

1.1.1. Recherche des réservoirs des virus Ebola dans la faune sauvage en période inter-épidémiques

Discussion des résultats

Nous avons réalisé une large enquête dans la faune sauvage incluant à chaque fois trois pays différents ; pour les chauves-souris, RDC et Guinée, deux pays ayant déjà connu des épidémies de la maladie à virus Ebola, et Cameroun, pays à risque de ces épidémies. Et pour les primates, RDC et Côte d'Ivoire, pays ayant rapporté au moins un cas d'infection aux virus du genre *Ebolavirus*, et le Cameroun. Nous avons testé plus de 4.000 chauves-souris, doublant ainsi le nombre total d'échantillons testés dans toutes les études précédentes en Afrique (Pigott et al., 2016 ; Leroy et al., 2005 ; Leendertz et al., 2016 ; Rimoin et al., 2018 ; Ayouba et al., 2017). Nous avons utilisé un test très sensible et très spécifique, mis au point chez les survivants de la maladie à virus Ebola de

la Guinée (Ayouba et al., 2017 ; Paweska et al., 2016), et que nous avons adapté pour l'analyse des échantillons de la faune sauvage (chauves-souris, primates non humains, rongeurs, etc.). Par manque de contrôles positifs pour valider les tests chez les animaux sauvages, nous avons utilisé différentes méthodes statistiques pour déterminer le nombre d'échantillons positifs et nous avons exprimé la proportion d'échantillons réactifs sous forme de plage sur base des différentes valeurs de seuil proposées par ces méthodes. La prévalence des anticorps anti-virus Ebola chez les chauves-souris variait entre 0,05% –0,92% pour le virus Ebola Zaïre et entre 0% et 0,75% pour le virus Soudan. La prévalence était plus élevée chez les espèces de chauves-souris frugivores que chez les insectivores soit 0.06%–1.79% contre 0.05%–0.27% pour le virus Ebola Zaïre et 0%–1.61% contre 0%–0.09% pour le virus Ebola Soudan, respectivement. Ces prévalences faibles chez les chauves-souris frugivores comparées aux études précédentes (Pourrut et al., 2009 ; Hayman et al., 2010 ; Yuan et al., 2012) seraient certainement dues aux différents tests et méthodes utilisés dans ces études pour détecter ces anticorps et à l'interprétation de ces tests. Nous avons confirmé la présence des anticorps pour le virus Ebola Zaïre et Soudan chez les chauves-souris insectivores *Mops sp.*, comme cela a été également observé par Pourrut et al. (Pourrut et al., 2009).

Chez les primates non humains, cette étude est la première à avoir évalué un grand nombre de singes en utilisant les mêmes critères d'analyse et d'interprétation. Nous avons testé 2.322 singes, contre 930 testés auparavant, au Cameroun (n = 177), au Gabon (n = 318), en RDC (n = 251) et au Kenya (n = 184) où une grande diversité de tests de détection d'anticorps avait été utilisée (Johnson et al., 1982 ; Leroy et al., 2004 ; Leirs et al., 1999 ; Breman et al., 1999). Nous avons montré qu'il était possible de rechercher les anticorps des virus Ebola dans les échantillons de fèces des animaux sauvages en adaptant la technique de Luminex mise en place chez les survivants de la maladie à virus Ebola de la Guinée (Ayouba et al., 2017) en confirmant les travaux de Reed et al. (Reed et al., 2014).

Cependant, nous avons noté une faible prévalence des anticorps des virus Ebola chez les singes ; aucun échantillon n'a présenté des anticorps au virus Ebola Zaïre, et les anticorps du virus Soudan

ont été détecté chez un seul singe moustachu *C. cephus* du Cameroun. En outre, il n'y avait aucune évidence des anticorps du virus Ebola chez les grands singes dans notre étude. Ces résultats sont comparables avec ceux des études précédentes (Johnson et al., 1982 ; Leirs et al., 1999 ; Breman JG et al., 1999) qui rapportent aussi des prévalences faibles, entre 0% et 1%, des anticorps du virus Ebola chez des primates non humains. Tandis que, d'autres auteurs (Leroy et al., 2004 ; Reed et al., 2014) ont noté des prévalences de 6,3% chez les singes et grands singes du Cameroun, Gabon et République du Congo ; et 10% dans les fèces des gorilles prélevés au parc national d'Odzala-Kokoua en République du Congo, respectivement. Ces différences peuvent s'expliquer par le faible nombre d'échantillons analysés pour chaque espèce dans notre étude, les prélèvements ont été réalisés dans des sites géographiques différents des études précédentes, nous avons utilisé des méthodes d'analyse et d'interprétation différentes.

Quoique la RDC soit à sa dixième épidémie de la maladie à virus Ebola, les faibles prévalences des anticorps du virus Ebola observées chez les animaux prélevés en RDC peut s'expliquer par plusieurs raisons : (i) le passage du virus de la faune sauvage à la population humaine est un événement rare, (ii) les prélèvements ont été réalisés dans les zones qui n'ont jamais été affectées par les épidémies de la maladie à virus Ebola et en dehors des périodes épidémiques où probablement les chances de rencontrer soit un animal réservoir ou hôte intermédiaire seront plus faibles.

1.1.2. Recherche des réservoirs des virus Ebola dans la faune sauvage en période épidémique

Discussion des résultats

Environ sept semaines après le diagnostic du dernier cas confirmé et 4 jours après la déclaration de la fin de la huitième épidémie de la maladie à virus Ebola en RDC, nous avons conduit une enquête écologique à Likati, zone de santé affectée par l'épidémie, dans la province de Bas-Uélé. Le but principal de cette enquête était de détecter la probable source de contamination ou éventuellement le réservoir du virus Ebola dans la faune sauvage. Des interviews informels menés

auprès de la population du village de Kaigbono, lieu de résidence du cas index, ont révélé que ce dernier avait été en contact avec des carcasses d'animaux sauvages morts, un potamochère et une chauve-souris, 13 jours et 7 jours avant le début des symptômes, respectivement. Entre 06 Juillet et 18 Août 2017, nous avons prélevé des échantillons chez 241 rongeurs, 141 chauves-souris, 79 musaraignes, 5 primates non humains, 1 mangouste, 1 potamochère et nous avons également recueilli 96 échantillons de fèces dans l'environnement direct des colonies de chauves-souris *E. helvum*. Aucun anticorps, ni ARN des virus Ebola n'a été détecté dans ces animaux durant cette enquête. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus au cours des précédentes études réalisées dans des zones épidémiques en RDC (Leirs et al., 1999 ; Breman et al., 1999). Par contre, d'autres auteurs ayant travaillé aussi dans des zones affectées par des épidémies au Gabon et en République du Congo, ont détecté la présence des anticorps et même des fragments du génome viral dans la faune sauvage (WHO, Weekly Epidemiological Report, 27 June 2003 ; Leroy et al., 2004 ; Rouquet et al., 2005). Ces différences peuvent être dues au fait que, ces derniers auteurs ont réalisé leurs investigations dans la faune sauvage pendant la période des épidémies et dans les régions affectées par ces épidémies entre 2001 et 2005. Car, au cours de la même période, le virus Ebola a été détecté dans le cadavre d'un gorille abattu par le cas index de l'épidémie survenue au district de la Zadié, au Gabon. C'est le seul cas où la présence du virus a pu être confirmée dans un animal incriminé. Tandis que, notre étude a été menée 3 à 4 mois après la période probable de l'infection du cas index et environ 7 semaines après le diagnostic du dernier cas confirmé de l'épidémie de Likati en 2017, en RDC. En outre, nos investigations ont été interrompues à cause de mauvaises conditions climatiques (pluies abondantes) dans la zone. Certains échantillons des chauves-souris prélevés sur papiers filtres ont été endommagés par l'humidité et n'ont pas pu être analysés. Toutes ces situations réunies ont conduit à un rendement faible de notre équipe et peuvent expliquer les résultats que nous avons obtenus.

L'idéal serait de réaliser ces investigations en période d'épidémie et dans les zones affectées. Ces épidémies surviennent généralement dans des zones enclavées et/ou reculées où des études écologiques vont nécessiter des moyens logistiques importants (transport du staff et matériels,

conservation des échantillons, logement, etc.). Tout en sachant que, en période d'épidémie, les zones affectées sont envahies par un contingent important d'experts nationaux et internationaux qui participent aux efforts de la riposte à l'épidémie chez les humains. En outre, l'épidémie actuelle dans les provinces du Nord Kivu et Ituri survient en zone d'insécurité, ce qui soulève un défi majeur pour les études écologiques car le piégeage se fait habituellement dans la soirée et dans les zones forestières à proximité des habitations où des incursions des groupes armés rebelles sont parfois fréquentes.

1.1.3. Caractérisation des virus Ebola chez l'homme pendant les épidémies

Discussion des résultats

En 2018, la RDC a connu deux épidémies de la maladie à virus Ebola qui sont survenues presque de manière concomitante : Bikoro (Mai – Juillet 2018), dans la province de l'Équateur, et celle qui est en cours actuellement dans les provinces du Nord Kivu et Ituri, dont les premiers cas remontent au mois de Juillet 2018. Nous avons installé dans un premier temps des laboratoires dans quelques épicentres majeurs pour faire les diagnostics sur place. Nous avons aussi installé un laboratoire de séquençage à l'INRB qui avait pour objectif : (i) l'identification des souches virales responsables des nouvelles chaînes de transmission dans une épidémie en cours, (ii) l'estimation du taux de mutation virale, et (iii) l'analyse de l'impact des mutations virales sur la performance des tests de diagnostic moléculaire, sur la vaccination et sur les molécules utilisées comme traitement expérimental au cours des récentes épidémies. Nous avons caractérisé rapidement les nouveaux variants du virus Ebola responsable de ces épidémies que nous avons nommés : « Tumba » (EBOV/''Tum'') pour le virus détecté à Bikoro, dans la province de l'Equateur et « Ituri » (EBOV/''Itu'') pour le variant identifié dans les provinces du Nord Kivu et Ituri. Nous avons montré que le variant EBOV/''Tum'' est plus proche de EBOV/''Lom'' identifié lors de l'épidémie à Boende en 2014, et les deux virus forment un cluster avec le virus isolé à Kikwit en 1995. Tandis que, le variant EBOV/''Itu'' est plus proche de EBOV/''Muy'' identifié à Likati en 2017, et forment un cluster avec le virus isolé à Yambuku en 1976. Les deux clusters sont séparés par le

fleuve Congo constituant une forme de barrière qui peut sous-entendre l'existence d'espèces réservoirs différents pour chaque cluster. Comme l'épidémie continue, nous avons aussi installé un laboratoire de séquençage sur le terrain à Katwa, l'un des épicentres, situé dans la ville de Butembo, province du Nord Kivu, pour appuyer l'équipe de surveillance épidémiologique dans le suivi des chaines de transmission.

Des laboratoires de séquençage avaient déjà été installés vers la fin de l'épidémie de 2014-2016 en Afrique de l'Ouest et avaient permis d'apporter des informations importantes à la compréhension de la dynamique de l'épidémie (Kugelman et al., 2015 ; Hoenen et al., 2016). Cependant, c'est pour la première fois, au cours d'une épidémie, qu'une évaluation des outils de diagnostic, du vaccin ou des molécules expérimentales soit faite en fonction des souches virales en circulation. L'obtention des séquences (génomes complets) au cours de ces deux dernières épidémies nous a permis de fournir des informations exploitables pour le déploiement du vaccin rVSVΔG-ZEBOV-GP, des traitements disponibles et des outils de diagnostic appropriés. Nous avons montré, sur base de nos analyses sur les mutations identifiées dans les séquences obtenues de ces souches virales, que le traitement par anticorps monoclonaux, particulièrement mAb114 et ZMapp déployés sur terrain, devrait être efficace contre ces variants du virus Ebola qui sont actuellement en circulation.

1.2. Impact sur les mesures de contrôle de l'épidémie de la maladie à virus Ebola

Les stratégies de contrôle de l'épidémie de la maladie à virus Ebola reposent sur quatre piliers importants, notamment : la détection des cas, l'isolement des malades, le suivi des contacts et l'enterrement digne et sécurisé. Depuis l'épidémie de Bikoro en Mai 2018, dans la province de l'Equateur, le ministère de santé de la RDC et l'OMS ont renforcé cette stratégie de riposte par l'utilisation des candidats vaccins comme moyens additionnels de prévention et également par des traitements expérimentaux dans la prise en charge des patients.

La mise en place des techniques de diagnostic précis aux sites des épidémies a permis de raccourcir au maximum le délai d'attente des résultats en facilitant le tri des patients. En obtenant de façon régulière des séquences des cas confirmés, nous avons montré qu'il était possible de construire des chaines de transmission entre les cas confirmés sur base des informations moléculaires. Ce qui représente un apport considérable dans le contexte de l'épidémie actuelle dans les provinces du Nord Kivu et Ituri, où l'insécurité, causée par la présence de plusieurs groupes armés rebelles, et les violences contre les équipes de riposte, entravent le déroulement des activités sur terrain (surveillance épidémiologique, vaccination, etc.) résultant à un nombre important des cas confirmés sans lien épidémiologique établi.

1.3. Défis pour le contrôle de l'épidémie actuelle au Nord Kivu et Ituri, en RDC

Depuis plus de 20 ans, les provinces du Nord Kivu et Ituri sont en proie à des violences liées à la présence des groupes armés rebelles présents dans la région et aux conflits ethniques entre différentes communautés. Cette situation d'insécurité presque permanente dans cette partie de la RDC tire son origine de plusieurs événements qui se sont succédés, notamment : l'arrivée massive des réfugiés rwandais en 1994, la première guerre de la RDC ou guerre de libération qui correspond à l'offensive de l'AFDL (Alliance des Forces Démocratiques pour la Libération du Congo) en 1996-1997 et la deuxième guerre de la RDC qui a débuté en Août 1998 pendant laquelle des groupes armés rebelles alliés aux pays frontaliers s'étaient formés pour tenter de renverser le pouvoir en place en RDC (Rusamira, 2003). Depuis cette période, plusieurs groupes armés rebelles ont vu le jour dans cette partie du pays, perpétrant régulièrement des massacres des populations locales dont le plus récent est le massacre des civils à Beni en Septembre 2018. Les conflits ethniques demeurent aussi fréquents entrainant des déplacements massifs des communautés. C'est le cas du récent conflit entre les Hema et les Lendu en Ituri, qui a entrainé un déplacement de plus 300 000 personnes vers le Nord-est, d'après l'UNHCR (https://www.unhcr.org/fr/news/briefing/2019/6/5d08d675a/regain-violence-entraine-deplacements-massifs-nord-est-rdc.html).

Depuis le début de cette épidémie en Août 2018 au Nord Kivu et Ituri, nous faisons face à une résistance au sein de la communauté locale contre les activités menées dans le cadre de la riposte à cette épidémie. Cette réticence des communautés a été interprétée à l'origine comme une incompréhension des pratiques de santé publique telles que l'isolement des malades et la pratique des enterrements dignes et sécurisés, empêchant ainsi la communauté de rester en contact avec leurs membres de famille malades et de procéder aux rites funéraires selon leurs coutumes ce qui revêt d'une importance capitale pour la vie culturelle et sociale de la communauté (Nguyen et al., 2019).

Cependant, cette résistance de la communauté aux activités de la riposte à l'épidémie est devenue plus importante pendant la période des élections de Décembre 2018 avec la suspension de la ville de Beni et Butembo du vote présidentiel. Cette situation a alimenté les rumeurs selon lesquelles l'épidémie était une ruse politique pour priver les électeurs du droit de vote (Nguyen et al., 2019 ; Social Science in Humanitarian Action. Media and local messages on Ebola. 2018 (https://www.socialscienceinaction.org). En outre, d'autres membres de la communauté ont perçu cette riposte comme une activité lucrative au bénéfice de certaines puissances nationales ou internationales. Ainsi, les attaques spontanées contre les installations et les équipes de la riposte se sont intensifiées parfois associées aux conflits armés et entrainant parfois des pertes en vies humaines (Médecins sans Frontières. Medical activities suspended after Ebola treatment centre attack. February 28, 2019. https://www.msf.org/ medical - activities - suspended - after - ebola - treatment - centre- attack; Médecins Sans Frontières. DRC Ebola outbreak crisis update. April 18, 2019. https://www .msf .org/ drc - 2018 - ebola - outbreak - crisis- update). Et jusqu'au mois de Mai 2019, le département de sécurité et sureté des Nations Unies a dénombré environ 434 incidents de sécurité, dont 169 liés aux conflits armés, 60 liés aux tensions politiques, 178 liés aux résistances des communautés incluant les différentes attaques perpétrées contre les installations et les équipes de la riposte, et 27 liés aux crimes ou vols (Ilunga Kalenga et al., 2019). Et lorsqu'on compare l'épidémie actuelle au Nord Kivu et Ituri à celle de l'épidémie de l'Afrique de l'Ouest (Guinée, Libéria et Sierra Leone), nous voyons bien que le défi majeur au cours de cette

épidémie est l'insécurité surtout avec la présence d'une centaine de groupes armés rebelles dans la région (figure 23).

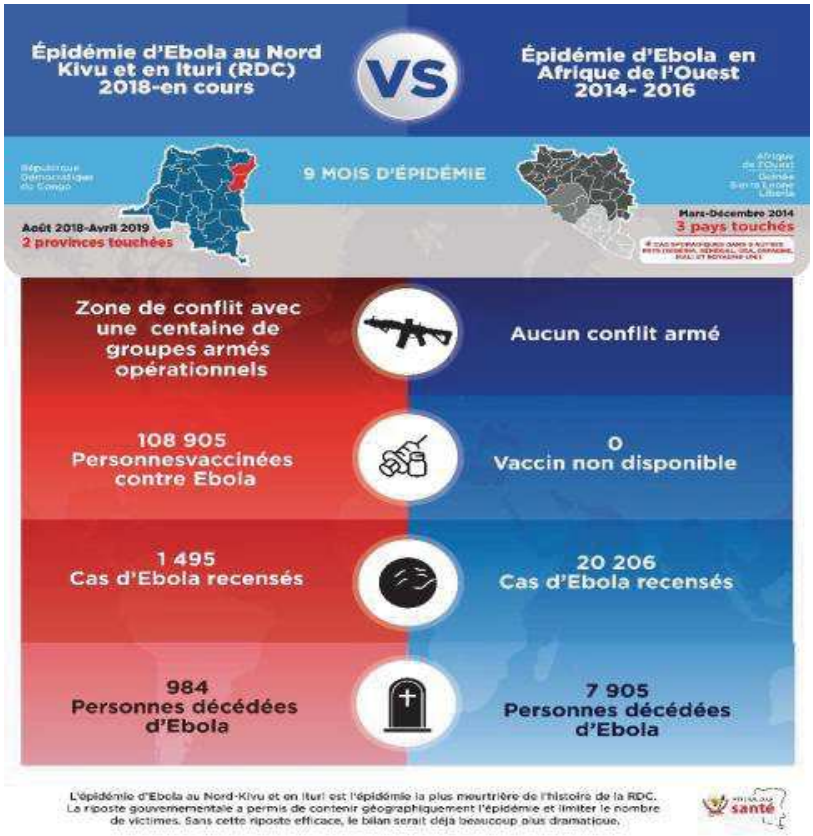


Figure 30. Tableau comparatif de l'épidémie du Nord Kivu et Ituri, en RDC, à celle de l'Afrique de l'Ouest (Guinée, Libéria et Sierra Leone), neuf mois après le début de l'épidémie (Ministère de la Santé de la RDC).

Dans un pays, comme la RDC, où le climat politique demeure encore incertain, il faut craindre qu'une telle situation autour de l'épidémie de la maladie à virus Ebola soit récupérée par les groupes armés à des fins politiques.

Les données épidémiologiques de cette épidémie, entre Août 2018 et Mai 2019, révèlent une augmentation des cas (probables et confirmés) consécutive à chaque principal événement violent, notamment : le massacre des civils à Beni en Septembre 2018, les violences pendant la période électorale en Décembre 2018 et les incendies des centres de traitement en Février 2019 (figure 24) (Ilunga Kalenga et al., 2019).

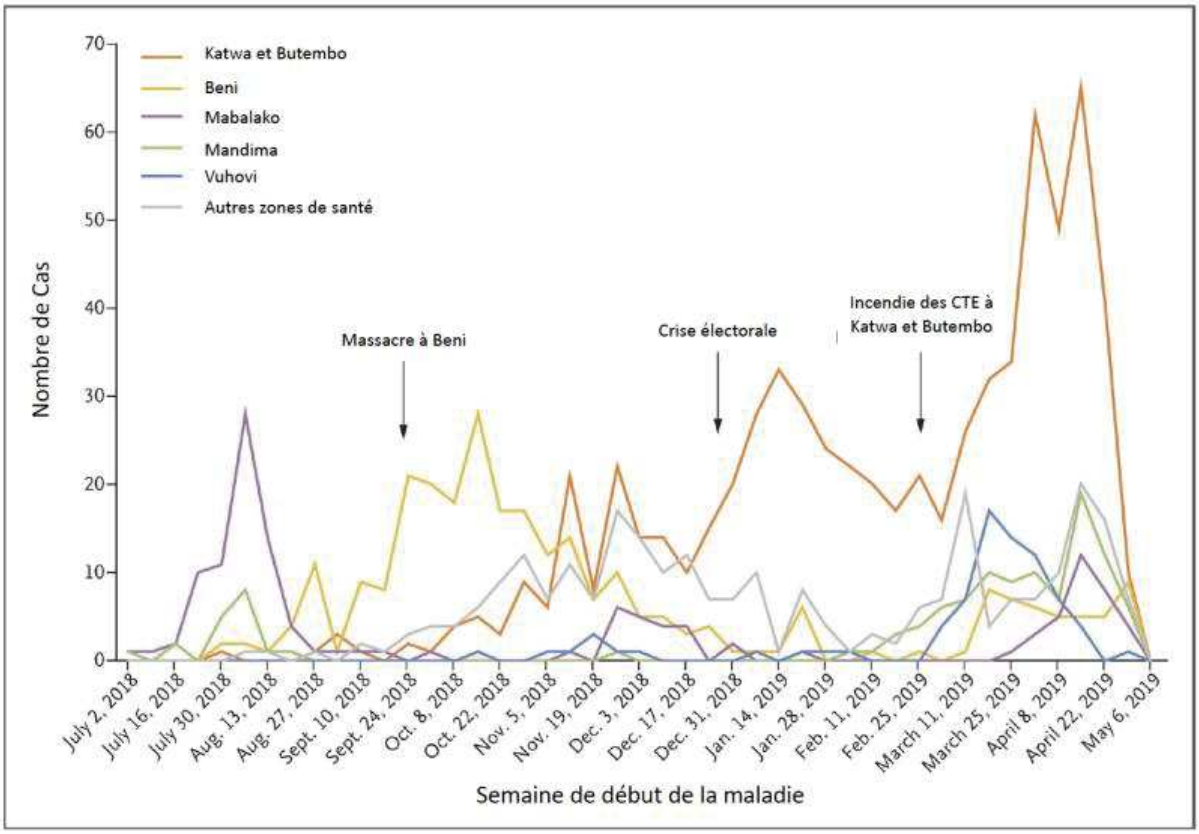


Figure 31. Evolution des cas d'infection au virus Ebola dans les épicentres majeurs en rapport avec les principaux incidents violents, au Nord Kivu et Ituri, en RDC (adapté de Ilunga Kalenga et al., 2019)

Au moment où les efforts considérables sont fournis pour améliorer la collaboration entre les équipes de la riposte et la communauté locale, des incidents isolés persistent encore avec récemment l'incendie d'un véhicule à Beni appartenant à l'équipe de la riposte chargée de la prévention et contrôle de l'infection (https://actualite.cd/2019/06/25/rdc-huit-auteurs-presumes-de-lincendie-dun-vehicule-de-la-riposte-contre-ebola-aux).

Tous ces événements démontrent que la dimension socio-culturelle doit occuper une place de choix dans l'élaboration des stratégies pour le contrôle de cette épidémie qui continue à prendre des allures inquiétantes. Et tant que nous n'aurons pas obtenu un engagement communautaire conséquent, il nous sera difficile de stopper cette épidémie dans cette région.

1.4. Conclusion

Ces travaux de thèse permettent de comprendre que malgré la présence d'anticorps du virus Ebola, le rôle des chauves-souris en tant qu'espèce réservoir reste flou, car la détection de l'ARN viral demeure encore très rare. En outre, lorsque nous combinons les résultats sur les primates non humains de notre étude et ceux d'études précédentes, nous remarquons que les anticorps anti-virus Ebola ne sont pas répandus parmi les primates non humains, ce qui confirme que les primates non humains ne sont pas des espèces réservoirs. Les techniques de séquençage mises en place nous permettent de répondre efficacement à certains problèmes de santé publique, tels que : identifier les chaines de transmission et évaluer les outils de diagnostic, le traitement et les candidats vaccins utilisés, tout au long de cette épidémie qui sévit actuellement en RDC. Néanmoins, avec la fréquence croissante des épidémies de virus Ebola, trois épidémies en une année en RDC, il devient extrêmement urgent d'identifier le ou les réservoirs animaux et de comprendre l'écologie des virus Ebola, car c'est le seul moyen pour prévenir de manière efficace les épidémies futures.

1.5. Perspectives

Les perspectives de ce travail sont principalement orientées vers l'identification des réservoirs des virus Ebola et la compréhension du rôle de la faune sauvage dans la transmission de cette maladie à l'homme. Vu l'étendue de la RDC, le nombre d'animaux prélevés et le nombre de sites explorés au cours de ces différentes enquêtes sont encore faibles. En plus, la RDC a connu dix épidémies depuis 1976 qui ont touché 10 provinces sur les 26. Nous prévoyons premièrement de poursuivre nos enquêtes dans la faune sauvage en se focalisant sur les chauves-souris, candidats réservoirs potentiels, en augmentant le nombre de prélèvements et la diversité d'espèces (frugivores et insectivores), et en ciblant les sites qui ont déjà été touchées par les épidémies de la maladie à virus Ebola. Cette activité constituera une étape pilote pour la mise en place d'un système de surveillance de la faune orienté sur les espèces connues comme réservoirs, hôte intermédiaires ou vecteurs des maladies (chauves-souris, primates non humains, rongeurs, etc.). Deuxièmement, nous allons concentrer nos efforts pendant les périodes épidémiques en se focalisant particulièrement sur les chauves-souris ainsi que toute carcasse d'animaux de mort suspecte retrouvée en forêt ou à proximité des habitations. Enfin, sur base des compétences acquises, nous comptons développer un réseau de surveillance et détection rapide de nouvelles émergences, Ebola ou autres maladies, ainsi qu'un centre de génomique pour la caractérisation de différents pathogènes responsables des épidémies en RDC.

VALORISATION DE LA THESE

Publications scientifiques

1. De Nys HM, **Mbala Kingebeni P**, Keita AK, Butel C, Thaurignac G, Villabona-Arenas CJ, Thomas Lemarcis, Mare Geraerts, Nicole Vidal, Amandine Esteban, Mathieu Bourgarel, François Roger, Fabian Leendertz, Ramadan Diallo, Simon-Pierre Ndimbo-Kumugo, Justus Nsio-Mbeta, Nikki Tagg, Lamine Koivogui, Abdoulaye Toure, Eric Delaporte, Steve Ahuka-Mundeke, Jean-Jacques Muyembe Tamfum, Eitel Mpoudi-Ngole, Ahidjo Ayouba, Martine Peeters. Survey of Ebola viruses in frugivorous and insectivorous bats in Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017. **Emerg Infect Dis**. 2018 Dec [*date cited*]. https://doi.org/10.3201/eid2412.180740.
2. Ahidjo Ayouba, Steve Ahuka-Mundeke, Christelle Butel, **Placide Mbala Kingebeni**, Severin Loul, Nikki Tagg, Christian-Julian Villabona-Arenas, Audrey Lacroix, Simon-Pierre Ndimbo-Kumugo, Alpha K. Keita, Abdoulaye Toure, Emmanuel Couacy-Hymann, Sebastien Calvignac-Spencer, Fabian H. Leendertz, Pierre Formenty, Eric Delaporte, Jean-Jacques Muyembe-Tamfum, Eitel Mpoudi Ngole, and Martine Peeters. Extensive Serological Survey of Multiple African Nonhuman Primate Species Reveals Low Prevalence of Immunoglobulin G Antibodies to 4 Ebola Virus Species **. The Journal of Infectious Diseases**® 2019 ; XX(XX) :1–10. DOI: 10.1093/infdis/jiz006.
3. **Placide Mbala Kingebeni**, Christian-Julian Villabona-Arenas, Nicole Vidal, Jacques Likofata, Justus Nsio-Mbeta, Sheila Makiala-Mandanda, Daniel Mukadi, Patrick Mukadi, Charles Kumakamba, Bathe Djokolo, Ahidjo Ayouba, Eric Delaporte, Martine Peeters, Jean-Jacques Muyembe Tamfum, Steve Ahuka Mundeke. Rapid confirmation of the Zaire Ebola Virus in the outbreak of the Equateur province in the Democratic Republic of Congo: implications for public health interventions. **Clinical Infectious Diseases**, ciy527, https://doi.org/10.1093/cid/ciy527. Published: 29 June 2018.
4. **Placide Mbala-Kingebeni**, Catherine B Pratt, Michael R Wiley, Moussa M Diagne, Sheila Makiala-Mandanda, Amuri Aziza, Nicholas Di Paola, Joseph A Chitty, Mamadou Diop, Ahidjo

Ayouba, Nicole Vidal, Ousmane Faye, Oumar Faye, Stormy Karhemere, Aaron Aruna, Justus Nsio, Felix Mulangu, Daniel Mukadi, Patrick Mukadi, John Kombe, Anastasie Mulumba, Sophie Duraffour, Jacques Likofata, Elisabeth Pukuta, Katie Caviness, Maggie L Bartlett, Jeanette Gonzalez, Timothy Minogue, Shanmuga Sozhamannan, Stephen M Gross, Gary P Schroth, Jens H Kuhn, Eric F Donaldson, Eric Delaporte, Mariano Sanchez-Lockhart, Martine Peeters, Jean-Jacques Muyembe-Tamfum, Amadou Alpha Sall, Gustavo Palacios, Steve Ahuka-Mundeke. 2018 Ebola virus disease outbreak in Équateur Province, Democratic Republic of the Congo: a retrospective genomic characterization. **www.thelancet.com/infection** Published online April 15, 2019 http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30124-0.

5. **Placide Mbala-Kingebeni**, Amuri Aziza, Nicholas Di Paola, Michael R Wiley, Sheila Makiala-Mandanda, Katie Caviness, Catherine B Pratt, Jason T Ladner, Jeffrey R Kugelman, Karla Prieto, Joseph A Chitty, Peter A Larson, Brett Beitzel, Ahidjo Ayouba, Nicole Vidal, Stomy Karhemere, Mamadou Diop, Moussa M Diagne, Martin Faye, Ousmane Faye, Aaron Aruna, Justus Nsio, Felix Mulangu, Daniel Mukadi, Patrick Mukadi, John Kombe, Anastasie Mulumba, Christian-Julian Villabona-Arenas, Elisabeth Pukuta, Jeanette Gonzalez, Maggie L Bartlett, Shanmuga Sozhamannan, Stephen M Gross, Gary P Schroth, Roger Tim, Junhua J Zhao, Jens H Kuhn, Boubacar Diallo, Michel Yao, Ibrahima S Fall, Bathe Ndjoloko, Mathias Mossoko, Audrey Lacroix, Eric Delaporte, Mariano Sanchez-Lockhart, Amadou A Sall, Jean-Jacques Muyembe-Tamfum, Martine Peeters, Gustavo Palacios, Steve Ahuka-Mundeke. Medical countermeasures during the 2018 Ebola virus disease outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces of the Democratic Republic of the Congo: a rapid genomic assessment. **www.thelancet.com/infection**, Published online April 15, 2019, http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30118-5.
6. Lieselotte Cnops, Birgit De Smet, **Placide Mbala-Kingebeni**, Johan van Griensven, Steve Ahuka-Mundeke & Kevin K. Ariën. Where are the Ebola diagnostics from last time? **Nature** 565, 419-421 (2019) doi: 10.1038/d41586-019-00212-y

Posters

1. **Placide Mbala**, Catherine Pratt, Michael R. Wiley, Sheila Makiala-Mandanda, Amuri Aziza, Nicholas Di Paola, Moussa Diagne,Joseph Chitty,Mamadou Diop, Ahidjo Ayouba, Nicole Vidal, Ousmane Faye, Stomy Karhemere, Aaron Aruna, Justus Nsio, Felix Mulangu, Daniel Mukadi, Pat Mukadi,John Kombe, Anastasie Mulumba, Sophie Duraffour, Jacques Likofata, Elisabeth Pukuta, Tim Minogue, S. Sozhamannan, Steve Gross, Gary Schroth, E. Delaporte, Mariano S-Lockhart, M. Peeters, Jean-Jacques Muyembe, Amadou Sall, Gustavo Palacios, Steve Ahuka. Genomic characterization of the Ebola virus variants causing the outbreaks in the Equateur and Nord Kivu provinces, Democratic Republic of Congo 2018. **ASTMH – 67th ANNUAL MEETING, October 28 – November 1, 2018.** New Orleans, Louisiana, USA.
2. **Mbala Kingebeni P**, De Nys HM, , Keita AK, Butel C, Thaurignac G, Villabona-Arenas CJ, Thomas Lemarcis, Mare Geraerts, Nicole Vidal, Amandine Esteban, Mathieu Bourgarel, François Roger, Fabian Leendertz, Ramadan Diallo, Simon-Pierre Ndimbo-Kumugo, Justus Nsio-Mbeta, Nikki Tagg, Lamine Koivogui, Abdoulaye Toure, Eric Delaporte, Steve Ahuka-Mundeke, Jean-Jacques Muyembe Tamfum, Eitel Mpoudi-Ngole, Ahidjo Ayouba, Martine Peeters. Extensive serological survey for multiple species of ebola viruses in a wide diversity of bat species in guinea, cameroon and the democratic republic of congo. **ASTMH – 67th ANNUAL MEETING, October 28 – November 1, 2018.** New Orleans, Louisiana, USA.

BIBLIOGRAPHIE

Agnandji, Selidji T., Angela Huttner, Madeleine E. Zinser, Patricia Njuguna, Christine Dahlke, José F. Fernandes, Sabine Yerly, et al. 2015. "Phase 1 Trials of RVSV Ebola Vaccine in Africa and Europe." New England Journal of Medicine 374 (17): 1647–1660. https://doi.org/10.1056/nejmoa1502924.

Aghokeng AF, Ayouba A, Mpoudi-Ngole E, et al. Extensive survey on the prevalence and genetic diversity of SIVs in primate bushmeat provides insights into risks for potential new cross-species transmissions. Infect Genet Evol 2010; 10: 386-396.

Ahuka-Mundeke S, Ayouba A, Mbala-Kingebeni P, et al. High prevalences and a wide genetic diversity of simian retroviruses in non- human primate bushmeat in rural areas of the Democratic Republic of Congo. Ecohealth 2017; 14:100-114.

Ahuka-Mundeke S, Ayouba A, Mbala-Kingebeni P, et al. Novel multiplexed HIV/simian immunodeficiency virus antibody detection assay. Emerg Infect Dis 2011; 17: 2277-2286.

Albariño, C. G., T. Shoemaker, M. L. Khristova, J. F. Wamala, J. J. Muyembe, S. Balinandi, A. Tumusiime, et al. 2013. "Genomic Analysis of Filoviruses Associated with Four Viral Hemorrhagic Fever Outbreaks in Uganda and the Democratic Republic of the Congo in 2012." Virology 442 (2): 97–100. https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.014.

Alexander KA, Sanderson CE, Marathe M, et al. What factors might have led to the emergence of Ebola in West Africa? PLoS Negl Trop Dis 2015; 9: e0003652.

Alpha Diagnostic Intl Inc. "Ebola & Marburg Virus Vaccine ELISA Kits, Recombinant Proteins, and Antibodies" 110034 (800): 4–7.

Amarasinghe, Gaya K., María A. Ayllón, Yīmíng Bào, Christopher F. Basler, Sina Bavari, Kim R. Blasdell, Thomas Briese, et al. 2019. "Taxonomy of the Order Mononegavirales:

Update 2019." Archives of Virology, May. https://doi.org/10.1007/s00705-019-04247-4.

Amman, Brian R., Serena A. Carroll, Zachary D. Reed, Tara K. Sealy, Stephen Balinandi, Robert Swanepoel, Alan Kemp, et al. 2012. "Seasonal Pulses of Marburg Virus Circulation in Juvenile Rousettus Aegyptiacus Bats Coincide with Periods of Increased Risk of Human Infection." PLoS Pathogens 8 (10). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002877.

Amman et al. 2012. "Seasonal Pulses of Marburg Virus Circulation in Juvenile Rousettus Aegyptiacus Bats Coincide with Periods of Increased Risk of Human Infection." Edited by Yoshihiro Kawaoka. PLoS Pathogens 8 (10): e1002877. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002877.

Amman, Brian R., Megan E. B. Jones, Tara K. Sealy, Luke S. Uebelhoer, Amy J. Schuh, Brian H. Bird, JoAnn D. Coleman-McCray, Brock E. Martin, Stuart T. Nichol, and Jonathan S. Towner. 2014. "Oral Shedding of Marburg Virus in Experimentally Infected Egyptian Fruit Bats (Rousettus Aegyptiacus)." Journal of Wildlife Diseases 51 (1): 113–124. https://doi.org/10.7589/2014-08-198.

Antoinette C. Van der Kuyl, John T. Dekker, Jaap Goudsmit. Primate Genus Miopithecus: Evidence for the Existence of Species and Subspecies of Dwarf Guenons based on Cellular and Endogenous Viral Sequences. Vol. 14, Issue 3, March 2000, 403-413.

Arias A, Watson SJ, Asogun D, et al. Rapid outbreak sequencing of Ebola virus in Sierra Leone identifies transmission chains linked to sporadic cases. Virus Evol 2016; 2: vew016.

Audet J, Wong G, Wang H, et al. Molecular characterization of the monoclonal antibodies composing ZMAb: a protective cocktail against Ebola virus. Sci Rep 2015; 4: 6881.

Ayouba, Ahidjo, Steve Ahuka-Mundeke, Christelle Butel, Placide Mbala Kingebeni, Severin Loul, Nikki Tagg, Christian-Julian Villabona-Arenas, et al. 2019. "Extensive Serological Survey of Multiple African Nonhuman Primate Species Reveals Low

Prevalence of Immunoglobulin G Antibodies to 4 Ebola Virus Species." The Journal of Infectious Diseases, no. Xx Xxxx: 1–10. https://doi.org/10.1093/infdis/jiz006.

Ayouba, Ahidjo, Abdoulaye Touré, Christelle Butel, Alpha Kabinet Keita, Florian Binetruy, Mamadou S. Sow, Vincent Foulongne, et al. 2017. "Development of a Sensitive and Specific Serological Assay Based on Luminex Technology for Detection of Antibodies to Zaire Ebola Virus." Journal of Clinical Microbiology 55 (1): 165–176. https://doi.org/10.1128/JCM.01979-16.

B. Le Guenno, DrPh, DVM P. Formenty, DVM M. Wyers, Drsc P. Gounon, MD F. Walker, and PhD C. Boesch. 1995. "Isolation and Partial Characterisation of a New Strain of Ebola Virus." The Lancet 345 (8960): 1271–1274. https://doi.org/10.5555/uri:pii:S0140673695909257.

Baize, Sylvain, Eric M Leroy, M.-C. Georges-Courbot, Monique Capron, Joseph Lansoud-Soukate, Patrice Debré, Susan P Fisher-Hoch, Joseph B McCormick, and Alain J Georges. 1999. "Defective Humoral Responses and Extensive Intravascular Apoptosis Are Associated with Fatal Outcome in Ebola Virus-Infected Patients." Nature Medicine 5 (4): 423–426. https://doi.org/10.1038/7422.

Baize, Sylvain, Delphine Pannetier, Lisa Oestereich, Toni Rieger, Lamine Koivogui, N'Faly Magassouba, Barrè Soropogui, et al. 2014. "Emergence of Zaire Ebola Virus Disease in Guinea." New England Journal of Medicine 371 (15): 1418–1425. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1404505.

Baseler, Laura, Daniel S. Chertow, Karl M. Johnson, Heinz Feldmann, and David M. Morens. 2017. "The Pathogenesis of Ebola Virus Disease." Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 12 (1): 387–418. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100506.

Bausch, Daniel G. 2015. "Sequelae after Ebola Virus Disease: Even When It's over It's Not Over." The Lancet Infectious Diseases 15 (8): 865–66. https://doi.org/10.1016/s1473-3099(15)70165-9.

Bebell, Lisa M, Titilope Oduyebo, M D Mph, Laura E Riley, Massachusetts General Hospital, Massachusetts General, Hospital Global, et al. 2018. “Ebola Virus Disease and Pregnancy - A Review of the Current Knowledge of Ebola Virus Pathogenesis, Maternal and Neonatal Outcomes” 109 (5): 353–362. https://doi.org/10.1002/bdra.23558.Ebola.

Bell, Beth P., Inger K. Damon, Daniel B. Jernigan, Thomas A. Kenyon, Stuart T. Nichol, John P. O’Connor, and Jordan W. Tappero. 2016. “Overview, Control Strategies, and Lessons Learned in the CDC Response to the 2014–2016 Ebola Epidemic.” MMWR Supplements 65 (3): 4–11. https://doi.org/10.15585/mmwr.su6503a2.

Bermejo, Magdalena, José Domingo Rodríguez-Teijeiro, Germán Illera, Alex Barroso, Carles Vilà, and Peter D. Walsh. 2006. “Ebola Outbreak Killed 5000 Gorillas.” Science 314 (5805): 1564. https://doi.org/10.1126/science.1133105.

Bermejo M, Illera G, Sabater P. Animals and mushrooms consumed by bonobos (Pan paniscus): new records from Lilungu (Ikele), Zaire. International Journal of Primatology 1994; 15:879-898.

Bharat, T. A. M., T. Noda, J. D. Riches, V. Kraehling, L. Kolesnikova, S. Becker, Y. Kawaoka, and J. A. G. Briggs. 2012. “Structural Dissection of Ebola Virus and Its Assembly Determinants Using Cryo-Electron Tomography.” Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (11): 4275–4280. https://doi.org/10.1073/pnas.1120453109.

Blackley DJ, Wiley MR, Ladner JT, et al. Reduced evolutionary rate in reemerged Ebola virus transmission chains. Sci Adv 2016; 2: e1600378.

Blattner, Collin M Mortazie, Michael B. Murase, Jenny E. 2015. “Cutaneous Manifestations of the Ebola Virus.” Dermatology Online Journal, March 2015, Volume 21, Issue 3.

Boumandouki P, Formenty P, Epelboin A, et al. Clinical management of patients and deceased during the Ebola outbreak from October to December 2003 in Republic of Congo. Bull Soc Pathol Exot 2005; 98: 218-223.

Bowen, E T W, G Lloyd, W J Harris, G S Platt, A Baskerville, and E E Vella. 1977. "VIRAL HEMORRHAGIC FEVER IN SOUTHERN SUDAN AND NORTHERN ZAIRE: Preliminary Studies on the Aetiological Agent." The Lancet 309 (8011): 571–573. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)92001-3.

Brauburger, K., Y. Boehmann, Y. Tsuda, T. Hoenen, J. Olejnik, M. Schumann, H. Ebihara, and E. Muhlberger. 2014. "Analysis of the Highly Diverse Gene Borders in Ebola Virus Reveals a Distinct Mechanism of Transcriptional Regulation." Journal of Virology 88 (21): 12558–12571. https://doi.org/10.1128/jvi.01863-14.

Brauburger, Kristina, and Yannik Boehmann. 2016. "Transcriptional Regulation in Ebola Virus: Effects of Gene Border Structure and Regulatory Elements on Gene Expression and Polymerase Scanning Behavior." Journal of Virology 90 (4): 1898–1909. https://doi.org/10.1128/JVI.02341-15.

Brauburger, Kristina, Adam J. Hume, Elke Mühlberger, and Judith Olejnik. 2012. "Forty-Five Years of Marburg Virus Research." Viruses 4 (10): 1878–1927. https://doi.org/10.3390/v4101878.

Bray M, Hatfill S, Hensley L, and Huggins J. 2001. "Haematological, Biochemical and Coagulation Changes in Mice, Guinea-Pigs and Monkeys Infected with a Mouse-Adapted Variant of Ebola Zaire Virus." Journal of Comparative Pathology 125 (4): 243–53.

Broadhurst, M. Jana, Tim J.G. G Brooks, and Nira R. Pollock. 2016. "Diagnosis of Ebola Virus Disease: Past, Present, and Future." Clinical Microbiology Reviews 29 (4): 773–793. https://doi.org/10.1128/CMR.00003-16.

Breman JG, Johnson KM, van der Groen G, Robbins CB, Szczeniowski MV, Ruti K, et al.; Ebola Virus Study Teams. A search for Ebola virus in animals in the Democratic Republic of the Congo and Cameroon: ecologic, virologic, and serologic surveys, 1979–1980. J Infect Dis. 1999;179(Suppl 1): S139–47. http://dx.doi.org/10.1086/514278

Cantoni D, Hamlet A, Michaelis M, Wass MN, Rossman JS. Risks posed by Reston, the forgotten Ebola virus. mSphere. 2016 Nov-Dec; 1(6): e00322-16. Published online 2016 Dec 28. doi: 10.1128/mSphere.00322-16.

Carroll, Miles W., David A. Matthews, Julian A. Hiscox, Michael J. Elmore, Georgios Pollakis, Andrew Rambaut, Roger Hewson, et al. 2015. "Temporal and Spatial Analysis of the 2014-2015 Ebola Virus Outbreak in West Africa." Nature 524 (7563): 97–101. https://doi.org/10.1038/nature14594.

Carroll SA, Towner JS, Sealy TK, et al. Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole-genome sequences. J Virol 2013; 87: 2608–16.

Carter, Christoph, Kevan Akrami, Drew Hall, Davey Smith, and Eliah Aronoff-Spencer. 2017. "Lyophilized Visually Readable Loop-Mediated Isothermal Reverse Transcriptase Nucleic Acid Amplification Test for Detection Ebola Zaire RNA." Journal of Virological Methods 244 (June): 32–38. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.02.013.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2019. 40 Years of Ebola Virus Disease around the World. https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/chronology.html.

Centers for Disease Control (CDC). Ebola, Ebola Virus Disease Outbreaks. https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/index2018.html.

Cepheid. 2015. "Xpert ® Ebola Assay," no. March. https://doi.org/10.1103/PhysRevA.71.032504.

Chertow, Daniel S. 2019. "Understanding Long-Term Effects of Ebola Virus Disease." Nature Medicine, 4–5. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0444-0.

Christie, Athalia, Gloria J Davies-Wayne, Thierry Cordier-Lassalle, Thierry Cordier-Lasalle, David J Blackley, A Scott Laney, Desmond E Williams, et al. 2015. “Possible Sexual Transmission of Ebola Virus - Liberia, 2015.” MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report 64 (17): 479–81.

CHUGHTAI, A. A., M. BARNES, and C. R. MACINTYRE. 2016. “Persistence of Ebola Virus in Various Body Fluids during Convalescence: Evidence and Implications for Disease Transmission and Control.” Epidemiology and Infection 144 (08): 1652–60. https://doi.org/10.1017/s0950268816000054.

Clark, Danielle V., Hannah Kibuuka, Monica Millard, Salim Wakabi, Luswa Lukwago, Alison Taylor, Michael A. Eller, et al. 2015. “Long-Term Sequelae after Ebola Virus Disease in Bundibugyo, Uganda: A Retrospective Cohort Study.” The Lancet Infectious Diseases 15 (8): 905–12. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70152-0.

Columbia University’s Mailman School of Public Health. 2019. “Scientists Discover Ebola Virus in West African Bat -- ScienceDaily.” January 24, 2019. <www.sciencedaily.com/releases/2019/01/190124095156.htm>.

Corti D, Misasi J, Mulangu S, et al. Protective monotherapy against lethal Ebola virus infection by a potently neutralizing antibody. Science 2016; 351: 1339–42.

Cross, Robert W., Matthew L. Boisen, Molly M. Millett, DIana S. Nelson, Darin Oottamasathien, Jessica N. Hartnett, Abigal B. Jones, et al. 2016. “Analytical Validation of the ReEBOV Antigen Rapid Test for Point-of-Care Diagnosis of Ebola Virus Infection.” Journal of Infectious Diseases 214 (Suppl 3): S210–S217. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw293.

Cullen AC, Frey HC. Probabilistic techniques in exposure assessment. New York: Plenum Press; 1999. p. 81–159.

Curtis G. Hayes, James P. Burans, Thomas G. Ksiazek, Rennie A. Del Rosario, Mary Elizabeth G. Miranda, Corazon R. Manaloto, Agnes B. Barrientos, Celestina G. Robles, Manuel

M. Dayrit, Clarence J. Peters. 1992. “Outbreak of Fatal Illness among Captive Macaques in the Philippines Caused by an Ebola-Related Filovirus.” The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 46 (6): 664_671.

D. L. Heymann, J. S. Weisfeld, P. A. Webb, K. M. Johnson, T. Cairns, H. Berquist. 1980. “Ebola Hemorrhagic Fever: Tandala, Zaire, 1977–1978.” The Journal of Infectious Diseases 142 (3): 372–376. https://doi.org/10.1093/infdis/142.3.372.

D'arc M, Ayouba A, Esteban A, et al. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112: E1343-52.

Davey, R.A., O. Shtanko, M. Anantpadma, Y. Sakurai, K. Chandran, and W. Maury. 2017. “Mechanisms of Filovirus Entry.” In Marburg- and Ebolaviruses, edited by Elke Mühlberger, Lisa L. Hensley, and Jonathan S. Towner, 411:323–52. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/82_2017_14.

Davidson E, Bryan C, Fong RH, et al. Mechanism of binding to Ebola virus glycoprotein by the ZMapp, ZMAb, and MB-003 cocktail antibodies. J Virol 2015; 89: 10982–92.

Delignette-Muller ML, Dutang C. Fitdistrplus: An R Package for Fitting Distributions. Journal of Statistical Software 2015; 64: 1-34.

Den Boon, Saskia, Barbara J. Marston, Tolbert G. Nyenswah, Amara Jambai, Moumie Barry, Sakoba Keita, Kara Durski, et al. 2019. “Ebola Virus Infection Associated with Transmission from Survivors.” Emerging Infectious Diseases 25 (2): 240–46. https://doi.org/10.3201/eid2502.181011.

De Nys H, Mbala Kingebeni P, Keita A, et al. Large serological and molecular survey of Ebola viruses in a wide diversity of frugivorous and insectivorous bat species in Guinea, Cameroon and the Democratic Republic of Congo. Emerging Infectious Diseases Vol. 24, No. 12, December 2018.

de Wit E, Rosenke K, Fischer RJ, et al. Ebola laboratory response at the eternal love winning Africa campus, Monrovia, Liberia, 2014–2015. J Infect Dis 2016; 214 (suppl 3): S169–76.

Diallo, Boubacar, Daouda Sissoko, Nicholas J. Loman, Hadja Aïssatou Bah, Hawa Bah, Mary Claire Worrell, Lya Saidou Conde, et al. 2016. "Resurgence of Ebola Virus Disease in Guinea Linked to a Survivor with Virus Persistence in Seminal Fluid for More Than 500 Days." Clinical Infectious Diseases 63 (10): 1353–56. https://doi.org/10.1093/cid/ciw601.

Diallo, Mamadou Saliou Kalifa, Muriel Rabilloud, Ahidjo Ayouba, Abdoulaye Touré, Guillaume Thaurignac, Alpha Kabinet Keita, Christelle Butel, et al. 2019a. "Prevalence of Infection among Asymptomatic and Paucisymptomatic Contact Persons Exposed to Ebola Virus in Guinea: A Retrospective, Cross-Sectional Observational Study." The Lancet Infectious Diseases 19 (3): 308–16. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30649-2.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol Biol Evol 2012; 29: 1969–73.

Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evol Biol 2007; 7: 214.

Dudas G, Carvalho LM, Bedford T, Tatem AJ, Baele G, Faria NR, et al. Virus genomes reveal factors that spread and sustained the Ebola epidemic. Nature. 2017;544:309–15. http://dx.doi.org/ 10.1038/nature22040.

Dudas G, Rambaut A. Phylogenetic analysis of Guinea 2014 EBOV Ebolavirus outbreak. PLoS Curr2014May2;6.doi:10.1371/currents.outbreaks.84eefe5ce43ec9dc0bf0670f7b8b417d.

Ebola Outbreak Epidemiology Team. Outbreak of Ebola virus disease in the Democratic Republic of the Congo, April–May, 2018: an epidemiological study. Lancet 2018; 392: 213–21.

Emmie de Wit,1 Kyle Rosenke,1 Robert J. Fischer, et al. Ebola Laboratory Response at the Eternal Love Winning Africa Campus, Monrovia, Liberia, 2014–2015. The Journal of Infectious Diseases 2016;214(S3):S169–76.

Etard, Jean François, Mamadou Saliou Sow, Sandrine Leroy, Abdoulaye Touré, Bernard Taverne, Alpha Kabinet Keita, Philippe Msellati, et al. 2017. "Multidisciplinary Assessment of Post-Ebola Sequelae in Guinea (Postebogui): An Observational Cohort Study." The Lancet Infectious Diseases 17 (5): 545–52. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30516-3.

Falasca, L., C. Agrati, N. Petrosillo, A. Di Caro, M. R. Capobianchi, G. Ippolito, and M. Piacentini. 2015. "Molecular Mechanisms of Ebola Virus Pathogenesis: Focus on Cell Death." Cell Death and Differentiation 22 (8): 1250–1259. https://doi.org/10.1038/cdd.2015.67.

Fitzpatrick, Gabriel, Florian Vogt, Osman B.Moi Gbabai, Tom Decroo, Marian Keane, Hilde De Clerck, Allen Grolla, Raphael Brechard, Kathryn Stinson, and Michel Van Herp. 2015. "The Contribution of Ebola Viral Load at Admission and Other Patient Characteristics to Mortality in a Médecins Sans Frontières Ebola Case Management Centre, Kailahun, Sierra Leone, June-October 2014." Journal of Infectious Diseases 212 (10): 1752–1758. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv304.

Forbes, Kristian M., Paul W. Webala, Anne J. Jääskeläinen, Samir Abdurahman, Joseph Ogola, Moses M. Masika, Ilkka Kivistö, et al. 2019. "Bombali Virus in Mops Condylurus Bat, Kenya." Emerging Infectious Diseases 25 (5). https://doi.org/10.3201/eid2505.181666.

Formenty, Pierre, Christophe Boesch, Monique Wyers, Claudia Steiner, Franca Donati, Francine Walker, and Bernard Le Guenno. 1999. "Ebola Virus Outbreak among Wild

Chimpanzees Living in a Rain Forest of Cote d ' Ivoire." The Journal of Infectious Diseases 179 (Suppl 1): 120–126.

Geisbert, Thomas W., Lisa E. Hensley, Tom Larsen, Howard A. Young, Douglas S. Reed, Joan B. Geisbert, Dana P. Scott, Elliott Kagan, Peter B. Jahrling, and Kelly J. Davis. 2003. "Pathogenesis of Ebola Hemorrhagic Fever in Cynomolgus Macaques: Evidence That Dendritic Cells Are Early and Sustained Targets of Infection." American Journal of Pathology 163 (6): 2347–2370. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63591-2.

Geisbert, Thomas W., Howard A. Young, Peter B. Jahrling, Kelly J. Davis, Elliott Kagan, and Lisa E. Hensley. 2003. "Mechanisms Underlying Coagulation Abnormalities in Ebola Hemorrhagic Fever: Overexpression of Tissue Factor in Primate Monocytes/Macrophages Is a Key Event." The Journal of Infectious Diseases 188 (11): 1618–29. https://doi.org/10.1086/379724.

"Genus Thamnovirus.". Accessed May 19, 2019. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/filoviridae/1089/genus-thamnovirus.

Georges, Alain-Jean, Eric M. Leroy, André A. Renaut, Carol Tevi Benissan, René J. Nabias, Minh Trinh Ngoc, Paul I. Obiang, et al. 1999. "Ebola Hemorrhagic Fever Outbreaks in Gabon, 1994–1997: Epidemiologic and Health Control Issues." The Journal of Infectious Diseases 179 (s1): S65–S75. https://doi.org/10.1086/514290.

Georges-Courbot, Marie-Claude. 1997. "Isolation and Phylogenetic Characterization of Ebola Viruses Causing Different Outbreaks in Gabon." Emerging Infectious Diseases 3 (1): 59–62. https://doi.org/10.3201/eid0301.970107.

Germain M (1978) Collection of mammals and arthropods during the epidemic of haemorrhagic fever in Zaire. In: Pattyn S (ed) Ebola virus haemorrhagic fever. Netherlands: Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 185–9

Gilbert AT, Fooks AR, Hayman DT, Horton DL, Müller T, Plowright R, et al. Deciphering serology to understand the ecology of infectious diseases in wildlife. EcoHealth. 2013; 10:298–313. http://dx.doi.org/10.1007/s10393-013-0856-0.

Gire SK, Goba A, Andersen KG, et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. Science 2014; 345: 1369–72.

Glynn, Judith R., Hilary Bower, Sembia Johnson, Catherine F. Houlihan, Carla Montesano, Janet T. Scott, Malcolm G. Semple, et al. 2017a. "Asymptomatic Infection and Unrecognised Ebola Virus Disease in Ebola-Affected Households in Sierra Leone: A Cross-Sectional Study Using a New Non-Invasive Assay for Antibodies to Ebola Virus." The Lancet Infectious Diseases 17 (6): 645–53. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30111-1.

Glynn JR, Bower H, Johnson S, et al. Asymptomatic infection and unrecognised Ebola virus disease in Ebola-affected households in Sierra Leone: a cross-sectional study using a new non-invasive assay for antibodies to Ebola virus. Lancet Infect Dis. 2017; 17:645-653.

Goldstein, Tracey, Simon J. Anthony, Aiah Gbakima, Brian H. Bird, James Bangura, Alexandre Tremeau-Bravard, Manjunatha N. Belaganahalli, et al. 2018. "The Discovery of Bombali Virus Adds Further Support for Bats as Hosts of Ebolaviruses." Nature Microbiology 3 (10): 1084–89. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0227-2.

Gordon Smith, C.E., D.I.H. Simpson, E.T.W. Bowen, and I. Zlotnik. 1967. "FATAL HUMAN DISEASE FROM VERVET MONKEYS." Originally Published as Volume 2, Issue 7526 290 (7526): 1119–21. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(67)90621-6.

Green, Edward, Luke Hunt, J. C.Gareth Ross, Nina Marie Nissen, Tanya Curran, Anjna Badhan, Katherine A. Sutherland, et al. 2016. "Viraemia and Ebola Virus Secretion in Survivors of Ebola Virus Disease in Sierra Leone: A Cross-Sectional Cohort Study." The Lancet Infectious Diseases 16 (9): 1052–56. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30060-3.

Greninger, Alexander L., Samia N. Naccache, Scot Federman, Guixia Yu, Placide Mbala, Vanessa Bres, Doug Stryke, et al. 2015. “Rapid Metagenomic Identification of Viral Pathogens in Clinical Samples by Real-Time Nanopore Sequencing Analysis.” Genome Medicine 7 (1): 1–13. https://doi.org/10.1186/s13073-015-0220-9.

Greslan, Thierry de, Magali Billhot, Claire Rousseau, Christine Mac Nab, Ludovic Karkowski, Jean-Marie Cournac, Julien Bordes, et al. 2016. “Ebola Virus–Related Encephalitis.” Clinical Infectious Diseases 63 (8): 1076–1078. https://doi.org/10.1093/cid/ciw469.

Grolla, Allen, and James Strong. 2005. “Laboratory Diagnosis of Ebola and Marburg Hemorrhagic Fever.” Bull Soc Pathol Exot 98 (3): 205–209.

Gsell PS, Camacho A, Kucharski AJ, et al. Ring vaccination with rVSV-ZEBOV under expanded access in response to an outbreak of Ebola virus disease in Guinea, 2016: an operational and vaccine safety report. Lancet Infect Dis **2017**; 17:1276–84.

Guichet E, Serrano L, Laurent C, Eymard-Duvernay S, Kuaban C, Vidal L, et al. Comparison of different nucleic acid preparation methods to improve specific HIV-1 RNA isolation for viral load testing on dried blood spots. J Virol Methods. 2018; 251:75–9. http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.10.014.

Han BA, Schmidt JP, Alexander LW, Bowden SE, Hayman DT, Drake JM. Undiscovered bat hosts of filoviruses. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004815. http://dx.doi.org/10.1371/ journal. pntd.0004815.

Hartley, Mary Anne, Alyssa Young, Anh Minh Tran, Harry Henry Okoni-Williams, Mohamed Suma, Brooke Mancuso, Ahmed Al-Dikhari, and Mohamed Faouzi. 2017. “Predicting Ebola Severity: A Clinical Prioritization Score for Ebola Virus Disease.” PLoS Neglected Tropical Diseases 11 (2): 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005265.

Hayman, David T. S., Petra Emmerich, Meng Yu, Lin-Fa Wang, Richard Suu-Ire, Anthony R. Fooks, Andrew A. Cunningham, and James L. N. Wood. 2010. "Long-Term Survival of an Urban Fruit Bat Seropositive for Ebola and Lagos Bat Viruses." Edited by Bradley S. Schneider. PLoS ONE 5 (8): e11978. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011978.

Hayman DT, Yu M, Crameri G, Wang LF, Suu-Ire R, Wood JL, et al. Ebola virus antibodies in fruit bats, Ghana, West Africa. Emerg Infect Dis. 2012;18:1207–9. http://dx.doi.org/10.3201/ eid1807.111654.

He B, Feng Y, Zhang H, Xu L, Yang W, Zhang Y, et al. Filovirus RNA in fruit bats, China. Emerg Infect Dis. 2015; 21:1675–7. http://dx.doi.org/10.3201/eid2109.150260.

Henao-Restrepo AM, Longini IM, Egger M, et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. Lancet **2015**; 386:857–66.

Henao-Restrepo, Ana Maria, Anton Camacho, Ira M. Longini, Conall H. Watson, W. John Edmunds, Matthias Egger, Miles W. Carroll, et al. 2017. "Efficacy and Effectiveness of an RVSV-Vectored Vaccine in Preventing Ebola Virus Disease: Final Results from the Guinea Ring Vaccination, Open-Label, Cluster-Randomised Trial (Ebola Ça Suffit!)." The Lancet 389 (10068): 505–518. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32621-6.

Hensley L, Young H, Jahrling P, and Geisbert T. 2002. "Proinflammatory Response during Ebola Virus Infection of Primate Models: Possible Involvement of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily." Immunology Letters 80 (3): 169–79.

Hinkley DV. Inference about the change-point in a sequence of random variables. Biometrika. 1970;57:1–17. http://dx.doi.org/ 10.1093/biomet/57.1.1.

Hoenen, Thomas, Allison Groseth, Kyle Rosenke, Robert J. Fischer, Andreas Hoenen, Seth D. Judson, Cynthia Martellaro, et al. 2016. "Nanopore Sequencing as a Rapidly

Deployable Ebola Outbreak Tool." Emerging Infectious Diseases 22 (2): 331–334. https://doi.org/10.3201/eid2202.151796.

Holmes EC, Dudas G, Rambaut A, Andersen KG. The evolution of Ebola virus: insights from the 2013–2016 epidemic. Nature 2016; 538: 193–200.

Huijbregts, Bas, Pauwel De Wachter, Louis Sosthène Ndong Obiang, and Marc Ella Akou. 2003. "Ebola and the Decline of Gorilla Gorilla Gorilla and Chimpanzee Pan Troglodytes Populations in Minkebe Forest, North-Eastern Gabon." Oryx 37 (04). https://doi.org/10.1017/S0030605303000802.

Hunt, Luke, Ankur Gupta-Wright, Victoria Simms, Fayia Tamba, Victoria Knott, Kongoneh Tamba, Saidu Heisenberg-Mansaray, et al. 2015. "Clinical Presentation, Biochemical, and Haematological Parameters and Their Association with Outcome in Patients with Ebola Virus Disease: An Observational Cohort Study." The Lancet Infectious Diseases 15 (11): 1292–1299. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00144-9.

Hunt, Luke, and Victoria Knott. 2016. "Serious and Common Sequelae after Ebola Virus Infection." The Lancet Infectious Diseases 16 (3): 270–71. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00546-0.

Ikegami, Tetsuro, Masayuki Saijo, Masahiro Niikura, Mary E G Miranda, Alan B Calaor, Marvin Hernandez, Daria L Manalo, et al. 2002. Development of an Immunofluorescence Method for the Detection of Antibodies to Ebola Virus Subtype Reston by the Use of Recombinant Nucleoprotein-Expressing HeLa Cells. Microbiol. Immunol., 46(9), 633—638, 2002. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02745.x.

Ilhem Messaoudi, Gaya K. Amarasinghe, and Christopher F. Basler. 2015. "Filovirus Pathogenesis and Immune Evasion: Insights from Ebola Virus and Marburg Virus". Nat Rev Microbiol. 2015 Nov; 13(11): 663–676. doi: 10.1038/nrmicro3524

"International Committee on Taxonomy of Viruses 2018.". Accessed May 19, 2019. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/filoviridae/1086/genus-ebolavirus.

International Society for Infectious Diseases, ProMED-mail. Ebola update (57): Democratic Republic of Congo (North Kivu). 2018. http://www.promedmail.org/post/20180801.5941427 (accessed March 26, 2019).

International Society for Infectious Diseases, ProMED-mail. Ebola update (60): Democratic Republic of Congo (North Kivu) case update, response, risk. 2018. http://www.promedmail.org/post/20180805.5948198 (accessed March 21, 2019).

International Society for Infectious Diseases, ProMED-mail. Ebola update (84): Democratic Republic of Congo (North Kivu) case update, risk health workers. 2018. http://www.promedmail.org/post/20180908.6016025 (accessed March 28, 2019).

Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. J Mol Evol. 1991;32:128–44. http://dx.doi.org/ 10.1007/BF02515385

Jacobs, Michael, Alison Rodger, David J. Bell, Sanjay Bhagani, Ian Cropley, Ana Filipe, Robert J. Gifford, et al. 2016a. "Late Ebola Virus Relapse Causing Meningoencephalitis: A Case Report." The Lancet 388 (10043): 498–503. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30386-5.

Jahrling, P.B., T.W. Geisbert, E.D. Johnson, C.J. Peters, D.W. Dalgard, and W.C. Hall. 1990. "Preliminary Report: Isolation of Ebola Virus from Monkeys Imported to USA." The Lancet 335 (8688): 502–5. https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)90737-P.

James, Ameh S., Shawn Todd, Nina M. Pollak, Glenn A. Marsh, and Joanne Macdonald. 2018. "Ebolavirus Diagnosis Made Simple, Comparable and Faster than Molecular

Detection Methods: Preparing for the Future." Virology Journal 15 (1): 75. https://doi.org/10.1186/s12985-018-0985-8.

Jean Louis, Frantz, Jennifer Y. Huang, Yacouba K. Nebie, Lamine Koivogui, Gayatri Jayaraman, Nadine Abiola, Amanda Vansteelandt, et al. 2017. "Implementation of Broad Screening with Ebola Rapid Diagnostic Tests in Forécariah, Guinea." African Journal of Laboratory Medicine 6 (1): 1–7. https://doi.org/10.4102/ajlm.v6i1.484.

J.M., Morvan, Deubel V., Gounon P., Nakoune E., Barriere P., Murri S., Perpete O., et al. 1999. "Identification of Ebola Virus Sequences Present as RNA or DNA in Organs of Terrestrial Small Mammals of the Central African Republic." Microbes and Infection 1 (14): 1193–1201.

Johnson BK, Gitau LG, Gichogo A, et al. Marburg, Ebola and Rift Valley Fever virus antibodies in East African primates. Trans R Soc Trop Med Hyg 1982;76(3):307-10.

Johnson ED1, Johnson BK, Silverstein D, Tukei P, Geisbert TW, Sanchez AN, Jahrling PB. 1996. "Characterization of a New Marburg Virus Isolated from a 1987 Fatal Case in Kenya." Arch Virol Suppl, no. 11: 101–4.

Jonathan S. Towner, Pierre E. Rollin, Daniel G. Bausch, Anthony Sanchez, Sharon M. Crary, Martin Vincent, William F. Lee, Christina F. Spiropoulou, Thomas G. Ksiazek, Mathew Lukwiya, Felix Kaducu, Robert Downing, and Stuart T. Nichol. 2004. "Rapid Diagnosis of Ebola Hemorrhagic Fever by Reverse Transcription-PCR in an Outbreak Setting and Assessment of Patient Viral Load as a Predictor of Outcome." Journal of Virology 0 (8): 4330–4341. https://doi.org/10.1128/JVI.78.8.4330.

Jones ME, Schuh AJ, Amman BR, Sealy TK, Zaki SR, Nichol ST, et al. Experimental inoculation of Egyptian rousette bats (Rousettus aegyptiacus) with viruses of the Ebolavirus and Marburgvirus genera. Viruses. 2015; 7:3420–42. http://dx.doi.org/10.3390/v7072779.

Joseph Prescott, Trenton Bushmaker, Robert Fischer, Kerri Miazgowicz, Seth Judson, Vincent J. Munster. Postmortem Stability of Ebola Virus. Emerg Infect Dis. 2015 May; 21(5): 856–859. doi: 10.3201/eid2105.150041

Justus Nsio, Jimmy Kapetshi, Sheila Makiala, et al. 2017 Outbreak of Ebola Virus Disease in Northern Democratic Republic of Congo. The Journal of Infectious Diseases 2019; XX(XX):1–6. doi: 10.1093/infdis/jiz107

Kamins AO, Rowcliffe JM, Ntiamoa-Baidu Y, Cunningham AA, Wood JL, Restif O. Characteristics and risk perceptions of Ghanaians potentially exposed to bat-borne zoonoses through bushmeat. EcoHealth. 2015;12:104–20. http://dx.doi.org/10.1007/ s10393-014-0977-0.

Kaner, Jolie, and Sarah Schaack. 2016. "Understanding Ebola: The 2014 Epidemic." Globalization and Health 12 (1): 53. https://doi.org/10.1186/s12992-016-0194-4.

Kang, Ji Hoon, Weon Young Chang, Sungwook Choi, Joseph Rho, and Keun Hwa Lee. 2015. "The 2013-2015 Ebola Outbreak in West Africa." Journal of Bacteriology and Virology 45 (4): 304–313. https://doi.org/10.4167/jbv.2015.45.4.304.

Kennedy, Stephen B, Fatorma Bolay, Mark Kieh, Greg Grandits, Moses Badio, Ripley Ballou, Risa Eckes, et al. 2017. "Phase 2 Placebo-Controlled Trial of Two Vaccines to Prevent Ebola in Liberia." New England Journal of Medicine 377 (15): 1438–1447. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614067.

Khan, Ali S., F. Kweteminga Tshioko, David L. Heymann, Bernard Le Guenno, Pierre Nabeth, Barbara Kerstiëns, Yon Fleerackers, et al. 1999. "The Reemergence of Ebola Hemorrhagic Fever, Democratic Republic of the Congo, 1995." The Journal of Infectious Diseases 179 (s1): S76–S86. https://doi.org/10.1086/514306.

Kiley, M. P., E. T.W. Bowen, G. Eddy, M. Isaäcson, K. M. Johnson, J. B. McCormick, F. Murphy, et al. 1982. "Filoviridae: A Taxonomic Home for Marburg and Ebola Viruses?" Intervirology 18 (1–2): 24–32. https://doi.org/10.1159/000149300.

Killick R, Eckley IA. Changepoint: An R package for changepoint analysis. J Stat Soft 2014; 58 (3): 1-19. doi: 10.18637/jss.v058.i03

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989; 86:6196–200. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196

Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics 2007; 23: 1289–91. doi:10.1093/bioinformatics/btm091

Ksiazek, T. G., P. E. Rollin, P. B. Jahrling, E. Johnson, D. W. Dalgard, and C. J. Peters. 1992. "Enzyme Immunosorbent Assay for Ebola Virus Antigens in Tissues of Infected Primates." Journal of Clinical Microbiology 30 (4): 947–950.

Ksiazek, T. G., P. E. Rollin, A. J. Williams, D. S. Bressler, M. L. Martin, R. Swanepoel, F. J. Burt, et al. 1999. "Clinical Virology of Ebola Hemorrhagic Fever (EHF): Virus, Virus Antigen, and IgG and IgM Antibody Findings among EHF Patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995." The Journal of Infectious Diseases 179 (s1): S177–S187. https://doi.org/10.1086/514321.

Ksiazek, Thomas G., Cynthia P. West, Pierre E. Rollin, Peter B. Jahrling, and C. J. Peters. 1999. "ELISA for the Detection of Antibodies to Ebola Viruses." The Journal of Infectious Diseases 179 (s1): S192–S198. https://doi.org/10.1086/514313.

Kugelman, Jeffrey R., Michael R. Wiley, Suzanne Mate, Jason T. Ladner, Brett Beitzel, Lawrence Fakoli, Fahn Taweh, et al. 2015. "Monitoring of Ebola Virus Makona Evolution through Establishment of Advanced Genomic Capability in Liberia." Emerging Infectious Diseases 21 (7): 1135–1143. https://doi.org/10.3201/eid2107.150522.

Kuhn, Jens H. Filoviruses: A Compendium of 40 Years of Epidemiological, Clinical, and Laboratory Studies. Arch Virol Suppl. 2008;20:13-360.

Kuhn, Jens H, Stephan Becker, Thomas W Geisbert, Karl M Johnson, Stuart T Nichol, and Clarence J Peters. 2011. "Proposal for a Revised Taxonomy of the Family Filoviridae: Classification, Names of Taxa and Viruses, and Virus Abbreviations". Arch Virol. 2010 Dec; 155 (12): 2083–2103. https://doi.org/10.1007/s00705-010-0814-x.

Kuhn JH, Andersen KG, Baize S, et al. Nomenclature and database compatible names for the two Ebola virus variants that emerged in Guinea and the Democratic Republic of the Congo in 2014. Viruses **2014**; 6:4760–99.

Kuhn JH. Ebolavirus and marburgvirus infections. In: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, eds. Harrison's principles of internal medicine. 20th edn. Columbus: McGraw-Hill Education, 2018: 1509–15.

Kuhn JH. Guide to the correct use of filoviral nomenclature. Curr Top Microbiol Immunol 2017; 411: 447–60.

Kurosaki, Yohei, N'Faly Magassouba, Hadja Aïssatou Bah, Barré Soropogui, Amadou Doré, Fodé Kourouma, Mahamoud Sama Cherif, Sakoba Keita, and Jiro Yasuda. 2016. "Deployment of a Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for Ebola Virus Surveillance in Remote Areas in Guinea." Journal of Infectious Diseases 214 (suppl 3): S229–33. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw255.

Kurosaki, Yohei, N'Faly Magassouba, Olamide K. Oloniniyi, Mahamoud S. Cherif, Saori Sakabe, Ayato Takada, Kenji Hirayama, and Jiro Yasuda. 2016. "Development and Evaluation of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay Coupled with a Portable Device for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Disease in Guinea." Edited by Thomas Geisbert. PLOS Neglected Tropical Diseases 10 (2): e0004472. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004472.

Kuzmin IV, Niezgoda M, Franka R, Agwanda B, Markotter W, Breiman RF, et al. Marburg virus in fruit bat, Kenya. Emerg Infect Dis. 2010; 16:352–4. http://dx.doi.org/10.3201/eid1602.091269.

La Vega, Marc-Antoine de, Gary Wong, Gary P. Kobinger, and Xiangguo Qiu. 2014. “The Multiple Roles of SGP in Ebola Pathogenesis.” Viral Immunology 28 (1): 3–9. https://doi.org/10.1089/vim.2014.0068.

Lahm, Sally A., Maryvonne Kombila, Robert Swanepoel, and Richard F.W. Barnes. 2007. “Morbidity and Mortality of Wild Animals in Relation to Outbreaks of Ebola Haemorrhagic Fever in Gabon, 1994–2003.” Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 101 (1): 64–78. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.07.002.

Laing ED, Mendenhall IH, Linster M, Low DHW, Chen Y, Yan L, et al. Serologic evidence of fruit bat exposure to filoviruses, Singapore, 2011–2016. Emerg Infect Dis. 2018; 24:114–7. http://dx.doi.org/10.3201/eid2401.170401

Lam TT, Zhu H, Chong YL, Holmes EC, Guan Y. Puzzling origins of the Ebola outbreak in the Democratic Republic of the Congo, 2014. J Virol. 2015 Oct;89(19):10130-2. doi: 10.1128/JVI.01226-15. Epub 2015 Jul 22.

Lardeux F, Torrico G, Aliaga C. Calculation of the ELISA’s cut-off based on the change-point analysis method for detection of Trypanosoma cruzi infection in Bolivian dogs in the absence of controls. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016; 111:501–4. http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160119. Killick R, Eckley IA. changepoint: An R package for changepoint analysis. J Stat Softw. 2014;58:1–19. http://dx.doi.org/10.18637/ jss. v058.i03.

Ledgerwood, Julie E, Adam D DeZure, Daphne A Stanley, Emily E Coates, Laura Novik, Mary E Enama, Nina M Berkowitz, et al. 2014. “Chimpanzee Adenovirus Vector Ebola Vaccine.” New England Journal of Medicine 376 (10): 928–938. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1410863.

Leendertz SA, Gogarten JF, Düx A, Calvignac-Spencer S, Leendertz FH. Assessing the evidence supporting fruit bats as the primary reservoirs for Ebola viruses. EcoHealth. 2016; 13:18–25. http://dx.doi.org/10.1007/s10393-015-1053-0.

Lefever S, Pattyn F, Hellemans J, Vandesompele J. Single-nucleotide polymorphisms and other mismatches reduce performance of quantitative PCR assays. Clin Chem. 2013 Oct;59(10):1470-80. doi: 10.1373/clinchem.2013.203653. Epub 2013 Sep 6.

Leirs, Herwig, James N. Mills, John W. Krebs, James E. Childs, Dudu Akaibe, Neal Woollen, George Ludwig, Clarence J. Peters, Thomas G. Ksiazek, and other study group members. 1999. "Search for the Ebola Virus Reservoir in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: Reflections on a Vertebrate Collection." The Journal of Infectious Diseases 179 (s1): S155–63. https://doi.org/10.1086/514299.

Leroy, E M, S Baize, V E Volchkov, M Capron, P Debré, J B Mccormick, and A J Georges. 2000a. "Human Asymptomatic Ebola Infection and Strong Inflammatory Response." The Lancet 355: 2210–2215. doi:10.1016/s0140-6736(00)02405-3

Leroy, Eric M., Alain Epelboin, Vital Mondonge, Xavier Pourrut, Jean-Paul Gonzalez, Jean-Jacques Muyembe-Tamfum, and Pierre Formenty. 2009. "Human Ebola Outbreak Resulting from Direct Exposure to Fruit Bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007." Vector-Borne and Zoonotic Diseases 9 (6): 723–728. https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0167.

Leroy, Eric M., Brice Kumulungui, Xavier Pourrut, Pierre Rouquet, Alexandre Hassanin, Philippe Yaba, André Délicat, Janusz T. Paweska, Jean-Paul Gonzalez, and Robert Swanepoel. 2005. "Fruit Bats as Reservoirs of Ebola Virus." Nature 438 (7068): 575–76. https://doi.org/10.1038/438575a.

Leroy E, Gonzalez JP, Pourrut X. Ebolavirus and other filoviruses. Curr Top Microbiol Immunol. 2007;315:363–87. http://dx.doi.org/ 10.1007/978-3-540-70962-6_15.

Leroy, Eric M., Pierre Rouquet, Pierre Formenty, Sandrine Souquière, Annelisa Kilbourne, Jean-Marc Froment, Magdalena Bermejo, et al. 2004. "Multiple Ebola Virus Transmission Events and Rapid Decline of Central African Wildlife." Science 303 (5656): 387. https://doi.org/10.1126/science.1092528.

Leroy EM, Telfer P, Kumulungui B, et al. A serological survey of Ebola virus infection in central African nonhuman primates. J Infect Dis 2004; 190: 1895-1899. doi:10.1086/425421

Lieselotte Cnops, Peter Van den Eede, James Pettitt, et al. Development, Evaluation, and Integration of a Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Diagnostic Test for Ebola Virus on a Molecular Diagnostics Platform. J Infect Dis. 2016 Oct 15; 214(Suppl 3): S192–S202. doi : 10.1093/infdis/jiw150

Li, Jing Xin, Li Hua Hou, Fan Yue Meng, Shi Po Wu, Yue Mei Hu, Qi Liang, Kai Chu, et al. 2017. "Immunity Duration of a Recombinant Adenovirus Type-5 Vector-Based Ebola Vaccine and a Homologous Prime-Boost Immunisation in Healthy Adults in China: Final Report of a Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1 Trial." The Lancet Global Health 5 (3): e324–e334. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30367-9.

Li Y, Ndjango JB, Learn GH, et al. Eastern chimpanzees, but not bonobos, represent a simian immunodeficiency virus reservoir. J Virol. 2012 Oct;86(19):10776-91. doi: 10.1128/JVI.01498-12. Epub 2012 Jul 25.

Lüdtke, Anja, Paula Ruibal, David M. Wozniak, Elisa Pallasch, Stephanie Wurr, Sabrina Bockholt, Sergio Gómez-Medina, et al. 2017. "Ebola Virus Infection Kinetics in Chimeric Mice Reveal a Key Role of T Cells as Barriers for Virus Dissemination." Scientific Reports 7 (1): 43776. https://doi.org/10.1038/srep43776.

M. Johnson, K., P. A. Webb, J. V. Lange, and F. A. Murphy. 1977a. "Isolation and Partial Characterisation of a New Virus Causing Acute Haemorrhagic Fever in Zaire." The Lancet 309 (5): 569–571. DOI: 10.1016/s0140-6736(77)92000-1

Macintyre, C. Raina, and Abrar Ahmad Chughtai. 2016. "Recurrence and Reinfection-a New Paradigm for the Management of Ebola Virus Disease." International Journal of Infectious Diseases 43: 58–61. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.12.011.

MacNeil, Adam, Eileen C. Farnon, Oliver W. Morgan, Philip Gould, Tegan K. Boehmer, David D. Blaney, Petra Wiersma, et al. 2011. “Filovirus Outbreak Detection and Surveillance: Lessons from Bundibugyo.” Journal of Infectious Diseases 204 (SUPPL. 3): 761–767. https://doi.org/10.1093/infdis/jir294.

MacNeil, Adam, Eileen C. Farnon, Joseph Wamala, Sam Okware, Deborah L. Cannon, Zachary Reed, Jonathan S. Towner, et al. 2010. “Proportion of Deaths and Clinical Features in Bundibugyo Ebola Virus Infection, Uganda.” Emerging Infectious Diseases 16 (12): 1969–1972. https://doi.org/10.3201/eid1612.100627.

MacNeil, Adam, Zachary Reed, and Pierre E. Rollin. 2011. “Serologic Cross-Reactivity of Human IgM and IgG Antibodies to Five Species of Ebola Virus.” PLoS Neglected Tropical Diseases 5 (6). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001175.

MacNeil, Adam, Trevor Shoemaker, Stephen Balinandi, Shelley Campbell, Joseph Francis Wamala, Laura K. McMullan, Robert Downing, et al. 2012. “Reemerging Sudan Ebola Virus Disease in Uganda, 2011.” Emerging Infectious Diseases 18 (9): 1480–1483. https://doi.org/10.3201/eid1809.111536.

Maganga, G.D., J. Kapetshi, N. Berthet, B.K. Ilunga, F. Kabange, P.M. Kingebeni, V. Mondonge, et al. 2014. “Ebola Virus Disease in the Democratic Republic of Congo.” New England Journal of Medicine 371 (22). https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411099.

Malvy, Denis, Anita K. McElroy, Hilde de Clerck, Stephan Günther, and Johan van Griensven. 2019a. “Ebola Virus Disease.” The Lancet 393 (10174): 936–948. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)33132-5.

Mari Saez, A., S. Weiss, K. Nowak, V. Lapeyre, F. Zimmermann, A. Dux, H. S. Kuhl, et al. 2015. “Investigating the Zoonotic Origin of the West African Ebola Epidemic.” EMBO Molecular Medicine 7 (1): 17–23. https://doi.org/10.15252/emmm.201404792.

Mate, Suzanne E, Jeffrey R Kugelman, Tolbert G Nyenswah, Jason T Ladner, Michael R Wiley, Thierry Cordier-Lassalle, Athalia Christie, et al. 2015. “Molecular Evidence of Sexual

Transmission of Ebola Virus." New England Journal of Medicine 373 (25): 2448–2454. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1509773.

Mbala-Kingebeni, Placide, Amuri Aziza, Nicholas Di Paola, Michael R Wiley, Sheila Makiala-Mandanda, Katie Caviness, Catherine B Pratt, et al. 2019a. "Medical Countermeasures during the 2018 Ebola Virus Disease Outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces of the Democratic Republic of the Congo: A Rapid Genomic Assessment." The Lancet Infectious Diseases 3099 (19): 1–10. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30118-5.

Mbala-Kingebeni, Placide, Catherine B Pratt, Michael R Wiley, Moussa M Diagne, Sheila Makiala-Mandanda, Amuri Aziza, Nicholas Di Paola, et al. 2019. "2018 Ebola Virus Disease Outbreak in Équateur Province, Democratic Republic of the Congo: A Retrospective Genomic Characterisation." The Lancet Infectious Diseases 3099 (19): 1–7. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30124-0.

Mbala-Kingebeni, Placide, Christian Julian Villabona-Arenas, Nicole Vidal, Jacques Likofata, Justus Nsio-Mbeta, Sheila Makiala-Mandanda, Daniel Mukadi, et al. 2019. "Rapid Confirmation of the Zaire Ebola Virus in the Outbreak of the Equateur Province in the Democratic Republic of Congo: Implications for Public Health Interventions." Clinical Infectious Diseases 68 (2): 330–333. https://doi.org/10.1093/cid/ciy527.

McElroy, Anita K, Elke Mühlberger, and César Muñoz-Fontela. 2018. "Immune Barriers of Ebola Virus Infection." Current Opinion in Virology 28 (February): 152–60. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.01.010.

Milligan, Iain D, Malick M Gibani, Richard Sewell, Elizabeth A Clutterbuck, Danielle Campbell, Emma Plested, Elizabeth Nuthall, et al. 2016. "Safety and Immunogenicity of Novel Adenovirus Type 26– and Modified Vaccinia Ankara–Vectored Ebola Vaccines: A Randomized Clinical TrialSafety and Immunogenicity of 2 Ebola VaccinesSafety and Immunogenicity of 2 Ebola Vaccines." JAMA 315 (15): 1610–1623. https://doi.org/10.1001/jama.2016.4218.

Ministère de la Santé, Direction de Lutte contre la Maladie. Rapport de l'épidémie de la maladie à virus Ebola, zone de santé de Likati, RDC 2017.

Miranda, Mary Elizabeth G, and Noel Lee J Miranda. 2011. "Reston Ebolavirus in Humans and Animals in the Philippines: A Review." Journal of Infectious Diseases 204 (SUPPL. 3): 757–760. https://doi.org/10.1093/infdis/jir296.

Miranda, MaryE.G., MarkE. White, ManuelM. Dayrit, CurtisG. Hayes, ThomasG. Ksiazek, and JamesP. Burans. 1991. "Seroepidemiological Study of Filovirus Related to Ebola in the Philippines." The Lancet 337 (8738): 425–426. https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91199-5.

Misasi J, Gilman MSA, Kanekiyo M, et al. Structural and molecular basis for Ebola virus neutralization by protective human antibodies. Science. 2016 Mar 18;351(6279):1343-6. doi: 10.1126/science.aad6117.

Monleau M, Montavon C, Laurent C, Segondy M, Montes B, Delaporte E, et al. Evaluation of different RNA extraction methods and storage conditions of dried plasma or blood spots for human immunodeficiency virus type 1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance testing. J Clin Microbiol. 2009; 47:1107–18. http://dx.doi.org/10.1128/ JCM.02255-08

Mulangu, Sabue, Vivian H. Alfonso, Nicole A. Hoff, Reena H. Doshi, Prime Mulembakani, Neville K. Kisalu, Emile Okitolonda-Wemakoy, et al. 2018. "Serologic Evidence of Ebolavirus Infection in a Population with No History of Outbreaks in the Democratic Republic of the Congo." Journal of Infectious Diseases 217 (4): 529–537. https://doi.org/10.1093/infdis/jix619.

Mulangu, Sabue, Matthias Borchert, Janusz Paweska, Antoine Tshomba, Afongenda Afounde, Amayo Kulidri, Robert Swanepoel, Jean-Jacques Muyembe-Tamfum, and Patrick Van der Stuyft. 2016. "High Prevalence of IgG Antibodies to Ebola Virus in the Efé Pygmy Population in the Watsa Region, Democratic Republic of the Congo." BMC Infectious Diseases 16 (1): 263. https://doi.org/10.1186/s12879-016-1607-y.

Mupapa, Kibadi, Woliere Mukundu, Mpia Ado Bwaka, Mungala Kipasa, Ann De Roo, Kivudi Kuvula, Kapay Kibadi, et al. 1999. “Ebola Hemorrhagic Fever and Pregnancy.” The Journal of Infectious Diseases 179 (s1): S11–S12. https://doi.org/10.1086/514289.

Mylne A, Brady OJ, Huang Z, Pigott DM, Golding N, Kraemer MU, et al. A comprehensive database of the geographic spread of past human Ebola outbreaks. Sci Data. 2014; 1:140042. http://dx.doi.org/10.1038/sdata.2014.42.

Negredo, Ana, Gustavo Palacios, Sonia Vázquez-Morón, Félix González, Hernán Dopazo, Francisca Molero, Javier Juste, et al. 2011. “Discovery of an Ebolavirus-like Filovirus in Europe.” PLoS Pathogens 7 (10): 1–8. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002304.

Nebehay S. Doctor in eastern Congo contracts Ebola in ‘dreaded’ scenario: WHO. Reuters (Geneva), Aug 24, 2018. https://uk.reuters.com/article/us-health-ebola-congo-who/doctor-in-eastern-congocontracts-ebola-in-dreaded-scenario-who-idUKKCN1L90VC (accessed March 21, 2019).

Ogawa H, Miyamoto H, Nakayama E, Yoshida R, Nakamura I, Sawa H, et al. Seroepidemiological prevalence of multiple species of filoviruses in fruit bats (Eidolon helvum) migrating in Africa. J Infect Dis. 2015;212(Suppl 2):S101–8. http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiv063.

Okware, S. I., F. G. Omaswa, S. Zaramba, A. Opio, J. J. Lutwama, J. Kamugisha, E. B. Rwaguma, P. Kagwa, and M. Lamunu. 2002. “An Outbreak of Ebola in Uganda.” Tropical Medicine and International Health 7 (12): 1068–1075. https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2002.00944.x.

Olival, Kevin J., Ariful Islam, Meng Yu, Simon J. Anthony, Jonathan H. Epstein, Shahneaz Ali Khan, Salah Uddin Khan, et al. 2013. “Ebola Virus Antibodies in Fruit Bats, Bangladesh.” Emerging Infectious Diseases 19 (2): 270–73. https://doi.org/10.3201/eid1902.120524.

Oloniniyi, O, Y Kurosaki, H Miyamoto, A Takada, and J Yasuda. 2017. “Rapid Detection of All Known Ebolavirus Species by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP). J Virol Methods. 2017 Aug;246:8-14. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.03.011. Epub 2017 Mar 27.

Park, Daniel J., Gytis Dudas, Shirlee Wohl, Augustine Goba, Shannon L.M. Whitmer, Kristian G. Andersen, Rachel S. Sealfon, et al. 2015. “Ebola Virus Epidemiology, Transmission, and Evolution during Seven Months in Sierra Leone.” Cell 161 (7): 1516–1526. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.007.

Pattyn, S, G.vander Groen, W Jacob, P Piot, and G Courteille. 1977a. “ISOLATION OF MARBURG-LIKE VIRUS FROM A CASE OF HEMORRHAGIC FEVER IN ZAIRE.” The Lancet 309 (8011): 573–574. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)92002-5.

Paweska JT, Storm N, Grobbelaar AA, Markotter W, Kemp A, Jansen van Vuren P. Experimental inoculation of Egyptian fruit bats (Rousettus aegyptiacus) with Ebola virus. Viruses. 2016; 8:29. http://dx.doi.org/10.3390/v8020029.

Peel AJ, McKinley TJ, Baker KS, Barr JA, Crameri G, Hayman DT, et al. Use of cross-reactive serological assays for detecting novel pathogens in wildlife: assessing an appropriate cutoff for henipavirus assays in African bats. J Virol Methods. 2013; 193:295– 303. http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.06.030.

Peeters M, Courgnaud V, Abela B, et al. Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. Emerg Infect Dis. 2002 May; 8(5): 451–457. doi: 10.3201/eid0805.01-0522

Pigott DM, Deshpande A, Letourneau I, Morozoff C, Reiner RC Jr, Kraemer MUG, et al. Local, national, and regional viral haemorrhagic fever pandemic potential in Africa: a multistage analysis. Lancet. 2017;390:2662–72. http://dx.doi.org/10.1016/ S0140-6736(17)32092-5.

Pigott DM, Golding N. Mapping the zoonotic niche of Ebola virus disease in Africa. Elife. 2014 Sep 8;3:e04395. doi: 10.7554/eLife.04395.

Pigott DM, Millear AI, Earl L, Morozoff C, Han BA, Shearer FM, et al. Updates to the zoonotic niche map of Ebola virus disease in Africa. eLife. 2016;5:e16412. http://dx.doi.org/10.7554/eLife.16412.

Pinsky BA, Sahoo MK, Sandlund J, et al. Analytical performance characteristics of the Cepheid GeneXpert Ebola assay for the detection of Ebola virus. PLoS One. 2015 Nov 12;10(11):e0142216. doi: 10.1371/journal.pone.0142216. eCollection 2015.

Pourrut, X., A. Délicat, P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, J.-P. Gonzalez, and E. M. Leroy. 2007. "Spatial and Temporal Patterns of Zaire Ebolavirus Antibody Prevalence in the Possible Reservoir Bat Species." The Journal of Infectious Diseases 196 (s2): S176–83. https://doi.org/10.1086/520541.

Pourrut X, Kumulungui B, Wittmann T, Moussavou G, Delicat A, Yaba P, et al.The natural history of Ebola virus in Africa. Microbes Infect 2005 ; 7 (7-8) : 1005-1014. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.04.006

Pourrut, Xavier, Marc Souris, Jonathan S Towner, Pierre E Rollin, Stuart T Nichol, Jean-Paul Gonzalez, and Eric Leroy. 2009. "Large Serological Survey Showing Cocirculation of Ebola and Marburg Viruses in Gabonese Bat Populations, and a High Seroprevalence of Both Viruses in Rousettus Aegyptiacus." BMC Infectious Diseases 9 (1): 159. https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-159.

Pybus OG, Rambaut A. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. Nat Rev Genet 2009; 10: 540–50. DOI: 10.1038/nrg2583

Quick J, Loman NJ, Duraffour S, et al. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. Nature 2016; 530:228–32. https://doi.org/10.1038/nature16996

Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). Virus Evol. 2016 Jan; 2(1): vew007. doi: 10.1093/ve/vew007

Reed, Douglas S., Lisa E. Hensley, Joan B. Geisbert, Peter B. Jahrling, and Thomas W. Geisbertl. 2004. "Depletion of Peripheral Blood T Lymphocytes and NK Cells During the Course of Ebola Hemorrhagic Fever in Cynomolgus Macaques." Viral Immunology 17 (3): 390–400. https://doi.org/10.1089/vim.2004.17.390.

Reed PE, Mulangu S, Cameron KN, et al. A new approach for monitoring ebola virus in wild great apes. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Sep 18;8(9):e3143. doi: 10.1371/journal.pntd.0003143. eCollection 2014 Sep.

Reiter, Paul, Michael Turell, Russell Coleman, Barry Miller, Gary Maupin, Jorge Liz, Ana Kuehne, et al. 1999. "Field Investigations of an Outbreak of Ebola Hemorrhagic Fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: Arthropod Studies." The Journal of Infectious Diseases 179 (s1): S148–54. https://doi.org/10.1086/514304.

Rieger, Toni, Romy Kerber, Hussein El Halas, Elisa Pallasch, Sophie Duraffour, Stephan Günther, and Stephan Ölschläger. 2016. "Evaluation of RealStar Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Kits for Filovirus Detection in the Laboratory and Field." Journal of Infectious Diseases 214 (Suppl 3): S243–S249. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw246.

Rimoin, Anne W., Kai Lu, Matthew S. Bramble, Imke Steffen, Reena H. Doshi, Nicole A. Hoff, Patrick Mukadi, et al. 2018. "Ebola Virus Neutralizing Antibodies Detectable in Survivors of TheYambuku, Zaire Outbreak 40 Years after Infection." Journal of Infectious Diseases 217 (2): 223–231. https://doi.org/10.1093/infdis/jix584.

Rivera, Andrea, and Ilhem Messaoudi. 2016. "Molecular Mechanisms of Ebola Pathogenesis." Journal of Leukocyte Biology 100 (5): 889–904. https://doi.org/10.1189/jlb.4ri0316-099rr.

ROBERT E. KISSLING, OSLYN Q. ROBINSON, FREDERICK A. MURPHY, and SYLVIA WHITFIELD. 1968. “Green Monkey Agent of Disease.” Science 161 (3848): 1364–1364. https://doi.org/10.1126/science.161.3848.1364.

Robert Swanepoel, Patricia A. Leman, Nicholas A. Zachariades Felicity J. Burt, Lawrence E.O. Braack, Pierre E. Rollin Thomas G. Ksiazek, Sherif R. Zaki, and Clarence J. Peters. 1996. “Experimental Inoculation of Plants and Animals with Ebola Virus” 2 (4): 321–325. DOI: 10.3201/eid0204.960407.

Rojek, A., P. Horby, and J. Dunning. 2017. “Insights from Clinical Research Completed during the West Africa Ebola Virus Disease Epidemic.” The Lancet Infectious Diseases 17 (9): e280–e292. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30234-7.

Rosello, Alicia, Mathias Mossoko, Stefan Flasche, Albert Jan Van Hoek, Placide Mbala, Anton Camacho, Sebastian Funk, et al. 2015. “Ebola Virus Disease in the Democratic Republic of the Congo , 1976-2014,” no. November 2014: 1–19. https://doi.org/10.7554/eLife.09015.

Rouquet, Pierre, Jean-Marc Froment, Magdalena Bermejo, Annelisa Kilbourn, William Karesh, Patricia Reed, Brice Kumulungui, et al. 2005. “Wild Animal Mortality Monitoring and Human Ebola Outbreaks, Gabon and Republic of Congo, 2001–2003.” Emerging Infectious Diseases 11 (2): 283–90. https://doi.org/10.3201/eid1102.040533.

Rowe, Alexander K., Jeanne Bertolli, Ali S. Khan, Rose Mukunu, J. J. Muyembe-Tamfum, David Bressler, A. J. Williams, et al. 1999a. “Clinical, Virologic, and Immunologic Follow-Up of Convalescent Ebola Hemorrhagic Fever Patients and Their Household Contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo.” The Journal of Infectious Diseases 179 (s1): S28–35. https://doi.org/10.1086/514318.

Roy, C, Joseph B Mccormick, and Osman A Zubeir. 1983. “Intrafamilial Spread”. Bull World Health Organ. 1983; 61(6): 997–1003.

Sagui, Emmanuel, Frédéric Janvier, Sylvain Baize, Vincent Foissaud, Fassou Koulibaly, Hélène Savini, Nancy Maugey, Marc Aletti, Hervé Granier, and Thierry Carmoi. 2015. "Severe Ebola Virus Infection With Encephalopathy: Evidence for Direct Virus Involvement." Clinical Infectious Diseases 61 (10): 1627–1628. https://doi.org/10.1093/cid/civ606.

Saijo, M., M. Niikura, S. Morikawa, and I. Kurane. 2001. "Immunofluorescence Method for Detection of Ebola Virus Immunoglobulin G, Using HeLa Cells Which Express Recombinant Nucleoprotein." Journal of Clinical Microbiology 39 (2): 776–778. https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.776-778.2001.

Schieffelin, John S., Jeffrey G. Shaffer, Augustine Goba, Michael Gbakie, Stephen K. Gire, Andres Colubri, Rachel S.G. Sealfon, et al. 2014. "Clinical Illness and Outcomes in Patients with Ebola in Sierra Leone." New England Journal of Medicine. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411680.

Schuh AJ, Amman BR, Jones ME, Sealy TK, Uebelhoer LS, Spengler JR, et al. Modelling filovirus maintenance in nature by experimental transmission of Marburg virus between Egyptian rousette bats. Nat Commun. 2017;8:14446. http://dx.doi.org/10.1038/ncomms14446

Scott, Janet T, and Malcolm G Semple. 2017. "Ebola Virus Disease Sequelae: A Challenge That Is Not Going Away." The Lancet Infectious Diseases 17 (5): 470–71. https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30027-0.

Semper, Amanda E., M. Jana Broadhurst, Jade Richards, Geraldine M. Foster, Andrew J.H. Simpson, Christopher H. Logue, J. Daniel Kelly, et al. 2016. "Performance of the GeneXpert Ebola Assay for Diagnosis of Ebola Virus Disease in Sierra Leone: A Field Evaluation Study." PLoS Medicine 13 (3): 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001980.

Shugay M, Zaretsky AR, Shagin DA, Shagina IA, Volchenkov IA, Shelenkov AA, et al. (2017) MAGERI: Computational pipeline for molecular-barcoded targeted resequencing.

PLoS Comput Biol 13(5): e1005480. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005480

Sissoko, Daouda, Sophie Duraffour, Romy Kerber, Jacques Seraphin Kolie, Abdoul Habib Beavogui, Alseny Modet Camara, Géraldine Colin, et al. 2017. "Persistence and Clearance of Ebola Virus RNA from Seminal Fluid of Ebola Virus Disease Survivors: A Longitudinal Analysis and Modelling Study." The Lancet Global Health 5 (1): e80–88. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30243-1.

Smits SL, Pas SD, Reusken CB, et al. Genotypic anomaly in Ebola virus strains circulating in Magazine Wharf area, Freetown, Sierra Leone, 2015. Euro Surveill. 2015;20(40). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.40.30035.

Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. 2014 May 1;30(9):1312-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033. Epub 2014 Jan 21.

Storm N, Jansen Van Vuren P, Markotter W, Paweska JT. Antibody responses to Marburg virus in Egyptian rousette bats and their role in protection against infection. Viruses. 2018; 10:73. http://dx.doi.org/10.3390/v10020073.

Swanepoel, Robert. 1996. "Experimental Inoculation of Plants and Animals with Ebola Virus." Emerging Infectious Diseases 2 (4): 321–25. https://doi.org/10.3201/eid0204.960407.

Swanepoel, Robert, Sheilagh B. Smit, Pierre E. Rollin, Pierre Formenty, Patricia A. Leman, Alan Kemp, Felicity J. Burt, et al. 2007. "Studies of Reservoir Hosts for Marburg Virus." Emerging Infectious Diseases 13 (12): 1847–51. https://doi.org/10.3201/eid1312.071115.

Taniguchi S, Sayama Y, Nagata N, et al. Analysis of the humoral immune responses among Cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996

outbreak in the Philippines. BMC Vet Res. 2012 Oct 11;8:189. doi: 10.1186/1746-6148-8-189.

Tapanes E, Detwiler KM, Cords M. Bat predation by Cercopithecus monkeys: implications for zoonotic disease transmission. Ecohealth. 2016 Jun;13(2):405-9. doi: 10.1007/s10393-016-1121-0. Epub 2016 May 2.

Tapia, Milagritos D., Samba O. Sow, Kirsten E. Lyke, Fadima Cheick Haidara, Fatoumata Diallo, Moussa Doumbia, Awa Traore, et al. 2016. "Use of ChAd3-EBO-Z Ebola Virus Vaccine in Malian and US Adults, and Boosting of Malian Adults with MVA-BN-Filo: A Phase 1, Single-Blind, Randomised Trial, a Phase 1b, Open-Label and Double-Blind, Dose-Escalation Trial, and a Nested, Randomised, Double-Bli." The Lancet Infectious Diseases 16 (1): 31–42. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00362-X.

Team, WHO International Study. 1978. "Ebola Haemorrhagic Fever in Sudan , 1976". Bull World Health Organ. 1978;56(2):247-70.

The PREVAIL II Writing Group, for the Multi-National PREVAIL II Study Team. 2015. "A Randomized, Controlled Trial of ZMapp for Ebola Virus Infection." N Engl J Med. 40 (4): 1291–1296. https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31823da96d.Hydrogen.

Tilouine J. Ebola r.appara.t dans l'est de la République démocratique du Congo. Le Monde Afrique. 2018. https://www.lemonde.fr/afrique/article/2018/08/01/ebola-reapparait-dans-l-estde-la-rdc_5338420_3212.html (accessed March 21, 2019; in French).

Tong, Yi Gang, Wei Feng Shi, Di Liu, Jun Qian, Long Liang, Xiao Chen Bo, Jun Liu, et al. 2015. "Genetic Diversity and Evolutionary Dynamics of Ebola Virus in Sierra Leone." Nature 524 (7563): 93–96. https://doi.org/10.1038/nature14490.

Towner, Jonathan S., Brian R. Amman, Tara K. Sealy, Serena A. Reeder Carroll, James A. Comer, Alan Kemp, Robert Swanepoel, et al. 2009. "Isolation of Genetically Diverse

Marburg Viruses from Egyptian Fruit Bats." Edited by Ron A. M. Fouchier. PLoS Pathogens 5 (7): e1000536. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000536.

Towner, Jonathan S., Xavier Pourrut, César G. Albariño, Chimène Nze Nkogue, Brian H. Bird, Gilda Grard, Thomas G. Ksiazek, Jean-Paul Gonzalez, Stuart T. Nichol, and Eric M. Leroy. 2007. "Marburg Virus Infection Detected in a Common African Bat." Edited by Philip Stevenson. PLoS ONE 2 (8): e764. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000764.

Trial, Clinical, Johan Van Griensven, Elhadj Ibrahima Bah, Nyankoye Haba, Alexandre Delamou, Bienvenu Salim Camara, Kadio Jean-jacques Olivier, et al. 2017. "Electrolyte and Metabolic Disturbances in Ebola Patients" 22 (12).

Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, et al. Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon.Virology 2007;368:155-71.

VanSteelandt, Amanda, Josephine Aho, Kristyn Franklin, Jacques Likofata, Jean Baptiste Kamgang, Sakoba Keita, Lamine Koivogui, N'Faly Magassouba, Lise D. Martel, and Anicet George Dahourou. 2017. "Operational Evaluation of Rapid Diagnostic Testing for Ebola Virus Disease in Guinean Laboratories." PLoS ONE 12 (11): 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188047.

Varkey, Jay B, Jessica G Shantha, Ian Crozier, Colleen S Kraft, G Marshall Lyon, Aneesh K Mehta, Gokul Kumar, et al. 2015. "Persistence of Ebola Virus in Ocular Fluid during Convalescence." New England Journal of Medicine 372 (25): 2423–27. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500306.

Vega, Marc-Antoine de La, Grazia Caleo, Steven Kern Jonathan Audet, Xiangguo Qiu, Robert A. Kozak, James I. Brooks, Jane Greig Anja Wolz, Armand Sprecher, David K. Kargbo Kamalini Lokuge, Antonino Di Caro Brima Kargbo, Allen Grolla, Darwyn Kobasa, James E. Strong, Giuseppe Ippolito, Michel Van Herp, and Gary P. Kobinger. 2015. "Ebola Viral Load at Diagnosis Associates with Patient Outcome and Outbreak

Evolution." Journal of Clinical Investigation 125 (12): 4421–4428. https://doi.org/10.1172/jci83162.

Venkatraman, Navin, Birahim Pierre Ndiaye, Georgina Bowyer, Djibril Wade, Saranya Sridhar, Daniel Wright, Jonathan Powlson, et al. 2019. "Safety and Immunogenicity of a Heterologous Prime-Boost Ebola Virus Vaccine Regimen in Healthy Adults in the United Kingdom and Senegal." The Journal of Infectious Diseases 219 (8): 1187–1197. https://doi.org/10.1093/infdis/jiy639.

Vetter, Pauline, Laurent Kaiser, Manuel Schibler, Iza Ciglenecki, and Daniel G. Bausch. 2016. "Sequelae of Ebola Virus Disease: The Emergency within the Emergency." The Lancet Infectious Diseases 16 (6): e82–91. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00077-3.

Walsh PD, Abernethy KA, Bermejo M, et al. Catastrophic ape decline in western equatorial Africa. Nature 2003; 422: 611-614.

Wamala, Joseph F., Luswa Lukwago, Mugagga Malimbo, Patrick Nguku, Zabulon Yoti, Monica Musenero, Jackson Amone, et al. 2010. "Ebola Hemorrhagic Fever Associated with Novel Virus Strain, Uganda, 2007-2008." Emerging Infectious Diseases 16 (7): 1087–1092. https://doi.org/10.3201/eid1607.091525.

Wang, Yuxiao, Jingxin Li, Yuemei Hu, Qi Liang, Mingwei Wei, and Fengcai Zhu. 2017. "Ebola Vaccines in Clinical Trial: The Promising Candidates." Human Vaccines and Immunotherapeutics 13 (1): 153–168. https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1225637.

Weidmann M, Muhlberger E, Hufert FT. Rapid detection protocol for filoviruses. J Clin Virol 2004; 30: 94–99.

Wells, Chad R., Abhishek Pandey, Alyssa S. Parpia, Meagan C. Fitzpatrick, Lauren A. Meyers, Burton H. Singer, and Alison P. Galvani. 2019. "Ebola Vaccination in the Democratic

Republic of the Congo." Proceedings of the National Academy of Sciences, 201817329. https://doi.org/10.1073/pnas.1817329116.

Whitmer SLM, Ladner JT, Wiley MR, et al. Active Ebola virus replication and heterogeneous evolutionary rates in EVD survivors. Cell Rep 2018; 22: 1159–68.

World Health Organization. (2003). Outbreak(s) of Ebola haemorrhagic fever, Congo and Gabon, October 2001-July 2002 = Flambée(s) de fièvre hémorragique à virus Ebola, Congo et Gabon, octobre 2001 — juillet 2002. Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire, 78 (26), 223 - 228. https://apps.who.int/iris/handle/10665/232198

World Health Organization. 2003. "Outbreaks of Ebola Haemorrhagic Fever, Congo and Gabon October 2001-July 2002." Weekly Epidemiological Review 78 (26): 217–224.

World Health Oorganization. 2019. "Ebola-Ring-Vaccination-Results-12-April-2019." https://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/ebola-ring-vaccination-results-12-april-2019.pdf

World Health Organization Ebola Response Team. 2014. "Ebola Virus Disease in West Africa — The First 9 Months of the Epidemic and Forward Projections." New England Journal of Medicine 371 (16): 1481–1495. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411100.

World Health Organization/International Study Team. 1978. "Ebola Haemorrhagic Fever in Sudan , 1976." Bulletin of the World Health Organization 56 (2): 247–70.

World Health Organization. 1978. "Ebola Haemorrhagic Fever in Zaire, 1976." Bull World Health Organ. 1978; 56(2): 271–293.

World Health Organization. Ebola outbreak Democratic Republic of the Congo 2017. 2017 Jul 2 [cited 2018 May 3]. http://www.who.int/emergencies/ebola-DRC-2017/en/

World Health Organization. Ebola situation report - 30 March 2016. 2016 [cited 2018 May 3]. http://apps.who.int./ebola/ current-situation/ebola-situation-report-30-march-2016.

World Health Organization. Ebola Virus Disease, Democratic Republic of Congo: External Situation Report 28, 30 Juin 2017.

World Health Organization (WHO). Ebola virus disease, Democratic republic of Congo. External situation report update report 8. Available at: http://apps. who.int/iris/bitstream/handle/10665/272761/SITREP-EVD-DRC-20180605-eng. pdf?ua=1. Accessed 12 June 2018.

World Health Oorganization. Ebola virus disease. Democratic Republic of the Congo. External situation report 17: declaration of end of Ebola virus disease outbreak. 2018. https://reliefweb.int/report/democraticrepublic-congo/democratic-republic-congo-ebola-virus-diseaseexternal-situation-14 (accessed April 2, 2019).

World Health Organization Regional Office for Africa. Ebola virus disease. Democratic Republic of the Congo. External situation report. 2018 http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273640/SITREP_EVD_DRC_20180807 eng.pdf?ua=1 (accessed March 21, 2019).

World Health Organization (WHO). Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization—conclusions and recommendations. Ebola vaccines. Available at: http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/sage-ebo-la-vaccination.pdf?ua=1. Accessed 12 June 2018.

World Health Organization. (1992). Viral haemorrhagic fever in imported monkeys = Fièvre hémorragique virale chez des singes importés. Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire, 67 (24), 183. https://apps.who.int/iris/handle/10665/228381

World Health Organization. (2005). Outbreak of Ebola haemorrhagic fever in Yambio, south Sudan, April — June 2004 = Flambée de fièvre hémorragique à virus Ebola à Yambio, sud du Soudan, avril-juin 2004. Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire, 80 (43), 370 - 375. https://apps.who.int/iris/handle/10665/232925

World Health Organization. 2015. "SD Q Line Ebola Zaire Ag," https://www.who.int/diagnostics_laboratory/procurement/150908_final_public_report_ea_0021-020-00.pdf?ua=1

World Health Organization. "Sitrep Nord Kivu 274_20190519_Hebdo_Final. https://www.who.int/ebola/situation-reports/Ebola-SITREP-Nord-Kivu-28_20180912pdf.pdf?ua=1

Yang, Xing-Lou, Chee Wah Tan, Danielle E Anderson, Ren-Di Jiang, Bei Li, Wei Zhang, Yan Zhu, et al. 2019. "Characterization of a Filovirus (Měnglà Virus) from Rousettus Bats in China." Nature Microbiology 4 (3): 390–395. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0328-y.

Yang XL, Zhang YZ, Jiang RD, Guo H, Zhang W, Li B, et al. Genetically diverse filoviruses in Rousettus and Eonycteris spp. bats, China, 2009 and 2015. Emerg Infect Dis. 2017; 23:482–6. http://dx.doi.org/10.3201/eid2303.161119

Yoshida, Reiko, Shino Muramatsu, Hiroshi Akita, Yuji Saito, Miwa Kuwahara, Daisuke Kato, Katendi Changula, et al. 2016. "Development of an Immunochromatography Assay (QuickNavi-Ebola) to Detect Multiple Species of Ebolaviruses." Journal of Infectious Diseases 214 (Suppl 3): S185–S191. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw252.

Yu, Dong-Shan, Tian-Hao Weng, Xiao-Xin Wu, Frederick X.C. Wang, Xiang-Yun Lu, Hai-Bo Wu, Nan-Ping Wu, Lan-Juan Li, and Hang-Ping Yao. 2017. "The Lifecycle of the Ebola Virus in Host Cells." Oncotarget 8 (33): 55750–55759. https://doi.org/10.18632/oncotarget.18498.

Yuan, Junfa, Yuji Zhang, Jialu Li, Yunzhi Zhang, Lin-Fa Wang, and Zhengli Shi. 2012. "Serological Evidence of Ebolavirus Infection in Bats, China." Virology Journal 9 (1): 236. https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-236.

Yuan J, Zhang Y, Li J, Zhang Y, Wang LF, Shi Z. Serological evidence of ebola virus infection in bats, China. Virol J. 2012 Oct 13;9:236. doi: 10.1186/1743-422X-9-236.

Zaki, Sherif R., Wun-Ju Shieh, Patricia W. Greer, Cynthia S. Goldsmith, Tara Ferebee, Jacques Katshitshi, F. Kweteminga Tshioko, et al. 1999. "A Novel Immunohistochemical Assay for the Detection of Ebola Virus in Skin: Implications for Diagnosis, Spread, and Surveillance of Ebola Hemorrhagic Fever." The Journal of Infectious Diseases 179 (s1): S36–S47. https://doi.org/10.1086/514319.

Zhu, Feng Cai, Alie H. Wurie, Li Hua Hou, Qi Liang, Yu Hua Li, James B.W. Russell, Shi Po Wu, et al. 2017. "Safety and Immunogenicity of a Recombinant Adenovirus Type-5 Vector-Based Ebola Vaccine in Healthy Adults in Sierra Leone: A Single-Centre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial." The Lancet 389 (10069): 621–628. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32617-4.